

Received: 2006.02.03
Accepted: 2006.07.27
Published: 2006.09.07

Arginina – podstawowy aminokwas w procesie nowotworzenia

Arginine as a crucial amino acid in carcinogenesis and tumor growth

Wojciech Graboń

Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Arginina, aminokwas zasadowy, bierze udział w wielu przemianach metabolicznych w organizmie człowieka. Jest substratem nie tylko do syntezy białek komórkowych, lecz także ornityny, poliamin, tlenku azotu, proliny, kwasu glutaminowego, glutaminy, kreatyny i dimetyloargininy. Arginina jest aminokwasem niezbędnym w fazie wzrostu organizmu (u dzieci), zaś u osób dorosłych w niektórych stanach patologicznych oraz w fazie powrotu do zdrowia po chorobach przebiegających z nasilonym katabolizmem. Ostatnio wzrasta zainteresowanie rolą argininy w nowotworach, ponieważ aminokwas ten okazał się absolutnie niezbędny do wzrostu komórek nowotworowych. Odgrywa on główną rolę w szlakach metabolicznych mających istotne znaczenie w procesie nowotworzenia i biologii nowotworów. Obejmują one syntezę poliamin i tlenku azotu, które w organizmie człowieka powstają wyłącznie z argininy. Obserwacje te doprowadziły do przeprowadzenia pierwszych badań klinicznych dotyczących wpływu braku argininy na nowotwory auktroficzne względem tego aminokwasu (nieposiadające zdolności jego syntezy). Artykuł poświęcony jest przede wszystkim przedstawieniu wyników najnowszych badań dotyczących argininy w nowotworach, w tym roli tego aminokwasu w głównych procesach związanych z nowotworzeniem, takich jak apoptoza i angiogeneza.

Słowa kluczowe:

arginina • arginaza • tlenek azotu • metyloargininy • nowotworzenie • apoptoza • angiogeneza

Summary

Arginine, a cationic semi-essential amino acid, is involved in numerous pathways of human metabolism. It serves as a precursor for the biosynthesis of proteins and also of ornithine, polyamines, nitric oxide, proline, glutamate, glutamine, creatine, agmatine and dimethylarginines. Arginine is conditionally essential amino acid as it is necessary under phase of growth (in children) and in adults under some pathological conditions, as well as during recovery after catabolic diseases. There is a growing interest in the role of arginine in cancerogenesis, since this amino acid has turned out to be absolutely essential for growth of neoplastic cells. It also plays a crucial role in biosynthetic pathways that significantly influence carcinogenesis and tumor biology. They include synthesis of polyamines and nitric oxide, important molecules, which may be synthesized solely from arginine. These findings have resulted in first clinical trials on arginine deprivation in therapy of some arginine-dependent (auxotrophic) tumors. The present article is focused on recently recognised role of arginine in tumor development, including processes associated with carcinogenesis, such as apoptosis and angiogenesis.

Key words:

arginine • arginase • nitric oxide • polyamines • methylarginines • carcinogenesis • tumor growth • angiogenesis • apoptosis

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9634.pdf

Word count: 2835

Tables: –

Figures: 3

References: 61

Adres autora: lek. Wojciech Graboń, Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa;
e-mail: wojtekgrabon@interia.pl

Wykaz skrótów: **ADMA** – asymetryczna dimetyloarginina; **ASL** – liaza argininobursztynianowa; **ASS** – syntetaza argininobursztynianowa; **DDAH** – dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininy; **DFMO** – difluorometyloornityna; **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu; **NO** – tlenek azotu; **eNOS** – izoforma śródbłonkowa syntazy tlenku azotu; **iNOS** – izoforma indukowana syntazy tlenku azotu; **nNOS** – izoforma neuronalna syntazy tlenku azotu; **NOHA** – omega-hydroksy-L-arginina; **ODC** – dekarboksylaza ornitynowa; **TGF-α** – czynnik martwicy nowotworów alfa; **VEGF** – naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu.

Arginina jest obecnie klasyfikowana jako aminokwas niezbędny do prawidłowego wzrostu i rozwoju dzieci, oraz aminokwas „czynnościowo niezbędny” dorosłym, u których endogenna synteza pokrywa zapotrzebowanie zdrowego organizmu, natomiast jest niewystarczająca w stanach chorobowych (choroby przebiegające z nasilonym katabolizmem, urazy, oparzenia). Z tego powodu głównym źródłem argininy dla organizmu człowieka jest dieta. Aminokwas ten uczestniczy w wielu ważnych, znanych od wielu lat oraz odkrytych niedawno procesach fizjologicznych i metabolicznych. Najbardziej znany jest udział argininy w cyklu mocznikowym. Jest ona również substratem w syntezie wielu ważnych biologicznie związków. Należą do nich ornityna, prolina, kwas glutaminowy, glutamina, poliaminy, tlenek azotu, kreatyna, agmatyna i dimetyloargininy. Wykazano jej istotny wpływ na układ immunologiczny oraz wydzielanie hormonów, jednak wydaje się, że to ostatnie działanie występuje jedynie przy dużych niefizjologicznych stężeniach aminokwasu.

Celem opracowania jest przedstawienie roli argininy w procesach powstawania i rozwoju nowotworów, roli, która bardzo zyskała na znaczeniu w świetle odkryć dokonanych w ciągu ostatnich lat, w tym dotyczących praktycznego zastosowania uzyskanej wiedzy w diagnostyce i leczeniu.

