

УДК 577.151.63

DOI: 10.31040/2222-8349-2026-0-2-77-83

**ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

© Е.Ю. Егидарова, Т.А. Филатенкова, А.Н. Цапиева, А.Н. Суворов, А.В. Соколов

Одной из актуальных задач нашего времени являются поиск новых мишеней для таргетной терапии онкологических заболеваний и разработка новых препаратов, нацеленных на опухолевые клетки. Особенностью многих опухолей является изменение клеточного метаболизма, вследствие чего утрачивается способность к самостоятельному синтезу ряда соединений, необходимых для нормального существования клетки. Аргининдеиминаза (ADI) – бактериальный фермент, который обладает антипролиферативной активностью в отношении ряда ауксотрофных по аргинину опухолевых клеток. ADI рассматривается как потенциальный кандидат, на основе которого может быть создан перспективный противоопухолевый препарат. Проведенные ранее исследования ADI, полученной из лизата клеток *Streptococcus pyogenes* M22, показали ее противоопухолевый потенциал. Однако из-за незначительного количества ADI в лизате исходного штамма стрептококка наибольший интерес для дальнейшего изучения представляет рекомбинантная аргининдеиминаза (rADI), полученная из штамма-продуцента *E. coli*.

Были проведены исследования действия rADI на ряд опухолевых клеток, таких как карцинома поджелудочной железы Panc02, гепатома MH22a и рак толстой кишки Caco-2, которые, согласно литературным данным, являются ауксотрофными по аргинину. В качестве контроля нормальных клеток были взяты фибробласты. Для определения цитотоксического эффекта rADI использовали МТТ-тест и оценку действия rADI в режиме реального времени с помощью клеточного анализатора xCELLigence Real-Time Cell Analysis. Было определено, что минимальной действующей концентрацией rADI на клетки Panc02 и Caco-2 является 10 мг/л. Клетки H22a оказались менее чувствительными к действию rADI – некоторое снижение жизнеспособности наблюдалось только при 20 мг/л. При этом воздействие на нормальные фибробласты было незначительным и не приводило к гибели клеток.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что rADI обладает избирательным действием на различные линии опухолевых клеток и не является токсичной в отношении нормальных фибробластов. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, подбор оптимальных концентраций rADI и наиболее чувствительных к ее действию опухолевых культур для оценки ее перспективности как потенциального противоопухолевого препарата.

Ключевые слова: аргининдеиминаза, опухолевые клетки, цитотоксичность, карцинома толстой кишки Caco-2, карцинома поджелудочной железы Panc02, гепатома MH22a.

**Введение.** Аргининдеиминаза (ADI; EC 3.5.3.6) – гуанидин-модифицирующая гидролаза, которая катализирует превращение L-аргинина в L-цитруллин и аммиак. ADI хорошо известна своим потенциалом в терапии опухолей, ауксотрофных по аргинину (Arg). Ауксотрофность по Arg является «слабым» местом целого ряда опухолей, в том числе рака поджелудоч-

ной железы, глиобластомы, рака предстательной железы, рака толстой кишки человека, рака легких, лейкемии и рака молочной железы [4–7]. L-аргинин – условно незаменимая аминокислота. В нормальных клетках истощение Arg приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1, которая отменяется после последующего введения экзогенного аргинина, в то время как

ЕГИДАРОВА Елена Юрьевна, Институт экспериментальной медицины,  
e-mail: lena.egidarova.97@mail.ru

ФИЛАТЕНКОВА Татьяна Александровна, Институт экспериментальной медицины,  
e-mail: lero269@gmail.com

ЦАПИЕВА Анна Николаевна – к.б.н., Институт экспериментальной медицины,  
e-mail: anna.tsapieva@gmail.com

СУВОРОВ Александр Николаевич – д.м.н., Институт экспериментальной медицины,  
e-mail: alexander\_suvorov1@hotmail.com

СОКОЛОВ Алексей Викторович – д.б.н., Институт экспериментальной медицины,  
e-mail: biochemsokolov@gmail.com

опухолевые клетки, лишенные синтеза Arg, не обладают способностью к возобновлению роста и пролиферации. Ауксотрофность по Arg является результатом генетической или эпигенетической (в основном за счет метилирования) инактивации гена аргининосукцинатсинтетазы (ASS1) и зачастую обнаруживается в опухолях, связанных с химиорезистентностью и неблагоприятным клиническим исходом [3]. Изучение возможности использования ADI в таких сложных клинических случаях может представлять значительный интерес.

