Biol. Stud. 2011: 5(2); 5–16 • DOI: https://doi.org/10.30970/sbi.0502.148
www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology

УДК 57.085.23:576.385.5:576.343:57.021

ВПЛИВ МЕТАБОЛІТІВ АРГІНІНУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ЛЮДСЬКИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ЦІЄЇ АМІНОКИСЛОТИ *IN VITRO*

Ю. В. Курліщук*, Б. О. Винницька-Мироновська*, Я. П. Бобак, О. В. Стасик

Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна
e-mail: stasyk@cellbiol.lviv.ua

В організмі людини амінокислота аргінін потрібна не лише для синтезу білків. Вона є попередником деяких біологічно активних сполук, що впливають на ріст і життєздатність клітин, зокрема злоякісних. До цих сполук належать такі метаболіти аргініну, як поліаміни, оксид азоту, агматин, орнітин і сечовина. Як відомо, *in vitro* пухлинні клітини суттєво відрізняються за рівнем чутливості до дефіциту аргініну, що виявляється у різній динаміці запуску апоптозу. Встановлення молекулярних причин цього явища є важливим для оптимізації режимів протипухлинної ензимотерапії на основі голодування за аргініном. Однією з причин різної чутливості злоякісних клітин до голодування за аргініном можуть бути відмінності у відповіді на внутрішньоклітинний дефіцит його катаболітів. Тому метою цієї роботи було дослідити вплив екзогенних метаболітів аргініну (поліамінів путресцину та сперміну, а також агматину, оксиду азоту, орнітину та сечовини) в середовищі без цієї амінокислоти на життєздатність і проліферативний потенціал клітин двох людських пухлинних ліній (A549 карциноми легені та HepG2 гепатокарциноми), що відрізняються за рівнем чутливості до голодування за аргініном. Встановлено, що незалежно від рівня чутливості злоякісних клітин до дефіциту аргініну, жоден із досліджуваних метаболітів цієї амінокислоти не впливає на їхню життєздатність і проліферативний потенціал у середовищі без аргініну. Отже, незважаючи на комплексний характер метаболізму аргініну в клітині, обмеження доступності його метаболітів не є ключовою причиною, яка визначає різний рівень чутливості пухлинних клітин до голодування за цією амінокислотою.

Ключові слова: голодування за аргініном, метаболіти аргініну, путресцин, спермін, агматин, оксид азоту, орнітин, сечовина.

ВСТУП

Створення дефіциту індивідуальних амінокислот в організмі людини є одним із перспективних підходів у сучасній терапії раку. Відомо, що деякі типи пухлин є ауксотрофами за аспарагіном, метіоніном чи аргініном і виявляють підвищену

* Ці автори зробили однаковий внесок у виконання роботи.

чутливість до голодування за цими амінокислотами. Це привернуло значний науковий і клінічний інтерес до терапії раку на основі застосування ферментів, що розщеплюють вищезгадані амінокислоти – аспарагінази, метіонінази, аргініндеімінази й аргінази [4–6, 12].

У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показано, що підходи до ензимотерапії на основі голодування за аргініном характеризуються селективною дією, спрямованою проти злоякісних клітин, і є нетоксичними для організму в цілому [7]. Однак, незважаючи на те, що режими протипухлинної терапії з використанням ферментів деградації аргініну, аргініндеімінази й аргінази, вже перебувають на стадії клінічних випробувань, фізіологічні механізми, котрі лежать в основі різної чутливості злоякісних клітин до дефіциту аргініну, поки що залишаються нез'ясованими. Складність пошуку причин чутливості пухлинних клітин до голодування за аргініном зумовлена комплексним характером метаболізму цієї амінокислоти в організмі людини [9]. На відміну від більшості амінокислот, аргінін необхідний не лише для біосинтезу білків. Він виступає ключовою молекулою у низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які зазнають серйозних змін під час злоякісної трансформації клітин і впливають на хід канцерогенезу [8]. Підвищена чутливість злоякісних клітин до дефіциту аргініну, порівняно з нормальними клітинами організму, ймовірно, спричинена мутаційним статусом клітин пухлини, зокрема, особливостями регуляції експресії генів метаболізму аргініну та специфікою функціонування сигнальних шляхів, які контролюють мітотичний цикл та індукцію запрограмованої смерті клітин, апоптозу, у відповідь на стрес, викликаний голодуванням за аргініном [11].

У попередніх дослідженнях ми встановили, що в моношаровій культурі людські епітеліальні злоякісні клітини суттєво відрізняються за рівнем чутливості до дефіциту аргініну. Це дало нам змогу використати відмінності у виживанні та здатності зберігати проліферативний потенціал після голодування за аргініном як основу для класифікації пухлинних клітин на умовно чутливі й умовно резистентні до дефіциту цієї амінокислоти [3, 13]. Ми також показали, що різна чутливість пухлинних клітин людини до дефіциту аргініну не визначається профілем експресії генів ферментів анаболізму (аргініносукцинатсинтетази й орнітинтранскарбамілази) чи катаболізму (аргіназ I та II типу, індуцибельної синтази оксиду азоту й аргініндекарбоксилази) цієї амінокислоти. Ми вперше встановили, що усі проаналізовані нами клітини людини є ауксотрофами за аргініном унаслідок відсутності в них активності ферменту анаболізму аргініну орнітинтранскарбамілази. Отже, аргінін слід розглядати як незамінну амінокислоту в умовах *in vitro* [3].