ZDOLNOŚĆ SYNTETY ARGININY PRZEZ KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Większość komórek organizmu człowieka może syntetyzować argininę z cytruliny dzięki aktywności dwóch enzymów cyklu mocznikowego – syntetazy argininobursztynianowej (ASS) oraz liazy argininobursztynianowej (ASL). Syntetaza argininobursztynianowa katalizuje przekształcenie cytruliny i kwasu asparaginowego do argininobursztynianu, który jest następnie rozszczepiany przez liazę argininobursztynianową do argininy i fumaranu. Cytrulina służąca do wewnątrzkomórkowej syntezy argininy musi pochodzić z krwi, gdyż cytrulina syntetyzowana w komórce powstaje z argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę NO (cykl arginina-cytrulina-NO).

Badania zależności wzrostu i proliferacji komórek *in vitro* wykazały, że komórki prawidłowe odpowiadają na usunięcie

argininy ze środowiska zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1 (G0) [34,43]. Większość tych komórek wykazuje zdolność wzrostu i proliferacji po ponownym dodaniu argininy do hodowli. Natomiast komórki nowotworowe hodowane w tych samych warunkach, giną po pozabawieniu ich argininy [54]. Świadczy to o tym, że brak samej argininy jest krytyczny dla przeżycia komórek nowotworowych, gdyż podawanie ornityny lub poliamin (produktów przemian argininy) nie dawało takiego efektu, podobnie jak pozabawienie ich leucyny – aminokwasu egzogenne. Ponadto komórki proliferujące wymagały wyższych stężeń argininy niż leucyny *in vitro* [3,34].

Podawanie cytruliny zamiast argininy do hodowli pozwoliło na wyodrębnienie linii komórek nowotworowych, które nie są zdolne do syntezy argininy z cytruliny [53]. Prawidłowe komórki są zwykle zdolne do wzrostu w środowisku pozbawionym argininy, a zawierającym cytrulinę, podczas gdy komórki nowotworowe wymagają do swojego wzrostu argininy i nie mogą wykorzystywać cytruliny jako prekursora tego aminokwasu. Doprowadziło to do wyodrębnienia nowotworów auktroficznych dla argininy, a enzymem, którego aktywność ma ważne znaczenie w zjawisku auktrofizmu jest syntetaza argininobursztynianowa. Aktywność tego enzymu wykazuje dodatnią korelację ze zdolnością komórek do proliferacji po usunięciu argininy ze środowiska. Brak aktywności ASS stwierdzono w komórkach takich nowotworów człowieka jak czerniak, rak wątrobowokomórkowy oraz gruczolakorak prostaty [10,11]. Na uwagę zasługuje brak aktywności ASS w dwóch ostatnich nowotworach: w raku wątrobowokomórkowym wywodzącym się z hepatocytów, w których ASS jest bardzo aktywna jako enzym cyklu mocznikowego, zaś w raku gruczolowym prostaty jako jednego z enzymów szlaku syntezy argininy – substratu do biosyntezy poliamin wydzielanych do płynu nasiennego.

Powyższe badania *in vitro* stały się podstawą wykorzystania zjawiska auktrofizmu względem argininy w leczeniu pacjentów z tymi nowotworami. W celu obniżenia stężenia argininy w surowicy krwi, jedyne źródła zaopatrzenia komórek nowotworowych, są stosowane te same enzymy rozkładające argininę, co w hodowlach komórkowych. Początkowe badania prowadzono z użyciem arginazy, następnie zastosowano

niewystępującą w komórkach ludzkich deiminazę argininy – enzym pochodzący z drobnoustroju *Mycoplasma arginini*, uzyskiwany metodą rekombinacji genetycznej. Zasadniczą trudność w leczniczym stosowaniu tych enzymów jest ich szybka degradacja w organizmie oraz możliwość wywołania reakcji uczuleniowych. W celu zapobieżenia rozkładowi stosuje się sprzęganie enzymu ze związkami o dużej masie cząsteczkowej, np. glikolem polietylenowym [9].

Dotychczas deiminazę argininy zastosowano u chorych z rakiem wątroby oraz czerniakiem. W badaniu klinicznym fazy I/II obejmującym 19 chorych z pierwotnym rakiem wątroby, u dwóch uzyskano pełną odpowiedź na leczenie (całkowity zanik guza potwierdzony w badaniach obrazowych), u pozostałych częściową odpowiedź lub stabilizację procesu chorobowego [20]. W analogicznym badaniu obejmującym 24 chorych z czerniakiem uzyskano odpowiedź na leczenie u 25% badanych (pełną u jednego, częściową u 5 chorych) [1].

Inną zastosowaną metodą leczniczą prowadzącą do remisji pierwotnego raka wątroby jest embolizacja gałęzi tętnicy wątrobowej powodująca uwolnienie dużych ilości arginazy i obniżenie stężenia argininy we krwi [7]. Brak działań niepożądanych leczenia, takich jak nadciśnienie płucne lub wzrost stężenia amoniaku można tłumaczyć zdolnością prawidłowych komórek organizmu do wystarczającej resyntezy argininy z cytruliny.

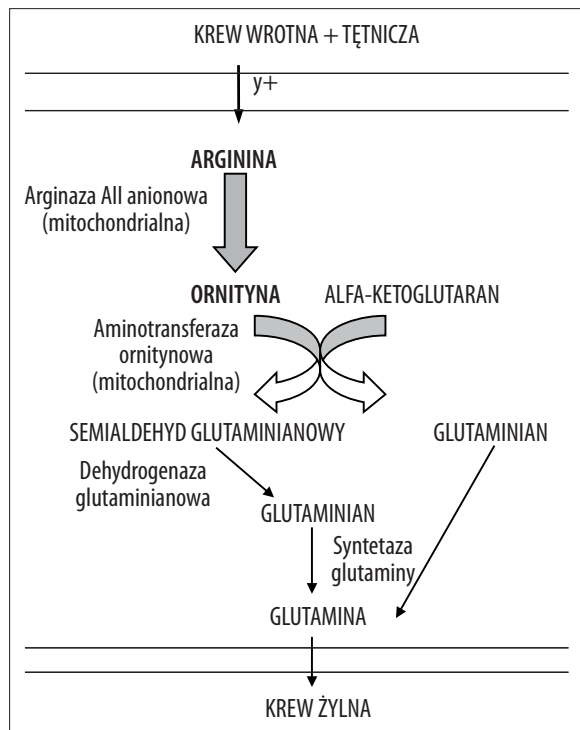
Metoda stosowania enzymów rozkładających argininę może być skuteczna w leczeniu nowotworów, które są niezdolne do syntezy tego aminokwasu, gdyż enzymy te powodują śmierć lub zatrzymanie proliferacji komórek nowotworowych. Może być także stosowana w połączeniu z chemioterapią, gdyż zwiększa podatność komórek nowotworowych na działanie cytostatyków.

