

Ролята на L-аргинин В канцерогенезата

Д-р Жанет Грудева-Попова,¹ д-р Людмила Владимирова-Китова,²
доц. Галина Куртева³

¹Клиника по онкология и хематология

²Клиника по кардиология, УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив

³Клиника по медицинска онкология, СБАЛО, София

Резюме

Аргининът генерира в метаболизма си азотен оксид (NO) – всеобщата молекула на сигналната трансдукция. Независимо от прекалено опростения си биохимизъм, NO има съществена и комплексна роля в туморната биология. Околната среда влияе сигнификантно на активността на NO чрез кислородните радикали, метални йони и специфични протеини. При възпаление цитокините могат да повишат синтеза на NO от аргинин по независим от наличния субстрат механизъм. Интрацелуларният аргинин може да се метаболизира по много и различни пътища, специфични за различните типове клетки. Асоциацията малигнен процес – хронично възпаление е позната отдавна. Продължителната експозиция на NO индуцирано от хроничното възпаление може да провокира карциногенеза в някои органи – карцином на глава и шия, бял дроб, хранопровод, стомах, дебело черво, черен дроб и кожа. NO може да предизвика необратима увреда на няколко основни механизма: оксидативно увреждане на ДНК; блокиране синтеза на ДНК чрез инхибиране на рибонуклеотид редуктазата (скорост-лимитиращ ензим в синтеза на ДНК); пряко инхибиране ензимите в митохондриалната верига и електронния транспорт. По-доброто познание за прецизната роля на NO при карциноми ще задълбочи познанието за терапевтичната стратегия и ще предопредели нови антинеопластични стратегии.

Ключови думи: аргинин, механизъм на действие, канцерогенеза, превенция.

Role of L-arginine in carcinogenesis

Dr. Janet Grudeva-Popova¹, Dr. Ludmila Vladimirova-Kitova², Assoc. Prof. Dr. Galina Kurteva³

¹Clinic of Oncology and Hematology,

²Clinic of Cardiology UMHAT „St. Georgi“ EAD – Plovdiv

³Clinic of Medical Oncology, SHATO, Sofia

Abstract

Arginine metabolism generates nitric-oxide (NO) – the ubiquitous signal transduction molecule. Despite its simplistic molecular structure NO has a fundamental and complex role in tumor biology. Cellular microenvironment influences NO-activity significantly through reactive oxygen species, metal ions and specific proteins. During inflammatory states cytokines can enhance arginine-derived NO synthesis using a substrate independent mechanism. Intracellular arginine can be metabolized via several different pathways, which are specific to certain cell types. The association between malignancy and chronic inflammation has long been known. Long-term exposure to NO induced by chronic inflammation may promote carcinogenesis in a number of organs – head and neck cancer, lung, esophageal, stomach, colon, liver and skin cancers. NO can also cause irreversible damage to several fundamental mechanisms: oxidative damage to DNA; blockage of DNA synthesis through the inhibition of ribonucleotide reductase (the rate-limiting enzyme in DNA synthesis); direct inhibition of mitochondrial electron transport chain. A profound understanding of the precise role of NO in cancer will deepen knowledge into possible therapeutic implications and could determine new anti-neoplastic strategies.

Key words: arginine, mechanism of action, carcinogenesis, prevention.

Въведение

Канцерогенезата е резултат на многостепенен процес, който включва три основни компонента: начало, поддръжане на процеса и прогресия. Аргининът се включва в редица биосинтетични вериги на всички посочени етапи. Така може да повлияе сигнификантно туморната

биология. В метаболизма си аргининът генерира азотен оксид (NO) – всеобщата молекула на сигналната трансдукция. До това откритие NO е бил разпознат като ключов елемент със сигнификантна роля в много „специфични“ събития, водещи до карцином. Независимо от прекалено опростения си биохимизъм, NO има съществена и комплексна роля в туморната биология. Доказано е, че той има „конфликтна“ роля с привидно противоположни ефекти в туморното инициране, промоция и прогресия. Мрежата от биологични ефекти на това химично съединение е балансирано действие, което зависи от множество фактори, вкл. тяхната концентрация, времева експресия, клетъчен ресурс и таргетна клетка.