Метою цієї роботи було дослідження ролі метаболітів аргініну як модуляторів відповіді пухлинних клітин людини на голодування за цією амінокислотою.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали досліджень

У роботі використовували реактиви та хімічні сполуки виробництва фірм: „Sigma-Aldrich" (США), „HyClone Laboratories" (США), „PAA Laboratories" (Австрія), „PAN Biotech" (Німеччина), „Fluka" (Німеччина). Кваліфікація хімічних реактивів вітчизняного виробництва рівня „хч" (хімічно чистий).

Культивування клітин

Клітини вирощували у стандартному середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) фірми „Sigma-Aldrich" з додаванням 10% ембріональної телячої

сироватки крові („Sigma-Aldrich"), 2 мМ глутаміну та 25 мкг/мл гентаміцину, у зволоженій атмосфері 5% CO_2 та 95% повітря, за температури +37°С. Культуральне середовище оновлювали кожні 2–3 доби. Перед пасажуванням клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na_2HPO_4, 1,4 мМ KH_2PO_4; pH 7,4). З чашок клітини знімали за допомогою розчину трипсин/ЕДТА (137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,03 мМ Na_2HPO_4, 0,4 мМ KH_2PO_4, 4,5 мМ $NaHCO_3$, 0,53 мМ ЕДТА, 0,25% трипсин; pH 7,4). Пасажування клітин проводили у співвідношенні 1:3 кожні 3–4 доби.

Клітини досліджуваних ліній були вільні від забруднення бактеріями роду *Mycoplasma*, що встановлено за допомогою наборів „Mycoplasma Detection Kit MycoAlert" фірми „Cambrex Bio Science" (Великобританія) та „PCR Mycoplasma Kit" фірми „Applichem" (Німеччина).

Створення дефіциту аргініну в культурі клітин

В експериментах використовували два типи дослідних середовищ: повноцінне середовище (ПС), вміст аргініну в якому становить 0,4 мМ, та середовище без аргініну. Повноцінне середовище готували на основі середовища без аргініну шляхом додавання цієї амінокислоти до кінцевої концентрації 0,4 мМ. Для формування дефіцитних за аргініном середовищ і відповідних контрольних середовищ використовували діалізовану ембріональну телячу сироватку („HyClone Laboratories"), що не містила низькомолекулярних сполук ($M \leq 10$ кДа), у тому числі амінокислот. Інші компоненти середовища, глутамін і гентаміцин, додавали в тій же концентрації, що й у стандартне культуральне середовище.

Клітини на експоненційній фазі росту знімали з чашок за допомогою розчину трипсин/ЕДТА, засівали в необхідній для досліду кількості у стандартне середовище й інкубували впродовж 12 год, щоб дати їм змогу прикріпитися. Після цього клітини промивали фосфатно-сольовим буфером і замінювали стандартне середовище на дослідне без аргініну („HyClone Laboratories"). Тривалість культивування клітин за умов дефіциту аргініну визначалася вимогами індивідуальних експериментів.

Фарбування клітин трипановим синім

Для визначення впливу різноманітних чинників (орнітин, сечовина) на ріст і виживання клітини досліджуваних ліній засівали в кількості 200 000 клітин у лунку 24-лункового планшету й інкубували в повноцінному середовищі впродовж 12 год, щоб дати клітинам змогу прикріпитися. Після цього клітини промивали фосфатно-сольовим буфером, змінювали середовище на дослідне й інкубували впродовж періоду часу, необхідного для експерименту. Після завершення періоду інкубації клітини знімали з планшету розчином трипсин/ЕДТА, ресуспендували в повноцінному середовищі та зафарбовували розчином трипанового синього (кінцева концентрація барвника 0,4%). Кількість живих (незафарбованих) і мертвих (зафарбованих) клітин підраховували в гемоцитометрі за допомогою світлового мікроскопа „МИК-МЕД 5" фірми „ЛОМО" (Росія).

МТТ-аналіз

Для визначення впливу різноманітних чинників (путресцину, сперміну, дифторметилорнітину, агматину, нітропрусиду натрію) на проліферацію клітини досліджуваних ліній засівали в кількості 50 000 клітин у лунку 96-лункового планшету й інкубували в повноцінному середовищі впродовж 12 год, щоб дати клітинам змогу прикріпитися. Після цього клітини промивали фосфатно-сольовим буфером, змі-

нювали середовище на дослідне та інкубували впродовж періоду часу, необхідного для експерименту. За 5 год до завершення періоду інкубації в середовище додавали МТТ-реагент, 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолію („Sigma-Aldrich"), до кінцевої концентрації 500 мкг/мл. Після завершення періоду інкубації середовище відбирали, а в лунки додавали диметилсульфоксид для розчинення фіолетових кристалів формазану, що утворилися внаслідок відновлення МТТ-реагента редуктазами живих клітин. Концентрацію формазану в лунках визначали спектрофотометричним методом на апараті „Plate Reader BioTek" (США) за оптичним поглинанням при довжині хвилі 490 нм. Кількість живих клітин (у відсотках) визначали за співвідношенням оптичних густин, проміряних у лунках, в яких клітини інкубували з дослідним і контрольним середовищами.