TRANSPORT ARGININY W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Transport związków chemicznych i jonów odgrywa bardzo ważną rolę we wzroście, proliferacji i metabolizmie komórek nowotworowych. Dotyczy to także aminokwasów jako składników budulcowych komórki oraz substratów do syntezy innych związków uczestniczących w wyżej wymienionych procesach.

Oprócz syntezy wewnątrzkomórkowej, arginina może być uzyskiwana przez komórki nowotworowe z krwi. Krążąca arginina, pochodząca z pożywienia oraz syntezy ogólnoustrojowej przebiegającej w nerkach, przechodzi do wnętrza komórki dzięki swoistym przez błonowym transportom regulującym dostępność aminokwasu. W większości komórek zwierzęcych, transport argininy oraz innych aminokwasów zasadowych odbywa się głównie za pośrednictwem układu transportowego y^+ niezależnego od jonów Na^+ . Stwierdzono ukierunkowaną syntezę NO z transportowanej argininy w wyniku bezpośredniego kontaktu białka transportującego z syntazą NO. Zjawisko to znane jako „paradoks argininy” dotyczy postaci eNOS występującej w śródbłonku naczyń, ale także iNOS, najczęściej występującej izoformy w komórkach nowotworowych [27,58].

Wychwyt argininy z osocza stanowi zatem jeden z mechanizmów regulacji dostępności tego aminokwasu dla komórek nowotworowych jako składnika białek, w tym tak waż-

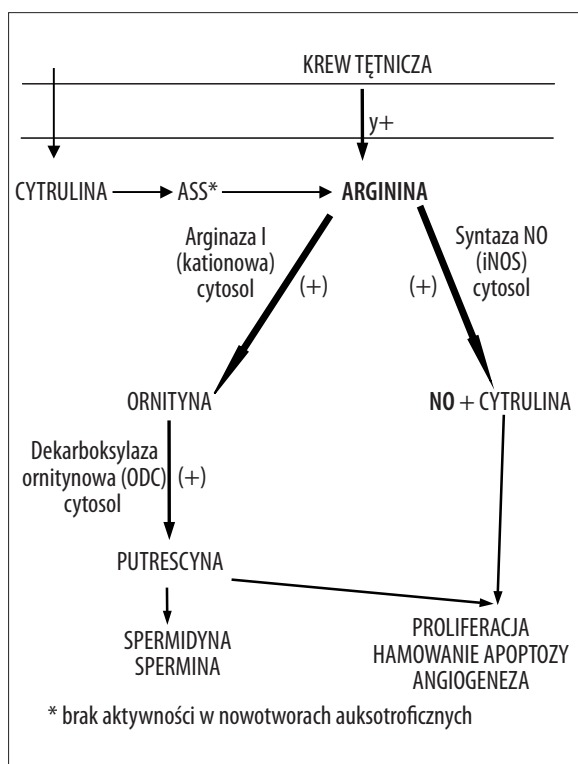


Ryc.1. Metabolizm argininy w hepatocytach okołotętniczych

nych dla podziału komórki, jak histony, a także substratu do syntezy poliamin i tlenu azotu.

Zwiększony transport argininy przez układ y^+ stwierdzono w nowotworze pierwotnym jelita grubego oraz jego przerzutach do wątroby, mimo iż linie komórkowe raka jelita grubego są zdolne do syntezy argininy z cytruliny [5,6,20,44]. W nowotworze pierwotnym jelita grubego transport argininy jest stymulowany przez EGF i TGF-alfa, dwa czynniki wzrostowe mające bardzo istotny wpływ na wzrost komórek nowotworowych [17]. Jedną z metod leczenia raka jelita grubego polega na blokowaniu działania EGF przez lek (cetuksymab, IMC-C225), będący przeciwciałem monoklonalnym przeciw receptorowi EGF.

Wychwyt z osocza stanowi jedyną drogę uzyskiwania argininy przez nowotwory auksotroficzne. W raku pierwotnym wątroby człowieka występuje adaptacyjna regulacja transportu aminokwasów, w tym argininy, zależna od dostępności tych związków dla komórek nowotworowych [52]. U szczura, prawidłowe komórki wątrobowe nie wykazują żadnej aktywności układu y^+ , natomiast w hepatocytach po transformacji nowotworowej występuje znaczny wzrost jego aktywności [55]. Pojawienie się aktywnego układu transportowego y^+ może zatem stanowić krytyczny etap w transformacji prawidłowych hepatocytów w komórki nowotworowe. Natomiast dane uzyskane w badaniach profilu enzymatycznego pierwotnego raka wątroby człowieka, tj. całkowity brak aktywności enzymu cyklu mocznikowego – syntetazy argininobursztynianowej, obecność mitochondrialnej arginazy AII oraz zwiększona ekspresja mRNA aminotransferazy ornitynowej i syntetazy glutaminy wskazują, iż komórki raka wątrobowokomórkowego mogą wywodzić się z subpopulacji hepatocytów okołotętniczych, które mają wyżej opisany profil enzymatyczny oraz aktywny układ transportowy argininy (ryc.1) [2,15,32].