Проведенные ранее исследования ADI, полученной из лизата клеток *Streptococcus pyogenes* M22, показали ее противоопухолевый потенциал [6]. Однако из-за небольшого количества ADI в клетках стрептококка, для дальнейших исследований противоопухолевых свойств фермента потребовалось создание содержащего плазмиду штамма *E. coli*, экспрессирующего ген аргининдеиминазы (*arcA*) [1].

Целью данной работы был поиск минимальной концентрации гADI, оказывающей цитотоксическое воздействие на линии опухолевых клеток, которые, согласно литературным данным, являются ауксотрофными по аргинину.

**Материалы и методы. Клеточные линии и условия культивирования.** В качестве клеточных мишеней для анализа онколитической активности рекомбинантной аргининдеиминазы (гADI) были выбраны следующие клеточные линии: гепатома MH22a – гепатома человека, Panc02 – карцинома поджелудочной железы, Сасо-2 – карцинома толстой кишки. В качестве контроля цитотоксической активности в отношении нормальных клеток использовали фибробласты человека (Покровский банк клеток).

Клетки предварительно выращивали в растворе среды DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Биолот, Россия) с добавлением 10% FBS – фетальная бычья сыворотка (Биолот, Россия) и 10 г/мл сульфата гентамицина (Sigma, США) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**гADI.** Аргининдеиминаза для исследования цитотоксического воздействия гADI на опухолевые клетки была получена путем клонирования гена *arcA* *Streptococcus pyogenes* M22 A1168 в клетках экспрессионного штамма *E. coli* BL21 [1]. Полученный штамм успешно экспрессировал гADI в растворимой и ферментативной активной форме. После всех стадий очистки гADI была растворена в буфере с добавлением 0.5 NaCl и 0.5 mM 2-меркапто-этанола, для сохранения активности фермента при заморозке.

**МТТ-тест.** Для первичной оценки цитотоксичности гADI использовали МТТ-тест. МТТ-тест заключается в определении активности митохондриальных ферментов клеток. Метод основан на восстановлении (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ) клеточными ферментами – оксидоредуктазами. В результате восстановления образуется водонерастворимый формазан, количество которого коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. Таким образом, этим тестом можно выявить активно метаболизирующие и активно делящиеся клетки. Определение количества формазана осуществляют с помощью спектрофотометра при длине волны около 540 нм [2]. Для МТТ-теста клеточные культуры в растворе с описанным выше составом вносили в микропланшет по 100 мкл в лунку, при этом концентрация клеток в каждой лунке достигала 50 тыс. Планшет помещали в инкубатор при 37°C на ночь. Затем из лунок отбирали среду и замещали ее 50 мкл гADI разведенной в чистой среде DMEM (без добавок) в концентрации 20, 10, 5 и 2.5 мг/л. Планшет с пробами инкубировали при тех же условиях в течение суток. На следующий день из лунок планшета удаляли жидкость, в лунки вносили по 50 мкл раствора МТТ в концентрации 1 мг/мл, и помещали в термостат при 37°C на 4 часа. После чего МТТ раствор сливали, добавляли по 100 мкл закисленного изопропанола в каждую лунку и растворяли образовавшиеся кристаллы формазана с помощью пипетирования. Поглощение измеряли при длине волны 540 и 690 нм, где значение поглощения по длине волны 690 нм было контрольным и вычиталось из значения поглощения по 540 нм. Результаты рассчитывали относительно положительного контроля, который представлял собой только клетки без добавления исследуемых образцов, принимаемого за 100%. Полученные результаты приводили в виде процента живых клеток.