Статистичний аналіз експериментальних даних

Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта експериментальних і контрольних умов. Кожна точка графіків і діаграм, наведених на рисунках, відповідає середньому значенню *M*, розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів. Середню похибку отриманого результату *m* вираховували за значенням середньої квадратичної похибки *σ*. На рисунках вона представлена вертикальною лінією біля кожної точки даних. Довжина цієї лінії відповідає значенню *m*. Порівняння двох мінливих значень здійснювали на підставі показника статистичної достовірності відмінностей *p*. Показник *p* обчислювали за критерієм Стьюдента, який визначали шляхом проведення *t*-тесту для двох вибірок даних із різними дисперсіями σ^2. Відмінність між двома значеннями вважали достовірною, коли значення *p* було більше за 0,95.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Окрім біосинтезу білків та участі в циклі сечовини, аргінін є необхідним для синтезу багатьох біологічно активних сполук (поліамінів, агматину й оксиду азоту) [8, 9]. Нестача аргініну в середовищі може призводити до порушення синтезу цих метаболітів і спричинювати їх дефіцит у клітині. Оскільки рівень потреби поліамінів, агматину й оксиду азоту відрізняється між нормальними та злоякісними клітинами, а також між різними типами пухлин [14], можна припустити, що саме ці відмінності є причиною диференційної чутливості клітин до дефіциту аргініну. Щоб перевірити цю гіпотезу, ми дослідили вплив метаболітів аргініну (поліамінів, агматину й оксиду азоту) на ріст і життєздатність людських злоякісних клітин на фоні дефіциту цієї амінокислоти.

Вплив поліамінів на життєздатність людських пухлинних клітин за умов голодування за аргініном

Поліаміни (путресцин, спермідин і спермін) є важливими модуляторами проліферації й апоптозу пухлинних клітин людини [2]. Тому нашою метою було з'ясувати, чи залежить характер відповіді злоякісних клітин на голодування за аргініном від рівня їхньої чутливості до дефіциту поліамінів. Для цього досліджено вплив екзогенних поліамінів, путресцину та сперміну, а також дифторметилорнітину, інгібітора ключового ферменту біосинтезу поліамінів орнітиндекарбоксилази [18], на ріст і життєздатність людських злоякісних клітин за умов голодування за аргініном. Для аналізу вибрано дві лінії епітеліальних пухлинних клітин людини, що, згідно з нашою класифікацією, відрізняються за рівнем чутливості до дефіциту аргініну. А саме, клітини

карциноми легені A549, що є резистентними до дефіциту аргініну в середовищі, та клітини гепатокарциноми HepG2, які є чутливими до голодування за цією амінокислотою. Тривалість інкубації клітин у дослідних умовах становила 5 днів. Приріст клітин у культурі та їхню життєздатність визначали методом МТТ-аналізу.

Показано, що додавання 0,1 мМ путресцину чи сперміну в повноцінне середовище (0,4 мМ аргінін) не впливає на проліферативний потенціал клітин ліній A549 та HepG2 (рис. 1, *А*). На противагу, додавання 5 мМ дифторметилорнітину в повноцінне середовище призводить до часткового інгібування проліферації клітин обох досліджуваних ліній (рис. 1, *А*). Отже, за нормальних умов культивування додавання екзогенних поліамінів не впливає на ріст клітин A549 і HepG2, тоді як інгібування внутрішньоклітинного біосинтезу поліамінів призводить до сповільнення росту клітин обох ліній.

Порівняно з нормальними умовами культивування (повноцінне середовище, 0,4 мМ аргінін), голодування за аргініном інгібує проліферацію та призводить до зупинки росту клітин A549 і HepG2 (рис. 1, *А*). Додавання 0,1 мМ путресцину чи сперміну в середовище без аргініну не веде до змін кількості живих клітин у культурах обох ліній впродовж 5 днів експерименту (рис. 1, *Б*). Отже, доступність поліамінів не є ключовим чинником, що визначає життєздатність злоякісних клітин за умов голодування за аргініном.

Додавання специфічного інгібітора синтезу поліамінів дифторметилорнітину (5 мМ) за умов голодування за аргініном також не впливає на ріст і життєздатність клітин у культурах ліній A549 і HepG2 (рис. 1, *Б*). Ці дані свідчать про те, що додаткове блокування біосинтетичного шляху поліамінів за умов дефіциту аргініну в середовищі не призводить до підсилення цитостатичного і цитотоксичного впливів на досліджувані пухлинні клітини людини.