Ryc.2. Metabolizm argininy w komórkach nowotworowych

ARGINAZA I SYNTAZA TLENKU AZOTU – DWA GŁÓWNE ENZYMY METABOLIZMU ARGININY W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Arginina jest substratem do syntezy wielu ważnych biologicznie związków. Należą do nich ornityna, prolina, kwas glutaminowy, glutamina, poliaminy, tlenek azotu, kreatyna, agmatyna i dimetyloargininy. Spośród tych związków, szczególnie znaczenie w procesach związanych z powstawaniem i rozwojem nowotworów mają poliaminy i tlenek azotu.

Tlenek azotu powstaje bezpośrednio z argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (NOS). Jest to związek o krótkim półokresie trwania, aby więc mógł on oddziaływać na komórkę nowotworową, musi powstawać w niej samej lub w jej bezpośrednim otoczeniu.

Poliaminy są końcowymi produktami szlaku, w którym ornityna powstająca z argininy w reakcji katalizowanej przez arginazę ulega dekarboksylacji pod wpływem dekarboksylazy ornitynowej (ODC). Komórki nowotworowe mogą uzyskiwać te związki przez pełną wewnątrzkomórkową syntezę z argininy (arginaza i ODC) oraz pobieranie ornityny i/lub poliamin z krwi lub otoczenia komórki. Jednak substratem do syntezy ornityny i poliamin pobieranych z krwi musi być arginina. Wynika to z następujących faktów:

- ornityna jest aminokwasem niebiałkowym i nie może pochodzić z pożywienia, a zawartość poliamin w pożywieniu jest niewielka i nie pokrywa zapotrzebowania organizmu na te związki,
- źródłem ornityny i argininy we krwi nie jest cykl mocznikowy w wątrobie, gdyż już w 1975 roku Felig wykazał, że wychwyt trzewny argininy i ornityny (różnica tę-

nico-żylna) u człowieka jest dodatni, a zatem wątroba jest importem, a nie eksportem tych aminokwasów [12].

Ornityna oraz poliaminy znajdujące się we krwi pochodzą z przemian wewnątrzkomórkowych (reakcji katalizowanych odpowiednio przez arginazę i amidynotransferazę glicynową oraz dekarboksylazę ornitynową i syntazy spermidyny i sperminy), zaś arginina z pożywienia oraz z glutaminy (oś jelitowo-nerkowa) [56]. Tak więc arginina stanowi jedyny substrat do syntezy tlenku azotu i poliamin, gdyż dekarboksylaza ornitynowa może wykorzystywać jedynie ornitynę wytworzoną uprzednio przez arginazę.

IZOFORMY ARGINAZY I SYNTAZY TLENKU AZOTU W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Arginaza jako jedyny z enzymów cyklu mocznikowego ma dwa geny, gen *AI* kodujący arginazę I (kationową), enzym cytosolowy wykazujący najwyższą aktywność w wątrobie, jednak występujący także w innych tkankach ssaków oraz gen *AII* – kodujący arginazę mitochondrialną (anionową), także występującą w wielu tkankach, w tym i w wątrobie [15,60]. Z tego powodu stosowany jeszcze podział na arginazę wątrobową (AI) i pozawątrobową – nerkową (AII) stracił praktycznie na aktualności, gdyż w większości tkanek występują obie izoformy, a ich ekspresja ulega zmianie w zależności od stanu czynnościowego i potrzeb metabolicznych tych tkanek [4].

Aktywność arginazy wzrasta w różnych typach nowotworów, co świadczy o ważnej roli tego enzymu w biologii komórki nowotworowej [14,16,37,38]. Stwarza to także możliwość wykorzystania arginazy w rozpoznaniu choroby, monitorowaniu jej przebiegu oraz leczeniu. Na temat ekspresji izoform arginazy w komórkach nowotworowych wiadomo mniej, a uzyskane do tej pory wyniki są niejednoznaczne.

W raku pierwotnym jelita grubego stwierdzono występowanie dwóch izoform arginazy, głównej „kationowej”, różniącej się jednak swoją budową od arginazy AI z wątroby oraz w mniejszej ilości „anionowej”, identycznej z arginazą AII z nerki. Aktywność oraz zawartość białka arginazy „kationowej” w tkance nowotworowej były znacznie większe w porównaniu z prawidłową błoną śluzową jelita grubego [39]. Potwierdzeniem tych wyników jest wykazanie zwiększonej ilości arginazy w cytoplazmie komórek nowotworu jelita grubego metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciał przeciw arginazie AI [29]. Cytoplazmatyczna lokalizacja arginazy została także stwierdzona w nowotworze żołądka [57]. Interesujące są rozbieżności powyższych danych z wynikami badań ekspresji mRNA, gdyż w prawidłowej błonie śluzowej jelita grubego oraz żołądka nie stwierdzono ekspresji mRNA arginazy I [15]. Podobny wzorzec zmian aktywności i zawartości arginazy obserwowano w nowotworach sutka, gdzie główną postacią w tkance nowotworowej stanowiła arginaza „kationowa”, różniąca się jednak od arginazy AI z wątroby człowieka [36]. Może to świadczyć o pojawianiu się zwiększonej ekspresji mRNA arginazy I w komórkach nowotworowych w celu zwiększenia wydajności układu enzymatycznego arginaza I – dekarboksylaza ornitynowa (oba enzymy występują w cytoplazmie) w syntezie poliamin. Różnice między arginazą cytosolową występującą w tkankach nowotworowych a ar-

ginazą I z wątroby mogą z kolei wynikać z innej obróbki potranskrypcyjnej lub potranslacyjnej, co się już sugeruje w przypadku różnic pomiędzy arginazą I z wątroby i arginazą z erytrocytów człowieka [19].