**Оценка цитотоксичности гADI в режиме реального времени с помощью клеточного анализатора xCELLigence.** Оценка цитотоксического действия рекомбинантной ADI проводили с помощью клеточного анализатора xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA). Данный прибор использует специальные микропланшеты для непрерывного измерения электрического импеданса (электрического сопротивления) клеток в реальном времени, что позволяет оценивать их адгезию, жизнеспособность и пролиферацию без использования красителей. Для этого в лунки 8-луночного план-

шета с золотым напылением вносили 150 мкл теплой среды DMEM и ставили на станцию xCELLigence. В одном эксперименте использовали по два 8-луночных планшета. С помощью программы RTCA запускали измерение фоновых показателей, после чего снимали планшеты и удаляли среду. Далее в каждую лунку помещали суспензию клеток в объеме 300 мкл и оставляли в ламинарном боксе БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 NEOTERIC (Lamsystems, РФ) при комнатной температуре в течение 30 минут, чтобы клетки прикрепились ко дну лунки планшета с целью достижения равновесия и последующего точного измерения клеточного индекса (КИ) во всех лунках. После этого 8-луночные планшеты переносили на станцию прибора, установленную внутри CO<sub>2</sub> инкубатора при температуре 37°C и инкубировали в течение 24 часов, чтобы обеспечить окончательное прикрепление клеток и их пролиферацию. В программе RTCA запускали мониторинг импеданса в режиме реального времени в течение 24 часов и показания снимались каждые 6 минут. Динамику роста клеток контролировали до тех пор, пока клетки не достигли фазы экспоненциального роста и не сформировали монослой (приблизительно 18–24 ч).

Рекомбинантную ADI разбавляли до концентраций 2.5, 5, 10 и 20 мг/л в среде DMEM, после чего вносили по 150 мкл полученных растворов в лунки планшетов с культурой клеток. Во время добавления препаратов измерение останавливалось. Планшеты снимали со станции и, используя дозатор, отбирали по 300 мкл полной среды из каждой лунки. После чего вносили 300 мкл свежей среды с содержанием препарата и возвращали планшеты на станцию прибора. Мониторинг действия препаратов продолжался в течение 48–72 часов после добавления исследуемых препаратов.

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel 2010.

**Результаты и обсуждения.** Нами была проанализирована активность гADI в отношении клеточных культур опухолевых и нормальных клеток в МТТ-тесте. Активность гADI проверяли в отношении клеток карциномы поджелудочной железы Panc02, гепатомы МН22а, карциномы кишечника Сасо-2 и клеток нормальных фибробластов кожи человека в качестве контроля.

Полученные данные представлены в виде процента живых клеток в таблице.

Из полученных данных видно, что гADI оказывает разное цитотоксическое действие в отношении различных типов клеток. Как можно видеть из приведенных таблицы и графика (рис. 1) наиболее значимое влияние добавление аргининдеиминазы оказывало на клетки карциномы поджелудочной железы Panc02 и клетки карциномы кишечника Сасо-2. Гепатома МН-22а практически не реагировала на добавление исследуемого белка. Наблюдался дозозависимый эффект действия гADI на опухолевые клетки. Наилучший эффект на замедление развития опухолевых клеток показала самая высокая из используемых концентраций гADI – 20 мг/л. В качестве контроля влияния гADI на жизнедеятельность нормальных клеток использовали клетки нормальных фибробластов кожи человека. Было обнаружено, что концентрация аргининдеиминазы менее 20 мг/л обладает низкой цитотоксичностью в отношении фибробластов.

Наибольшей эффективностью гADI обладала в отношении клеток колоректального рака Сасо-2. Так как МТТ-тест не является прямым показателем клеточной гибели, а выявляет лишь замедление метаболизма и деления клеток, то для подтверждения полученных результатов была оценена цитотоксичность гADI на клетки Сасо-2 и клетки фибробластов (контроль) в режиме реального времени с помощью клеточного анализатора xCELLigence. Концентрации рекомбинантного фермента использовались те же, что и в описанном выше МТТ-тесте. Результаты представлены на приведенных ниже рисунках (рис. 2).