Оскільки за умов голодування за аргініном впливи путресцину, сперміну та дифторметилорнітину на ріст і життєздатність не відрізнялися між резистентною (A549) та чутливою (HepG2) до дефіциту аргініну клітинними лініями, можна зробити висновок, що доступність і метаболізм поліамінів у клітині не є вирішальними у визначенні характеру відповіді модельних людських епітеліальних пухлинних клітин на голодування за цією амінокислотою.

Вплив агматину та донора оксиду азоту на життєздатність людських пухлинних клітин за умов голодування за аргініном

Окрім поліамінів, аргінін є метаболічним попередником агматину й оксиду азоту, які також виконують роль важливих регуляторів процесів поділу та загибелі пухлинних клітин [1, 16]. З метою з'ясувати, чи нестача цих метаболітів може впливати на характер відповіді злоякісних клітин на голодування за аргініном, досліджено вплив агматину (0,01 мМ) та донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (0,01 мМ) на ріст і життєздатність людських пухлинних клітин ліній A549 і HepG2 на фоні дефіциту аргініну. Клітини інкубували впродовж 5 днів у середовищі без аргініну з додаванням агматину чи нітропрусиду натрію. Приріст і життєздатність клітин у культурі визначали методом МТТ-аналізу.

Показано, що впродовж 5 днів культивування кількість живих клітин у середовищі без аргініну не відрізняється від кількості клітин, виявленої за умов інкубації в середовищі без аргініну з додаванням агматину чи нітропрусиду натрію (рис. 2). Отже, життєздатність клітин ліній A549 та HepG2 за умов дефіциту аргініну не визначається роллю цієї амінокислоти як попередника агматину чи оксиду азоту.