В допълнение, заобикалящата микросреда влияе сигнификантно на активността на NO чрез нейното въздействие с помощта на кислородните радикали, метални йони и протеини. Така съществуват няколко нива в сложната регулация на аргинининовите производни на NO с множествени „feedback“ връзки, които лимитират неговия основен ефект. Основната цел на този обзор е да представи аргининовия метаболизъм и ролята му в канцерогенезата със специфичен акцент върху влиянието на аргинининовите производни, в частност NO.

Транспорт на аргинина в туморните клетки

Аргининът се образува от различни хранителни източници или се синтезира в бъбрека. Промяната на приетия диети-

чен аргинин може да повлияе на спланхникусовото му превръщане в NO. Циркулиращият L-аргинин преминава през клетъчната мембрана с помощта на специфична натрий-независима катийонна аминокиселинна транспортна система.² При повечето клетки на млекопитаещите, вкл. туморните клетки, активността на аргинин-транспортната система зависи от различни фактори, напр. цитокини (интерферон, тумор-некрозис фактор и др.). Тази система регулира потока от субстрати за аргинин-зависимата биосинтетична верига и така лимитира продукцията му. При възпаление цитокините могат да повишат синтеза на NO от аргинин по независим от наличния субстрат механизъм. Има доказателства, че специфичната транспортна система е локализирана на клетъчната мембрана и селективно „насочва“ аргининовия поток към NO синтез.²¹ Интрацелуларният аргинин може да се метаболизира по много и различни пътища, специфични за различните типове клетки. Доказателствата подсказват, че регулацията им предоставя и други механизми за лимитиране на аргинин-зависимата NO продукция. Напр. изчерпването на аргинина от аргиназата (ензим, катализиращ конверсията на аргинина до орнитин) лимитира наличността на аргинин за продукция на цитостатичния NO. За сметка на това повече аргинин се метаболизира към пролиферативните амини. Тези комплексни и сложни взаимодействия между различните метаболитни пътища на аргинина оказва сериозно влияние върху туморния растеж и биология.

Аргининов метаболизъм и тумори

Някои животински и човешки тумори изискват аргинин за растежа си. За разлика от нормалните клетки, които могат да синтезират аргинин с помощта на специфични ензими, има карциноми при човек (меланом, хепатоцелуларен карцином) без тази способност. Някои изследватели използват тази „неспособност“ на карциномните клетки за оцеляване при разработване на селективна антитуморна терапия. Аргинин-деаминазата (аргинин-метаболизиращ ензим), изолиран от *Mycoplasma*, може да инхибира туморния растеж в клетъчни култури и животински

туморни модели. За съжаление микробната аргинин-деаминаза има висока антигенност и кратък полуживот

По тази причина е необходима висока доза за туморсупресорния ѝ ефект. Фази I/II на клинични проучвания представят резултати за антитуморна активност на аргинин-деаминаза, конюгирана с полиетилен-гликол при пациенти с нерезектабилен хепатоцелуларен карцином. Пациентите с ниско плазмено аргининово ниво понасят добре лечението и може да имат пълен клиничен отговор.⁸ Тези окуражителни начални резултати предстои да бъдат проверени при по-голяма популация пациенти.

В контраст на аргининовата супресия, аргининовата свръхналичност притежава двоен (специфичен и неспецифичен) антитуморен ефект, забавя туморния растеж и удължава преживяемостта при някои животински туморни модели.¹⁷

С оглед дискуссионната роля на аргинин-усилващите хранителни диети при карцином (според локализацията) целта на обзора е да фокусира вниманието за ролята на NO като аргининов дериват при туморната патология.