Т а б л и ц а

Выживаемость клеток при воздействии гADI (МТТ-тест)

	Концентрация гADI, мг/л				
	0 (контроль)	2.5	5	10	20
Panc02	100±5.4	78.1±4.6	87.7±6.4	96.7±5.6	53.8±7.6
МН22а	100±6	101.3±5.8	103.4±3.9	103.4±4	85.7±6.2
Сасо-2	100±5.9	60.5±4.3	61±5.3	60.3±4.3	41.1±5.7
Фибробласты	100±2.9	97.3±5.6	95.2±3.3	91.7±4.2	62.4±5.1

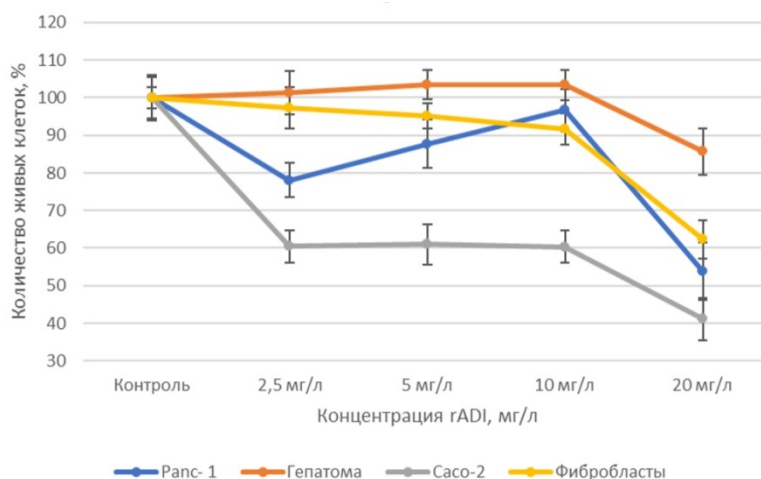


Рис. 1. Выживаемость различных клеток опухолей и фибробластов после воздействия различных концентраций gADI при оценке по конечной точке (МТТ-тест). Цветом обозначены клеточные линии: синий – панс02, оранжевый – МН22а, серый – Сасо-2, желтый – нормальные клетки, фибробласты