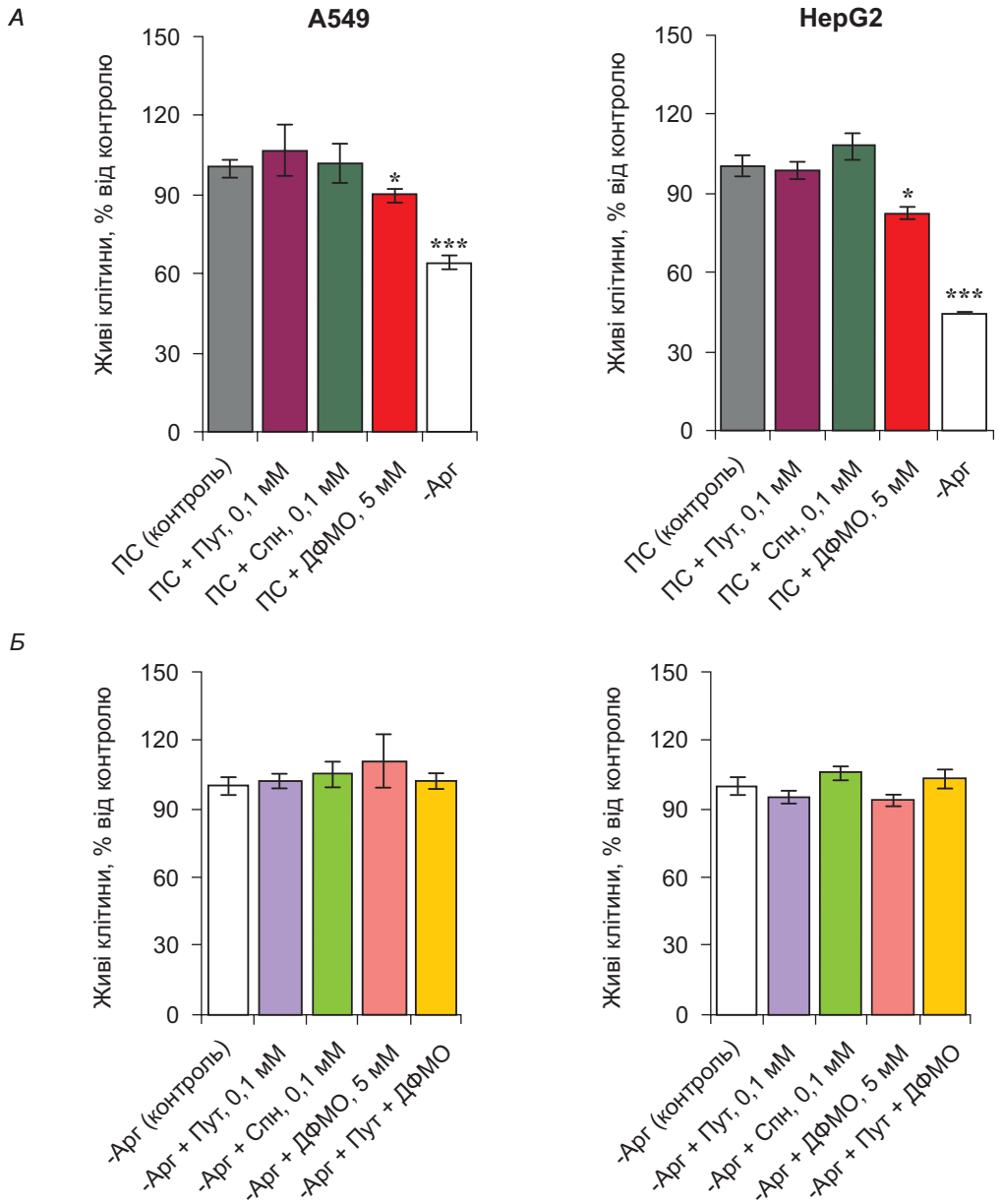

Рис. 1. Вплив екзогенних поліамінів і дифторметилорнітину на ріст і життєздатність пухлинних клітин за нормальних умов культивування (*А*) та під час голодування за аргініном (*Б*). Тривалість інкубації в зазначених умовах – 5 днів. Прийняті скорочення: ПС – повноцінне середовище (0,4 мМ аргінін); -Арг – середовище без аргініну; Пут – путресцин; Спн – спермін; ДФМО – дифторметилорнітин

Fig. 1. Effect of exogenous polyamines and difluoromethylornithine on growth and viability of tumor cells under normal cultural conditions (*A*) and upon arginine deprivation (*Б*). Duration of incubation – 5 days. Abbreviations: ПС – complete medium (0.4 мМ arginine); -Арг – arginine-free medium; Пут – putrescine; Спн – spermine; ДФМО – difluoromethylornithine

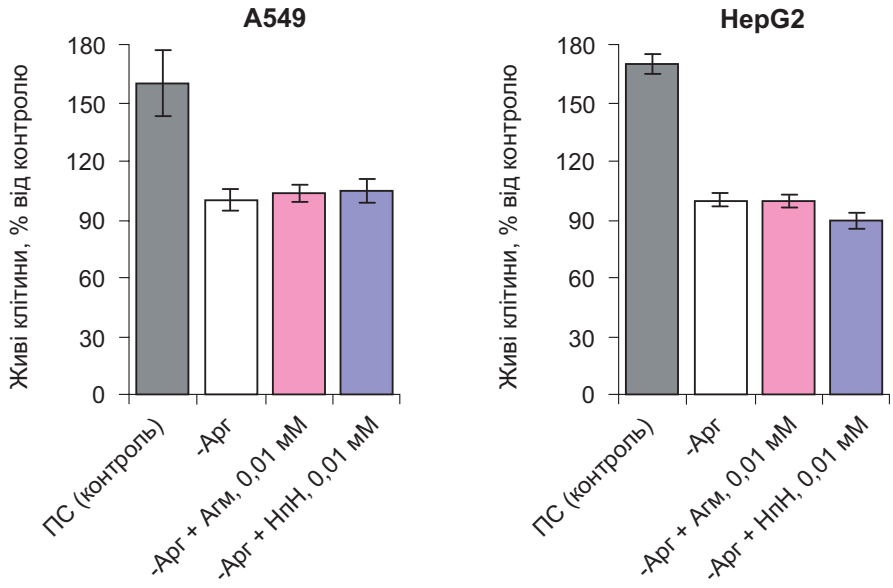

Рис. 2. Вплив агматину та нітропрусиду натрію на ріст і життєздатність пухлинних клітин за умов голодування за аргініном. Тривалість інкубації в зазначених умовах – 5 днів. Прийняті скорочення: ПС – повноцінне середовище (0,4 мМ аргінін); -Арг – середовище без аргініну; Агм – агматин; НпН – нітропрусид натрію

Fig. 2. Effect of agmatine and sodium nitroprusside on growth and viability of tumor cells under conditions of arginine-deprived culture. Duration of incubation – 5 days. Abbreviations: ПС – complete medium (0.4 мМ arginine); -Арг – arginine-free medium; Агм – agmatine; НпН – sodium nitroprusside

Роль активності внутрішньоклітинної аргінази у визначенні чутливості пухлинних клітин до дефіциту аргініну

Серед досліджуваних нами чутливих до дефіциту аргініну клітин людини особливої уваги заслуговує лінія гепатокарциноми HepG2. На відміну від інших ліній, культивування клітин HepG2 у середовищі без аргініну впродовж лише 48 год призводить до повної втрати ними здатності відновлювати проліферацію [3, 13]. Результати наших попередніх досліджень показали, що сумарна активність аргіназ I та II типу у цих клітинах приблизно у 5 разів вища, порівняно з клітинами інших досліджуваних ліній [3]. Ймовірно, що після заміни середовища без аргініну на повноцінне середовище може відбуватися швидка утилізація аргініну внутрішньоклітинною аргіназою і, як наслідок, повторне збіднення середовища та продовження голодування клітин за цією амінокислотою. Цей феномен може бути однією з причин підвищеної чутливості клітин HepG2 до дефіциту аргініну.

Для перевірки цієї гіпотези клітини лінії HepG2 культивували в середовищі без аргініну впродовж 48 год, після чого середовище замінювали на повноцінне з чи без додавання норваліну й продовжували культивувати клітини протягом наступних 24 год. Як показано на рис. 3, *А*, додавання аргініну в середовище після 48 год голодування за цією амінокислотою не відновлює проліферацію клітин HepG2. Додавання в повноцінне середовище 5 мМ норваліну, який у зазначеній концентрації веде до втрати близько 50% активності внутрішньоклітинної аргінази [15], також не впливає на проліферативний потенціал клітин досліджуваної лінії.