W tkankach nowotworowych stwierdzono występowanie wszystkich trzech izoform syntazy tlenu azotu (iNOS, eNOS, nNOS). Najczęściej występującą formę stanowi cytoplazmatyczna iNOS, a ekspresja tej izoformy koreluje ze stopniem złośliwości i proliferacji nowotworu sutka u człowieka [30,38]. Zwiększona ekspresja mRNA iNOS w porównaniu z tkanką prawidłową występuje w nowotworze pierwotnym prostaty oraz jelita grubego [21,22]. Istnieją natomiast różnice w ekspresji i aktywności iNOS w łagodnych nowotworach tych narządów, gdyż gruczolak jelita grubego wykazuje podwyższoną aktywność iNOS, podczas gdy w gruczolaku prostaty nie stwierdzono zwiększonej ilości białka tej izoformy NOS [26,51].

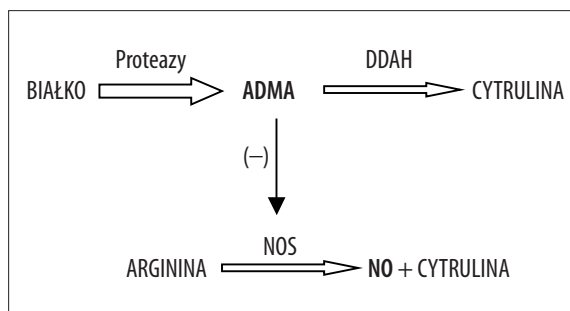
DIMETYLOAMINOHYDROLAZA DIMETYLOARGININY – NOWY ENZYM METABOLIZMU ARGININY I JEGO ZNACZENIE W NOWOTWORACH

Arginina może być także substratem do syntezy metyloarginin. Reakcja polega na metylacji grupy guanidynowej aminokwasu i jest potranslacyjną modyfikacją argininy znajdującej się w białku. Reakcję katalizują enzymy z rodziny N-metylotransferaz argininy (PRMT), a dawką grupy metylowej jest S-adenozylometionina. W wyniku przemian powstają trzy metyloargininy: N^G-monometylo-L-arginina (NMMA), po kolejnej metylacji N^GN^G-dimetylo-L-arginina (asymetryczna dimetyloarginina – ADMA) oraz N^GN^G-dimetylo-L-arginina (symetryczna dimetyloarginina – SDMA) [13]. Po hydrolizie białka, wolne NMMA i ADMA mogą być rozkładane przez dimetyloaminohydrolazę dimetyloargininy (DDAH), enzym katalizujący rozszczepienie wiązania C-H w metylowanej grupie guanidynowej z utworzeniem cytruliny oraz odpowiedniej metyloaminy [33]. DDAH ma dwie izoformy występujące w wielu tkankach organizmu, a rosnące znaczenie tego enzymu, którego obecność stwierdzono także w nowotworach, dotyczy jego związku z regulacją syntezy tlenu azotu [28]. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) jest bowiem inhibitorem syntazy tlenu azotu, a zatem aktywność DDAH wpływa na wzrost syntezy NO (ryc. 3). Zależność taką wykazano w komórkach glejaka, w których uzyskano genetycznie nadekspresję izoformy I DDAH, co prowadziło do zwiększonej syntezy NO, szybszego wzrostu nowotworu, ekspresji i wydzielania VEGF oraz stymulacji angiogenezy [23]. Wzmoczone tworzenie nowych naczyń krwionośnych zostało potwierdzone przez tych autorów *in vivo* w badaniu obrazowym metodą rezonansu magnetycznego [24]. Nadekspresja DDAH powodowała także większe niedotlenowanie (hipoksję) w obrębie guza nowotworowego, co jak wiadomo, jest jednym z zasadniczych czynników pobudzających angiogenezę [25].

Badania dotyczące DDAH dopiero się rozpoczęły, jednak uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę tego enzymu w powstawaniu i rozwoju nowotworów.

APOPTOZA

Apoptoza (programowana śmierć komórki) stanowi ściśle regulowany proces polegający na zmniejszaniu objętości i frag-



Ryc.3. Wpływ asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) na syntezę tlenu azotu

mentacji komórki, kondensacji chromatyny oraz powstawaniu ciała apoptotycznych. Utrata zdolności apoptozy przez komórki nowotworowe stanowi jeden z podstawowych elementów umożliwiający im przeżycie i niekontrolowane podziały.

Wpływ tlenu azotu na proces apoptozy jest złożony i zależy od typu nowotworu. Stwierdzono, że endogenne tlenki azotu hamuje apoptozę komórek czerniaka ludzkiego przez potranslacyjną modyfikację białek regulatorowych [41]. W niektórych liniach komórkowych NO hamuje apoptozę poprzez szlaki metaboliczne zależne od cGMP oraz cAMP. Hamowanie apoptozy w hepatocytach odbywa się przez hamowanie aktywności kaspazy, jednak nie ma doniesień dotyczących takiego działania tego enzymu w komórkach nowotworowych [50]. Natomiast transfekcja genu iNOS do komórek czerniaka myszy powodowała zahamowanie rozwoju nowotworu oraz zanik zdolności do tworzenia przerzutów wskutek apoptozy wywołanej przez NO [59]. Na ogół indukcja apoptozy wymaga dużego stężenia NO, zaś w małych, fizjologicznych stężeniach, związek ten hamuje programowaną śmierć komórki [30].