Канцерогенеза

Асоциацията малигнен процес – хронично възпаление е позната отдавна. Хроничното тъканно възпаление се асоциира с карцином на глава и шия, бял дроб, хранопровод, стомах, дебело черво, черен дроб и кожа. Продължителната експозиция на NO, индуциран от хроничното възпаление, може да провокира канцерогенеза в някои органи.¹¹ Ролята на NO се предполага в патогенезата на улцерозния колит – при някои животински модели инхибирането на NO може да подобри колита. Честотата на карциномна заболяемост може да корелира със степента на хронично възпаление и свръхпродукция на NO. Такива са случаите със спорадичен колоректален карцином и метастази. Аргининовият дериват може да благоприятства туморната прогресия от аденом до карцином на колона, развитието на холангиокарцином и хепатоцелуларен карцином.¹³ Канцерогенният ефект на тази молекула включва различни механизми: директно ДНК и протеиново увреждане или супресия на апоптозата, което промотира абнормен клетъчен растеж.¹⁹ NO може да повлияе

туморния растеж чрез стимулиране на туморната ангиогенеза – пролиферация на ендотелните клетки, васкуларен пермеабилитет и стимулиране на ангиогенните растежни фактори.¹⁵ Аргининовият дериват е въввлечен в канцерогенезата и неспецифичната патология на различни органи – никотин-зависими заболявания, вкл. белодробен карцином, метастатични промени в гърдата⁶ и хранопровода (т.нар. хранопровод на Barrett).²⁰ Пациентите с *Helicobacter* инфекция развиват хроничен гастрит. Персистиращото възпаление в повишена продукция на канцерогенни нитрозамини може да провокира развитието на стомашен карцином.¹⁰ Ултра-виолетовата радиация също индуцира продукция на NO, предизвиква оксидативно увреждане на кожата с риск от поява на два малигнома – меланом и немеланомен кожен карцином.¹

В резултат на всички тези наблюдения изследователите допускат, че NO може да представлява потенциален таргет за хемопревенция.⁷ Малко изследвания проучват този ефект на аргинин-дериватите – инхибиране на чревен и езофагеален карцином при животински модели на плъх и миши аденокарцином.³

Начало на канцерогенезата

Няколко линии от изследването показват, че NO участва в образуването на множество ракови заболявания. Високите нива на NO могат да променят ДНК пряко или косвено, чрез потискане на дейността на ДНК. NO може да предизвика необратима повреда на няколко основни механизма: оксидативно увреждане на ДНК; блокиране синтеза на ДНК чрез инхибиране на рибонуклеотидредуктазата – скорост-лимитиращ ензим в синтеза на ДНК. Наред с това, NO може да доведе до пряко инхибиране на ензимите в митохондриалната верига, електронния транспорт или да реагира непряко чрез намеса в механизмите за възстановяване на ДНК.²²

Прогресия

Данните сочат, че азотните оксиди, плучени от аргинин, могат да повлияят на развитието на установени неоплазми. Солидните тумор винаги се състоят от няколко клетъчни типа, включително ту-

морни клетки, фибробласти, лимфоцити, макрофаги, неутрофили и ендотелни клетки. Всяка една от тези клетъчни линии на новообразуванятия би могла да служи като източник на NO. По време на туморния растеж, NOS активността може да се увеличи в резултат на влиянието на проинфламаторни цитокини и хипоксия от туморната среда.

Високият липофилен характер на NO прави трансцелуларното преминаване лесно като улеснява NO-медираните ефекти между туморните и другите клетки. Всички три NOS изоформи (iNOS, eNOS, nNOS) са открити в туморните клетки, но ролята на всяка от тях за туморната биология е все още непълно разбрана.¹¹ NOS изоформите могат да участват в пролиферацията, миграцията, преживяемостта и инвазивността на туморните клетки. NOS активност е открита в най-различни туморни клетъчни линии и експресията им корелира с туморния стадий и степента на пролиферация.