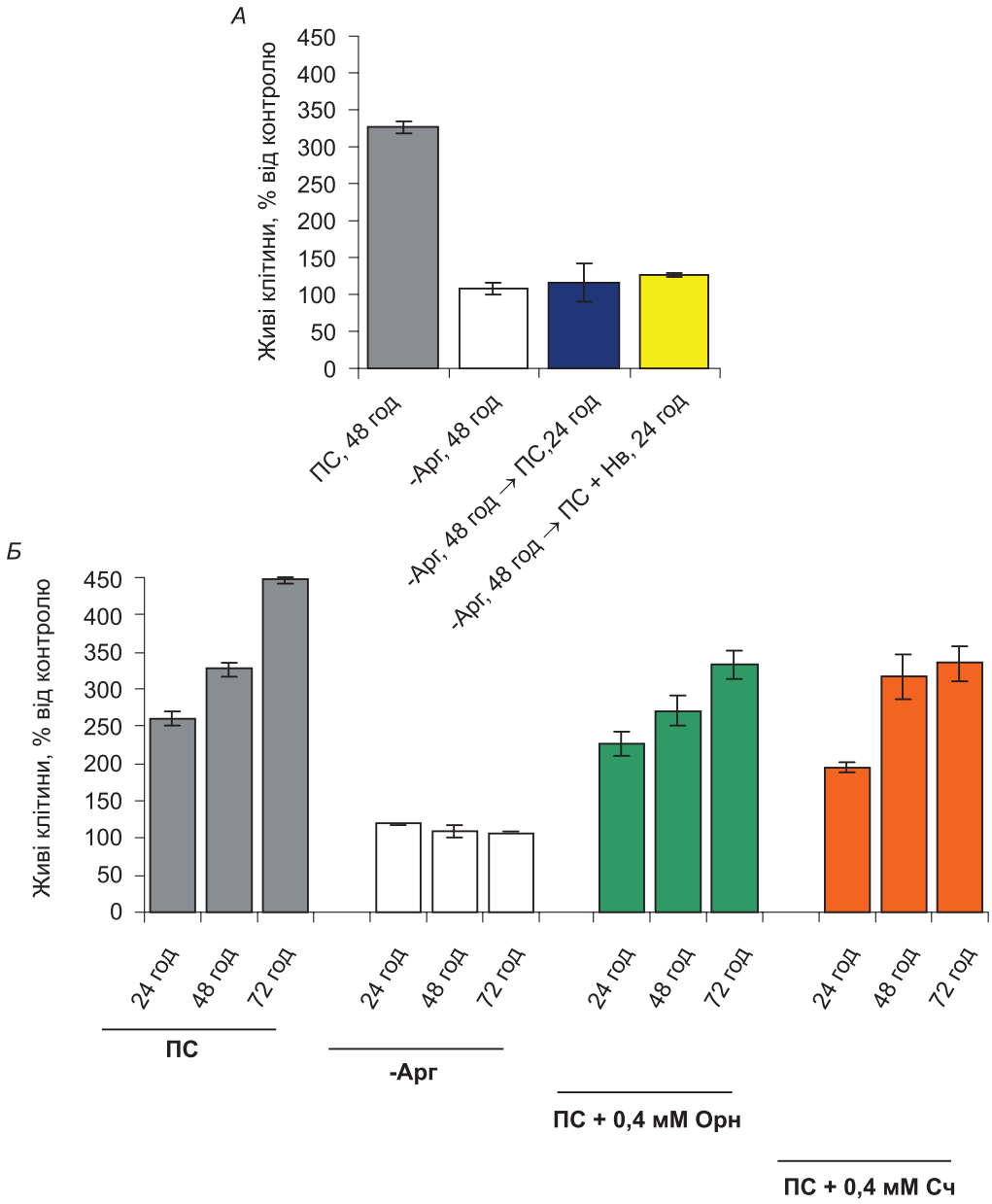

Рис. 3. *А* – вплив інгібування внутрішньоклітинної аргінази норваліном (5 мМ) на проліферативний потенціал клітин лінії HepG2; *Б* – вплив орнітину (0,4 мМ) та сечовини (0,4 мМ) на ріст клітин лінії HepG2 у повноцінному середовищі. Прийняті скорочення: ПС – повноцінне середовище (0,4 мМ аргінін); -Арг – середовище без аргініну; Нв – норвалін; Орн – орнітин; Сч – сечовина

Fig. 3. *А* – effect of arginase activity inhibition by norvaline (5 mM) on proliferative capacity of HepG2 cells; *Б* – effect of ornithine (0.4 mM) and urea (0.4 mM) on HepG2 cell growth in complete culture medium. Abbreviations: ПС – complete medium (0.4 мМ arginine); -Арг – arginine-free medium; Нв – norvaline; Орн – ornithine; Сч – urea

Результати проведених досліджень дають підстави зробити висновок, що висока ферментативна активність аргінази не є основною причиною підвищеної чутливості клітин гепатокарциноми лінії HepG2 до дефіциту аргініну в культуральному середовищі.