Arginina, ornityna oraz poliaminy również odgrywają ważną rolę w procesie apoptozy. Stwierdzono, że omega-hydroksy-L-arginina (NOHA), inhibitor arginazy, aktywuje kaspazę 3 oraz apoptozę w linii MDA-MB-468 komórek raka gruczołu sutkowego człowieka. Towarzyszyło temu znaczne zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu poliamin. Natomiast użycie alfa-difluorometyloornityny (DFMO) – inhibitora dekarboksylazy ornitynowej oraz SAM-486 A – inhibitora dekarboksylazy S-adenozylometioninowej, dwóch enzymów uczestniczących bezpośrednio w biosyntezie poliamin, prowadziło do zahamowania proliferacji komórek, lecz nie do aktywacji kaspazy i apoptozy [46]. Świadczy to o tym, że apoptoza nie jest hamowana wyłącznie przez wysoki poziom poliamin, lecz że uczestniczą w tym arginina i ornityna. W innym badaniu przeprowadzonym przez ten sam zespół stwierdzono, że dodanie ornityny hamuje indukowane przez NOHA uwalnianie cytochromu c, wzrost aktywności kaspazy 8 i apoptozę w komórkach linii MDA-MB-468 [47]. DFMO indukowała także apoptozę w komórkach nowotworu żołądka człowieka, a nowo opracowane analogi poliamin w komórkach nowotworu sutka oraz prostaty człowieka [18,42,48].

ANGIOGENEZA

Angiogeneza, czyli powstawanie nowych naczyń krwionośnych jest bezwzględnie konieczna do wzrostu nowotwo-

ru. Tlenek azotu może pobudzać wzrost nowotworu oraz sprzyjać tworzeniu przerzutów przez udział w powstawaniu naczyń krwionośnych zaopatrujących tkankę nowotworową. Bierze on udział w kilku etapach angiogenezy, takich jak proliferacja śródbłonna naczyń krwionośnych, wzrost przepływu krwi poprzez stałe rozszerzenie nowo powstałych naczyń (cecha charakterystyczna układu naczyniowego nowotworu), hamowanie agregacji płytek krwi oraz pobudzanie wytwarzania czynników wzrostowych angiogenezy (VEGF i bFGF) [33,61]. Istnieje korelacja między nadekspresją iNOS, VEGF i angiogenezą w raku pierwotnym jelita grubego człowieka [8]. Ekspresja mRNA iNOS znacznie wzrastała w tkance nowotworowej w porównaniu z prawidłową błoną śluzową jelita grubego. Także w raku gruczołu krokowego człowieka ekspresja mRNA oraz aktywność iNOS są większe niż w prawidłowej tkance gruczołowej prostaty [51]. Zwiększoną ekspresję iNOS wykazano w nowotworze gruczołu sutkowego, a skutki działania tlenu azotu zostały wykorzystane w nowej metodzie rozpoznawania tego nowotworu (dynamic area telethermometry), będącej ulepszoną termografią. Metoda ta opiera się na pomiarze zmian temperatury skóry w krótkim czasie (10–20 s) i wykrywaniu zmniejszonej modulacji temperatury guza w porównaniu z tkankami otaczającymi, spowodowanej patologicznym unaczynieniem i większym przepływem krwi przez tkankę nowotworową [31].

Również poliaminy uczestniczą w angiogenezie indukowanej przez guzy nowotworowe. Stwierdzono zmniejszenie angiogenezy w komórkach raka żołądka człowieka przez zahamowanie syntezy putrescyny przez DFMO, co przejawiało się mniejszą gęstością sieci nowo utworzonych naczyń krwionośnych guza i większą martwicą komórek nowotwo-

rowych *in vivo* [48]. DFMO hamowała również angiogenezę indukowaną przez linię komórek czerniaka. Hamowanie to było odwracalne po podaniu putrescyny i spermidyny. Stwierdzono, że mechanizm działania DFMO polegał na hamowaniu proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego i powstawaniu nowych naczyń krwionośnych [49]. Wskazuje to, że nasilona synteza ornityny i poliamin w guzie nowotworowym służy nie tylko proliferacji samych komórek nowotworowych, lecz także sprzyja procesowi powstawania nowych naczyń krwionośnych.

PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań metabolizmu argininy w komórkach nowotworowych, niekiedy sprzeczne i niejednoznaczne, wskazują na istotną rolę tego aminokwasu w wieloetapowym procesie powstawania i rozwoju nowotworu. Niezbędność argininy dla komórek nowotworowych jako substratu do syntezy tlenu azotu oraz poliamin, wzrost aktywności enzymów związanych z jej metabolizmem (arginazy, dekarboksylazy ornitynowej, syntazy tlenu azotu), obserwowany w niemal wszystkich typach nowotworów, jak również brak zdolności syntezy argininy przez niektóre typy nowotworów człowieka stwarzają pole do interwencji terapeutycznych polegających na celowym zaburzaniu metabolizmu komórki nowotworowej. Takie działanie stanowi nową strategię w leczeniu nowotworów, której skuteczność może dodatkowo wzrastać w połączeniu z radioterapią i/lub chemioterapią. Innym zagadnieniem zasługującym na osobne opracowanie jest udział argininy w czynności układu immunologicznego u pacjentów z chorobą nowotworową oraz suplementacja diety tym aminokwasem w zależności od typu nowotworu oraz stosowanego leczenia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ascierto P.A., Scala S., Castello G., Daponte A., Simeone E., Ottaiano A., Beneduce G., De Rosa V., Izzo F., Melucci M.T., Ensor C.M., Prestayko A.W., Holsberg F.W., Bomalaski J.S., Clark M.A., Savaraj N., Feun L.G., Logan T.F.: Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 7660–7668
- [2] Cadoret A., Ovejero C., Terris B., Souil E., Levy L., Lamers W.H., Kitajewski J., Kahn A., Perret C.: New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene*, 2002; 21: 8293–8301
- [3] Caso G., McNurlan M.A., McMillan N.D., Eremin O., Garlick P.J.: Tumour cell growth in culture: dependence on arginine. *Clin. Sci.*, 2004; 107: 371–379
- [4] Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P., Iyer R.K.: Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol. Genet. Metab.*, 2004; 81(Suppl.1): S38–S44
- [5] Cendan J.C., Souba W.W., Copeland E.M. 3rd, Lind D.S.: Characterization and growth factor stimulation of L-arginine transport in a human colon cancer cell line. *Ann. Surg. Oncol.*, 1995; 2: 257–265
- [6] Cendan J.C., Souba W.W., Copeland E.M. III, Lind D.S.: Increased L-arginine transport in a nitric oxide-producing metastatic colon cancer cell line. *Ann. Surg. Oncol.*, 1996; 3: 501–508
- [7] Cheng P.N., Leung Y.C., Lo W.H., Tsui S.M., Lam K.C.: Remission of hepatocellular carcinoma with arginine depletion induced by systemic release of endogenous hepatic arginase due to transhepatic arterial embolisation, augmented by high-dose insulin: arginase as a potential drug candidate for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 2005; 224: 67–80
- [8] Cianchi F., Cortesini C., Fantappie O., Messerini L., Schiavone N., Vannacci A., Nistri S., Sardi I., Baroni G., Marzocca C., Perna F., Mazzanti R., Bechi P., Masini E.: Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2003; 162: 793–801
- [9] Curley S.A., Bomalaski J.S., Ensor C.M., Holsberg F.W., Clark M.A.: Regression of hepatocellular cancer in a patient treated with arginine deiminase. *Hepatogastroenterology*, 2003; 50: 1214–1216
- [10] Dillon B.J., Prieto V.G., Curley S.A., Ensor C.M., Holsberg 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; 100: 826–833
- [11] Ensor C.M., Holsberg F.W., Bomalaski J.S., Clark M.A.: Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5443–5450
- [12] Felig P.: Amino acid metabolism in man. *Annu. Rev. Biochem.*, 1975; 44: 933–955
- [13] Flynn N.E., Meininger C.J., Haynes T.E., Wu G.: The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.*, 2002; 56: 427–438
- [14] Gokmen S.S., Aygit A.C., Ayhan M.S., Yorulmaz F., Gulen S.: Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the human skin. *J. Lab. Clin. Med.*, 2001; 137: 340–344
- [15] Gotoh H., Araki M., Mori M.: Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1997; 233: 487–491
- [16] Harris B.E., Pretlow T.P., Bradley E.L.Jr, Whitehurst G.B., Pretlow T.G. II: Arginase activity in prostatic tissue of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 1983; 43: 3008–3012
- [17] Huang S., Trujillo J.M., Chakrabarty S.: Proliferation of human colon cancer cells: role of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Int. J. Cancer*, 1992; 52: 978–986