Някои туморни клетки с експозиция на NO провокират повишена експресия на p53 тумор-супресорния ген. От друга страна, натрупването на p53 протеини подтиска iNOS експресията по автокринна негативна feedback връзка. Освен това, мутация или загуба на p53 тумор-супресорния ген повлиява NO-медираната клетъчна смърт и „предоставя“ селективно предимство за растеж на абнормните клетки.¹⁷

Предвид преобладаването на p53 при неоплазиите, тези NO-медираните промени в онкогенната експресия могат да се явят фундаментални събития за канцерогенезата. Експериментални туморни модели предоставят допълнителни доказателства за ролята на NO в туморния растеж и метастазирание. Освен това, NO продукция от туморни клетки подтиска растежа на клетките *in vitro*, но стимулира туморогенезата и експерименталните белодробни метастази *in vivo*.¹¹ При този модел туморният растеж е засилен *in vivo* чрез NO-независим механизъм. Авторите предполагат, че аргинин-засилените диети стимулират растежа на тумора и метастазирането чрез повишена полиаминна синтеза.

Анонмоза

Програмираната клетъчна смърт е силно регулиран активен процес. Харак-

теризира се с намаляване размерите на клетката, кондензация на хроматина, фрагментация и образуване на апоптични клетъчни телца. NO-медираната апоптоза или програмирана клетъчна смърт е доказана в различни клетъчни типове, включително и в туморните клетки. Няколко проучвания доказват, че NO може директно да предизвика некроза, клетъчна смърт или апоптоза в зависимост от концентрацията на NO равнището и вида на клетките.^{7, 15} Цитокините могат да индуцират ендогенна NO продукция и апоптоза по този механизъм. Като пример трансфекцията с iNOS ген в миши меланомни клетки стимулира туморогенезата и метастатичния потенциал аналогично на NO-медираната апоптоза. Освен това анти-туморната цитокинна токсичност активира макрофагите и ендотелните клетки като отчасти се дължи на NO-медираната апоптоза. Някои клетки са първично устойчиви на този механизъм поради генетичните детерминанти на клетката. Като цяло индукцията на апоптоза изисква висока NO концентрация, докато ниските концентрации може да провокират резистентност към NO-медираната апоптоза. В някои клетъчни линии, NO може да инхибира апоптозата по пътища, зависими от цикличните нуклеотиди APM или GPM. В хепатоцитите NO може да инхибира апоптозата чрез супресия на каспазната активност.^{9, 19}

Ангиогенеза

Неоваскуларизацията или ангиогенезата е абсолютно изискване за туморния растеж. Тъй като NO не е ендогенен вазодилатор, ролята му в микроциркулацията на тумора изглежда интуитивна. Противоречиви данни показват, че NO може да потисне или да стимулира ангиогенезата, в зависимост от концентрацията му и ангиогенния модел.

Той може да повлияе процеса пряко или чрез вторични „посланици“. Голяма част от данните, отнасящи се до ролята на NO в ангиогенезата са резултат на *in vitro* експерименти с донори на NO и неспецифични NOS инхибитори. Тези експерименти са показали, че NO не стимулира развитието на нови съдове чрез васкуларния ендотелен растежен фактор и фибробласт-стимулиращия растежен фактор.¹⁵

NO повлиява разпространението на съдовите ендотелни клетки и гладкомускулните клетки чрез GPM сигналния път. Модулацията на NO с нейното отражение върху туморната микроциркулация и образуването на нови съдове представлява нова анти-туморна стратегия.^{11, 15, 22}