Окрім швидкого виснаження внутрішньоклітинних запасів аргініну, підвищена активність аргінази у клітинах лінії HepG2 може призводити до накопичення потенційно цитотоксичних концентрацій метаболітів аргініну, сечовини й орнітину [10], що може бути ще однією причиною підвищеної чутливості клітин гепатокарциноми до дефіциту цієї амінокислоти. Для перевірки цієї гіпотези ми дослідили вплив еквімолярних до вмісту аргініну концентрацій орнітину і сечовини (0,4 мМ) на ріст клітин HepG2 у повноцінному середовищі впродовж 24, 48 та 72 год культивування.

Як показано на рис. 3, *Б*, присутність 0,4 мМ орнітину чи сечовини в повноцінному культуральному середовищі призводить лише до незначного інгібування росту клітин HepG2, порівняно з нормальними умовами культивування. Отже, орнітин і сечовина в еквімолярній до вмісту аргініну в культуральному середовищі концентрації, не мають значного цитотоксичного впливу на клітини гепатокарциноми людини. Ці результати свідчать про те, що причина підвищеної чутливості клітин лінії HepG2 до дефіциту аргініну не пов'язана ні зі швидким виснаженням внутрішньоклітинних ресурсів аргініну під дією ферменту аргінази, ні з накопиченням орнітину та сечовини як метаболітів аргініну.

Підсумовуючи, варто відзначити, що за умов голодування за аргініном дефіцит його метаболітів (поліамінів, агматину, оксиду азоту), а також розщеплення внутрішньоклітинних запасів аргініну під дією аргінази з утворенням орнітину і сечовини, не є вирішальним у досягненні цитостатичного ефекту та визначенні диференційного характеру відповіді епітелійних злоякісних клітин людини на дефіцит аргініну. Отримані результати вказують на необхідність пошуку інших регуляторних механізмів, що лежать в основі відмінностей у рівні чутливості пухлинних клітин людини до голодування за аргініном.

ВИСНОВКИ

Ми вперше показали, що, незважаючи на складний характер метаболізму аргініну в клітині, обмеження доступності аргініну як метаболічного попередника поліамінів, агматину чи оксиду азоту не впливає на рівень чутливості пухлинних клітин людини до дефіциту цієї амінокислоти і їхній проліферативний потенціал *in vitro*. Таким чином, життєздатність пухлинних клітин за умов голодування за аргініном визначається не метаболізмом цієї амінокислоти, а іншими, поки що не встановленими, сигнальними чи регуляторними механізмами.

ПІДТРИМКА І ПОДЯКИ

Робота виконана за фінансової підтримки Західно-Українського Біомедичного Дослідного Центру WUBMRC (індивідуальний грант Б. О. Винницької на 2008–2009 рр.).

1. *Arndt M.A., Battaglia V., Parisi E.* et al. The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, 2009; 296(6): 1411–1419.
2. *Basuroy U.K., Gerner E.W.* Emerging concepts in targeting the polyamine metabolic pathway in epithelial cancer chemoprevention and chemotherapy. **J. Biochem**, 2006; 139(1): 27–33.
3. *Bobak Y.P., Vynnytska B.O., Kurlishchuk Y.V.* et al. Cancer cell sensitivity to arginine deprivation *in vitro* is not determined by endogenous levels of arginine metabolic enzymes. **Cell Biol. Int**, 2010; 34(11): 1085–1089.
4. *Cheng P.N., Lam T.L., Lam W.M.* et al. 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; 67(1): 309–317.
5. *Glazer E.S., Piccirillo M., Albino V.* et al. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. **J. Clin. Oncol**, 2010; 28(13): 2220–2226.
6. *Hill J.M., Roberts J., Loeb E.* et al. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms: remission in human leukemia. **JAMA**, 1967; 202(9): 882–888.
7. *Kuo M.T., Savaraj N., Feun L.G.* Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. **Oncotarget**, 2010; 1(4): 246–251.
8. *Morris S.M.* Arginine: beyond protein. **Am. J. Clin. Nutr**, 2006; 83(2): 508S–512S.
9. *Morris S.M.* Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. **J. Nutr**, 2007; 137(6): 1602S–1609S.
10. *Nakauchi T., Ando A., Ueda-Yamada M.* et al. Prevention of ornithine cytotoxicity by nonpolar side chain amino acids in retinal pigment epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, 2003; 44(11): 5023–5028.
11. *Scott L., Lamb J., Smith S., Wheatley D.N.* Single amino acid (arginine) deprivation: rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells. **Br. J. Cancer**, 2000; 83(6): 800–810.
12. *Tan Y., Xu M., Hoffman R.M.* Broad selective efficacy of recombinant methioninase and polyethylene glycol-modified recombinant methioninase on cancer cells *in vitro*. **Anticancer Res**, 2010; 30(4): 1041–1046.
13. *Vynnytska B.O., Mayevska O.M., Kurlishchuk Y.V.* et al. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. **Anticancer Drugs**, 2011; 22(2): 148–157.
14. *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; 15(4): 247–253.
15. *Wheatley D.N., Philip R., Campbell E.* Arginine deprivation and tumour cell death: Arginase and its inhibition. **Mol. Cell Biochem**, 2003; 244():177–185.
16. *Wink D.A., Vodovotz Y., Laval J.* et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, 1998; 19(5): 711–721.
17. *Wu G., Morris S.M.* Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem. J**, 1998; 336(1): 1–17.
18. *Zou C., Vlastos A.T., Yang L.* et al. Effects of difluoromethylornithine on growth inhibition and apoptosis in human cervical epithelial and cancerous cell lines. **Gynecol. Oncol**, 2002; 85(2): 266–273.