- [18] Huang Y., Hager E.R., Phillips D.L., Dunn V.R., Hacker A., Frydman B., Kink J.A., Valasinas A.L., Reddy V.K., Marton L.J., Casero R.A.Jr, Davidson N.E.: A novel polyamine analog inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 2769–2777
- [19] Ikemoto M., Tsunekawa S., Awane M., Fukuda Y., Murayama H., Igarashi M., Nagata A., Kasai Y., Totani M.: A useful ELISA system for human liver-type arginase, and its utility in diagnosis of liver diseases. *Clin. Biochem.*, 2001; 34: 455–461
- [20] Izzo F., Marra P., Beneduce G., Castello G., Vallone P., De Rosa V., Cremona F., Ensor C.M., Holtsberg F.W., Bomalaski J.S., Clark M.A., Ng C., Curley S.A.: Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 1815–1822
- [21] Klotz T., Bloch W., Volberg C., Engelmann U., Addicks K.: Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. *Cancer*, 1998; 82: 1897–1903
- [22] Kojima M., Morisaki T., Tsukahara Y., Uchiyama A., Matsunari Y., Mibu R., Tanaka M.: Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J. Surg. Oncol.*, 1999; 70: 222–229
- [23] Kostourou V., Robinson S.P., Cartwright J.E., Whitley G.S.: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis. *Br. J. Cancer*, 2002; 87: 673–680
- [24] Kostourou V., Robinson S.P., Whitley G.S., Griffiths J.R.: Effects of overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase on tumor angiogenesis assessed by susceptibility magnetic resonance imaging. *Cancer Res.*, 2003; 63: 4960–4966
- [25] Kostourou V., Troy H., Murray J.F., Cullis E.R., Whitley G.S., Griffiths J.R., Robinson S.P.: Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase enhances tumor hypoxia: an insight into the relationship of hypoxia and angiogenesis *in vivo*. *Neoplasia*, 2004; 6: 401–411
- [26] Lagares-Garcia J.A., Moore R.A., Collier B., Heggere M., Diaz F., Qian F.: Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. *Am. Surg.*, 2001; 67: 709–713
- [27] Lee J., Ryu H., Ferrante R.J., Morris S.M.Jr, Ratan R.R.: Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 4843–4848
- [28] Leiper J.M., Santa Maria J., Chubb A., MacAllister R.J., Charles I.G., Whitley G.S., Vallance P.: Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distribution and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.*, 1999; 343: 209–214
- [29] Leu S.Y., Wang S.R.: Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer*, 1992; 70: 733–736
- [30] Lind D.S.: Arginine and cancer. *J. Nutr.*, 2004; 134: 2837S–2841S
- [31] May T.S.: Military surveillance system for breast cancer detection. *Drug Discov. Today*, 2002; 7: 1111–1112
- [32] Miyasaka Y., Enomoto N., Nagayama K., Izumi N., Marumo F., Watanabe M., Sato C.: Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br. J. Cancer*, 2001; 85: 228–234
- [33] Morbidelli L., Donnini S., Ziche M.: Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. *Cancer Treat. Res.*, 2004; 117: 155–167
- [34] Ogawa T., Kimoto M., Sasaoka K.: Purification and properties of a new enzyme, NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 10205–10209
- [35] Philip R., Campbell E., Wheatley D.N.: Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: 2. Enzymatic degradation of arginine in normal and malignant cell cultures. *Br. J. Cancer*, 2003; 88: 613–623
- [36] Porembska Z., Luboiński G., Chrzanowska A., Mielczarek M., Magnuska J., Barańczyk-Kuźma A.: Arginase in breast cancer. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 328: 105–111
- [37] Porembska Z., Mielczarek M., Nyckowski P., Barańczyk-Kuźma A.: Arginase as a marker of cancerogenesis. I. Monitoring patients after resection of colorectal cancer. *Pol. Merkuriusz Lek.*, 2002; 13: 284–285
- [38] Porembska Z., Nyckowski P., Skwarek A., Mielczarek M., Barańczyk-Kuźma A.: Arginase as a marker of cancerogenesis. II. Monitoring of patients after resection of colorectal liver metastases. *Pol. Merkuriusz Lek.*, 2002; 13: 286–288
- [39] Porembska Z., Zabek J., Grabon W., Rahden-Staron I., Barańczyk-Kuźma A.: Arginase isoforms in human colorectal cancer. *Clin. Chim. Acta*, 2001; 305: 157–165
- [40] Reveneau S., Arnould L., Jolimoy G., Hilpert S., Lejeune P., Saint-Giorgio V., Belichard C., Jeannin J.F.: Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Lab. Invest.*, 1999; 79: 1215–1225
- [41] Salvucci O., Carsana M., Bersani I., Tragni G., Anichini A.: Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 318–326
- [42] Schipper R.G., Deli G., Deloyer P., Lange W.P., Schalken J.A., Verhofstad A.A.: Antitumor analog of the polyamine analog N(1), N(11)-diethylnorspermine against human prostate carcinoma cells. *Prostate*, 2000; 44: 313–321
- [43] 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: 800–810
- [44] Selamnia M., Robert V., Mayeur C., Delpal S., Blachier F.: *De novo* synthesis of arginine and ornithine from citrulline in human colon carcinoma cells: metabolic fate of L-ornithine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1425: 93–102
- [45] Shen L.J., Lin W.C., Bellousow K., Shen W.C.: Resistance to the anti-proliferative activity of recombinant arginine deiminase in cell culture correlates with the endogenous enzyme, argininosuccinate synthetase. *Cancer Lett.*, 2003; 191: 165–170
- [46] 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; 60: 3305–3312
- [47] Singh R., Pervin S., Wu G., Chaudhuri G.: Activation of caspase 3 activity and apoptosis in MDA-MB-468 cells by N(omega)-hydroxy-L-arginine, an inhibitor of arginase, is not solely dependent on reduction in intracellular polyamines. *Carcinogenesis*, 2001; 22: 1863–1869
- [48] Takahashi Y., Mai M., Nishioka K.: Alpha-difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model. *Int. J. Cancer*, 2000; 85: 243–247
- [49] Takigawa M., Enomoto M., Nishida Y., Pan H.O., Kinoshita A., Suzuki F.: Tumor angiogenesis and polyamines: alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis *in ovo* and the proliferation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Cancer Res.*, 1990; 50: 4131–4138
- [50] Torok N.J., Higuchi H., Bronk S., Gores G.J.: Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release by nitrosylating caspase. *Cancer Res.*, 2002; 62: 1648–1653
- [51] Wang J., Torbenson M., Wang Q., Ro J.Y., Becich M.: Expression of inducible nitric oxide synthase in paired neoplastic and non-neoplastic primary prostate cell cultures and prostatectomy specimen. *Urol. Oncol.*, 2003; 21: 117–122
- [52] Wasa M., Bode B.P., Souba W.W.: Adaptive regulation of amino acid transport in nutrient deprived human hepatomas. *Am. J. Surg.*, 1996; 171: 163–169
- [53] Wheatley D.N., Campbell E.: Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: 3. Deficient utilisation of citrulline by malignant cells. *Br. J. Cancer*, 2003; 89: 573–576
- [54] Wheatley D.N., Scott L., Lamb J., Smith S.: Single amino acid (arginine) restriction: growth and death of cultured HeLa and human diploid fibroblasts. *Cell Physiol. Biochem.*, 2000; 10: 37–55
- [55] White M.F.: The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985; 822: 355–374
- [56] Windmueller H.G., Spaeth A.E.: Source and fate of circulating citrulline. *Am. J. Physiol.*, 1981; 241: E473–E480
- [57] Wu C.W., Chung W.W., Chi C.W., Kao H.L., Lui W.Y., P'eng F.K., Wang S.R.: Immunohistochemical study of arginase in cancer of the stomach. *Virchows Arch.*, 1996; 428: 325–331
- [58] Wu G., Morris S.M. Jr.: Arginine metabolism; nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 1998; 336: 1–17
- [59] Xie K., Huang S., Dong Z., Juang S.H., Gutman M., Xie Q.W., Nathan C., Fidler I.J.: Transfection with inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J. Exp. Med.*, 1995; 181: 1333–1343
- [60] Yu H., Yoo P.K., Aguirre R., Tson R., 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; 51: 1151–1160
- [61] Ziche M., Morbidelli L.: Nitric oxide and angiogenesis. *J. Neurooncol.*, 2000; 50: 139–148