Имунен отговор

NO играе централна роля в имунния отговор. В съответствие с посочените по-горе роли на аргинин-производния NO в карциномни клетъчни линии се оказва, че NO има коренно различна роля в туморния имунитет. Hibbs et al. описват за първи път през 1987 г. ролята на NO за активиране на макрофагеалната цитотоксичност. В резултат на това важно откритие, NO-медираната цитотоксичност на туморни клетки е доказана за различни имунни клетки, включително естествените клетки-убийци, Т-клетките и ендотелните клетки.^{9, 20}

Последните данни показват, че метастатичният капацитет на клетките на човешкия колоректалния карцином корелира с тяхната сензитивност към NO-медираната цитотоксичност на чернодробните синусоидални клетки.¹⁶ NO може също да модулира експресията на клетъчните адхезионни молекули, важни за възпалителния отговор.⁹ Наред с това той влияе цитокините пътища на сигнална трансдукция. Свърхпроизводството на NO е свързано с тумор-индуцирана имunosупресия чрез потискане на имунните пътища за клетъчно активиране. Очевидно е, че след първоначалните данни на Hibbs и сътр., ролята на NO в туморния имунитет се оказва сложен и многостранен процес. Разбирането на неговото значение в имунния отговор към тумори има съществено място за развитие на бъдещите терапевтични концепции.

Метастазирание

Повечето пациенти с карцином умират в резултат на далечни туморни метастази, устойчиви на конвенционалната терапия. Поради това, разбирането на биологията на метастатичната каскада е от съществено значение. Тя включва поредица от взаимно-свързани стъпки. Увеличават се доказателствата в подкрепа на факта, че азотният окис влияе на

метастатичния процес. В представеното по-горе обобщихме ролята на NO в апоптозата, адхезията, инвазията и тумор-супресорния имунен отговор. Известно е, че по-голямата част от циркулиращите туморни клетки умират бързо в кръвообращението. NO съдейства за дисеминацията и преживяемостта на малигнените клетки чрез формиране на комплекси от туморни клетки и тромбоцитни агрегати. Тромбоцитната агрегация може да протектира туморните клетки от клетъчна имунна атака. Меланомна клетъчна линия при мишки с NOS активност показва обратно пропорционална зависимост с метастатичния потенциал. Когато туморните клетки имат генетична трансдукция за свръхекспресия на iNOS, те губят своя туморогенен и метастатичен капацитет.^{11, 15} NO продукция може да представлява нов подход за контролиране на растежа на тумора и метастазите.

Аргинин-производни азотни оксиди и антитуморна терапия

Азотният оксид притежава сигнификантен антинеопластичен потенциал, но неговото клинично приложение е все още лимитирано поради системния хипотензивен ефект, наблюдаван при терапия с NO-освобождаващи медикаменти. Предишни изследвания показват, че NO е отговорен за част от антитуморния ефект на конвенционалната химиотерапия. В клетъчни култури от миши аденокарцином на млечната жлеза Adriamycin стимулира продукцията на NO. Adriamycin-туморната клетъчна цитотоксичност е NO-независима *in vivo*, но частично зависима в сингенен миши туморен модел.¹²

NO може да повиши ефективността на лъчетерапията. Той е силен радиосенсибилизатор в хипоксичните клетки и във висока концентрация засилва апоптозата. Изследователи установяват, че свръхекспресията на iNOS повишава радио-индуцираната апоптоза при

клетки на колоректален карцином.⁴ За съжаление много карциноми са лъче- и химиорезистентни.

Ето защо е така засилен интереса за идентифициране на биологичните маркери-предиктори на терапевтичния отговор. Целта е развитие на биологично-базирани методи за преодоляване на химиорезистентността. NO може да повлияе антитуморната активност на определени химиотерапевтични агенти като Adriamycin⁵ и Gemcitabine.¹⁴ В животински модели претретирането с агенти, освобождаващи NO може да сенсibiliзира туморните клетки към Cisplatin.¹⁸

Безспорно по-доброто разбиране на прецизната роля на NO при карциноми ще задълбочи познанието за терапевтичната стратегия и може да предопредели нови антинеопластични стратегии.