INFLUENCE OF ARGININE METABOLITES ON HUMAN TUMOR CELL VIABILITY UPON ARGININE DEPRIVATION *IN VITRO*

Y. V. Kurlishchuk*, B. O. Vynnytska-Myronovska*, Y. P. Bobak, O. V. Stasyk
Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: stasyk@cellbiol.lviv.ua

In human organism arginine is necessary not only for protein synthesis but it also serves as a precursor for a number of important biologically active substances that influence cell growth and viability. These substances include such arginine metabolites as polyamines, nitric oxide, agmatine, ornithine and urea. It is known that *in vitro* tumor cells substantially differ in the level of sensitivity to arginine deprivation, which is reflected in the dynamics of apoptotic manifestations under these conditions. Identification of the molecular reasons of this phenomenon is important for optimization of the regimes of arginine deprivation-based anticancer enzymotherapy. One of possible reasons of the various level of sensitivity of tumor cells to arginine deprivation may reside in differences in their susceptibility to arginine catabolites withdrawal. Therefore, we aimed to investigate the effect of exogenous arginine metabolites (polyamines putrescine and spermine, as well as agmatine, nitric oxide, ornithine and urea) under arginine deprived conditions on viability and proliferative potential of two human cancer cell lines (A549 lung carcinoma and HepG2 hepatocarcinoma) that differ in the level of sensitivity to arginine depletion. It was revealed that none of the studied arginine catabolite affected cancer cell viability and proliferative potential in arginine-free medium, independently of the level of their sensitivity to arginine starvation. Thus, despite the complexity and versatility of arginine metabolic networks, the depletion of metabolites of this amino acid is not a key reason that determines differences in cell response to arginine deprivation. Therefore, identification of signaling mechanisms that underlie apoptosis induction in cancer cells upon arginine starvation needs to be further elucidated.

Key words: arginine starvation, arginine metabolites, putrescine, spermine, agmatine, nitric oxide, ornithine, urea.

***** These authors contributed equally to the study.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ АРГИНИНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ЭТОЙ АМИНОКИСЛОТЫ *IN VITRO*

Ю. В. Курлищук*, Б. О. Винницкая-Мироновская*, Я. П. Бобак, О. В. Стасык
Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина
e-mail: stasyk@cellbiol.lviv.ua

В человеческом организме аминокислота аргинин необходима не только для синтеза белков. Она является также предшественником ряда биологически активных веществ, которые влияют на рост и жизнеспособность клеток, в частности

***** Эти авторы сделали равный вклад в выполнение роботы.

злокачественных. К этим веществам принадлежат такие метаболиты аргинина, как полиамины, оксид азота, агматин, орнитин и мочевина. Известно, что *in vitro* опухолевые клетки существенно отличаются по уровню чувствительности к дефициту аргинина, что отображается в разной динамике запуска апоптоза. Идентификация молекулярных механизмов этого явления важна для оптимизации режимов противоопухолевой энзимотерапии, основанной на голодании по аргинину. Одной из причин различной чувствительности злокачественных клеток к голоданию по аргинину могут быть различия в ответе на внутриклеточный дефицит его катаболитов. Поэтому целью этой роботы было исследование влияния экзогенных метаболитов аргинина (полиаминов путресцина и спермина, а также агматина, оксида азота, орнитина и мочевины) в среде без аргинина на жизнеспособность и пролиферативный потенциал клеток двух человеческих опухолевых линий (A549 карциномы легкого и HepG2 гепатокарциномы), которые отличаются по уровню чувствительности к голоданию по аргинину. Установлено, что независимо от уровня чувствительности злокачественных клеток к дефициту аргинина, ни один из исследованных метаболитов этой аминокислоты не влияет на их жизнеспособность и пролиферативный потенциал в среде без аргинина. Таким образом, несмотря на комплексный характер метаболизма аргинина в клетке, ограничение доступности его метаболитов не является основной причиной, определяющей различный уровень чувствительности опухолевых клеток к голоданию по аргинину.

Ключевые слова: голодание по аргинину, метаболиты аргинина, путресцин, спермин, агматин, оксид азота, орнитин, мочевина.

Одержано: 16.06.2011