Заклучение

Аргининът има многостранна роля в клетъчния метаболизъм, която може да повлияе многостепенния процес на канцерогенеза. Аргининовите производни като NO имат много припокриващи се и противоречиви регулаторни функции в туморното инициране, еволюция и метастазирание. Аргининовата свръхналичност притежава двоен (специфичен и неспецифичен) антитуморен ефект, забавя туморния растеж и удължава преживяемостта при някои животински туморни модели. Противоречиви данни показват, че NO може да потисне или да стимулира ангиогенезата, в зависимост от концентрацията му и ангиогенния модел.

Бъдещите изследвания за механизмите на въздействие ще бъдат полезни при разработване на биологично-базирани антинеопластични стратегии, с таргет към аргининовите метаболитни пътища.

Ключови думи

1. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease – a review. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:643–51.
2. Cendan J, Souba W, Copeland E, Lind D. Characterization and growth factor stimulation of L-arginine transport in a human colon cancer cell

- line. *Ann Surg Oncol* 1995; 2:257–65.
3. Chen T, Nines R, Peschke S et al. Chemopreventive effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on carcinogen-induced rat esophageal tumorigenesis. *Cancer Res* 2004; 64:3714–24.
4. Chung P, Cook T, Liu K, et al. Overexpression of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances radiation-induced apoptosis in colorectal cancer cells via a caspase-dependent mechanism. *Nitric Oxide* 2003; 8:119–26.
5. Evig C, Kelley E, Weydert C, et al. Endogenous production and exogenous exposure to nitric oxide augment doxorubicin cytotoxicity for breast cancer cells but not cardiac myoblasts. *Nitric Oxide* 2004; 10:119–29.
6. Gatti G., Simsek S, Zurrada S, et al. Possible role of nitric oxide in the biology of breast carcinoma: review of the available literature. *Breast* 2004; 13:1–6.
7. Hofseth L, Hussain S, Wogan G, et al. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:955–68.
8. Izzo F, Marra P, Beneduce G, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol* 2004; 22:1815–22.
9. Kevil C, Orr A, Langston W, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:19230–8.
10. Kim J, Kim J, Jung H, et al. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells: possible role of interferon-gamma in polarized nitric oxide secretion. *Helicobacter* 2002; 7:116–28.
11. Lala P, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *The Lancet (Oncology)* 2001; 2:149–56.
12. Lind D, Kontaridis M, Edwards P, et al. Nitric oxide contributes to adriamycin's antitumor effect. *J Surg Res* 1997; 69:283–7.
13. Majano P, Garcia-Monzon C. Does nitric oxide play a pathogenic role in hepatitis C virus infection? *Cell Death Differ* 2003; 10 (Suppl. 1): S13–S15.
14. Meli M, Tolomeo M, D'Alessandro N, et al. Resistance to gemcitabine in a lymphoma cell line resistant to Fas-mediated apoptosis. *Anticancer Res* 2004; 24:851–7.
15. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004; 117:155–67.
16. Ozawa S, Lu W, Bucana C, et al. Regression of primary murine colon cancer and occult liver metastasis by intraliesional injection of lyophilized preparation of insect cells producing murine interferon-beta. *Int J Oncol* 2003; 22:977–84.
17. Stechmiller J, Childress B, Porter T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. *Am J Crit Care* 2004; 13:17–23.
18. Tang C, Grimm E. Depletion of endogenous nitric oxide enhances cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. *J Biol Chem* 2004; 279:288–98.
19. Torok N, Higuchi H, Bronk S, et al. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res* 2002; 62:1648–53.
20. Van Der Woude C, Kleibeuker J, Jansen P, et al. Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis* 2004; 9:123–30.
21. Verrey F, Closs E., Wagner C, et al. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch* 2004; 447:532–42.
22. Xu W, Liu L, Loizidou M, et al. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 2002; 12:311–20.