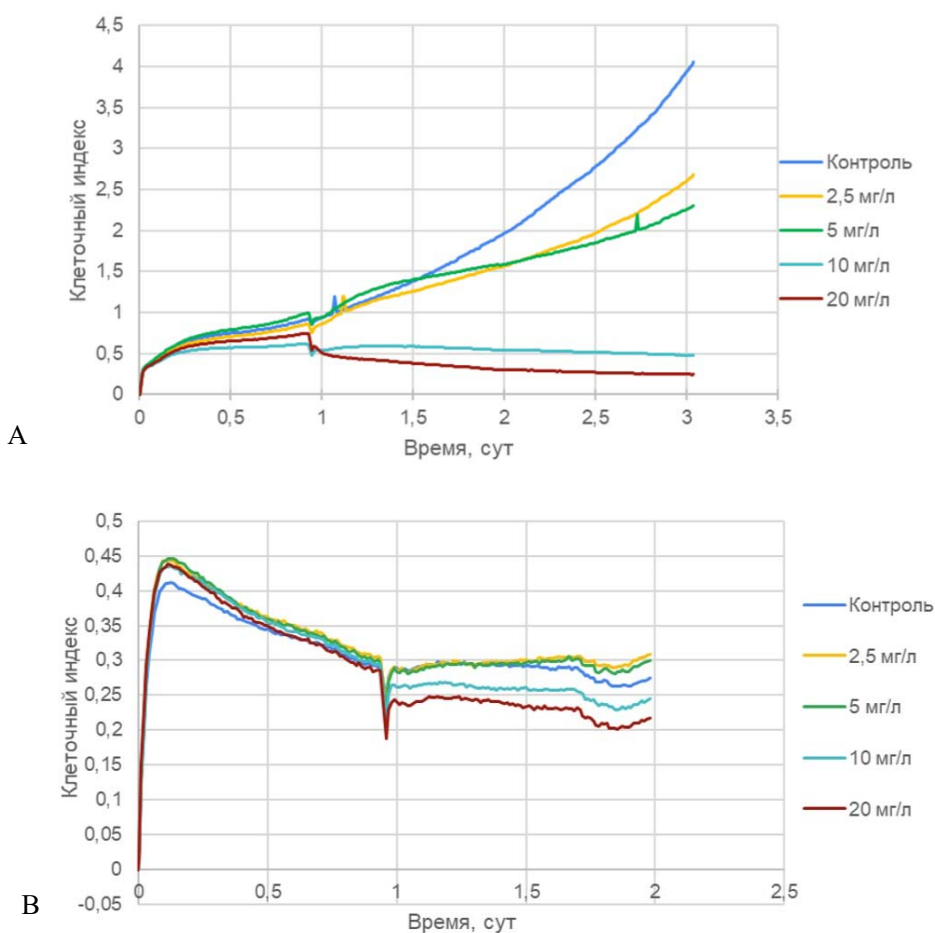


Рис. 2. Динамика изменения клеточного индекса при культивировании клеток в клеточном анализаторе xCELLigence RTCA до и после добавления gADI в различной концентрации: *A* – цитотоксичность gADI в отношении клетки карциномы кишечника Сасо-2; *B* – цитотоксичность gADI в отношении фибробластов. Цветными линиями обозначены различные концентрации gADI: синий – контроль (буфер без добавления gADI), желтый – концентрация gADI 2.5 мг/л, зеленый – концентрация gADI 5 мг/л, голубой – концентрация gADI 10 мг/л, коричневый – концентрация gADI 20 мг/л

Поскольку при выбранной концентрации клеток на лунку оптимальное время инкубации с изучаемым препаратом для фибробластов составляет 24–48 часов, после чего клетки перестают быстро делиться, истощается среда и результаты становятся недостоверными, то изучение цитотоксичности гADI на фибробластах проводилось в течение 48 часов. Клетки линии Сасо-2 растут значительно медленнее и достигают стадии замедления роста и истощения среды позднее. Поэтому изучение цитотоксичности осуществлялось в течение 72 часов.

Как можно видеть из приведенных графиков концентрация белка 10 и 20 мг/л оказывали значительное цитотоксическое воздействие на клетки карциномы кишечника Сасо-2 (рис. 2, А). При добавлении гADI в концентрации 10 мг/л происходила остановка пролиферации клеток, а при добавлении 20 мкг/мл – наступала гибель клеток с падением клеточного индекса с 0.6 ед. до 0.2 ед. при наблюдении в течение 72 часов после воздействия (гибель около 70% клеток), что соотносится с данными МТТ-теста. При этом концентрации гADI 2.5 и 5 мг/л не оказывали значительного влияния на клеточный индекс Сасо-2. Поэтому минимальной рабочей концентрацией гADI на данной клеточной линии можно считать 10 мг/л.

При этом не наблюдалось значительного цитотоксического влияния на нормальные клетки фибробластов кожи человека в течение всего эксперимента. Разница между клеточными индексами при концентрации гADI 20 мг/л и 2.5 мг/л составила менее 0.1 (рис. 2, В).

**Заключение.** Известно, что статистика смертности от онкологических заболеваний постоянно растет. Большинство традиционных подходов к лечению опухолей, такие как химиотерапия или облучение, может привести к повреждению здоровых клеток и тканей или развитию лекарственной устойчивости, что ограничивает их применение. Поэтому поиск новых подходов для лечения онкологических заболеваний постоянно продолжается. Одной из возможных альтернатив химиотерапии могут стать бактериальные белки и ферменты, такие как, например, фермент аргининдеиминаза. Несомненным преимуществом аргининдеиминазы является то, что удаление из среды Arg, вследствие работы данного фермента, затрагивает исключительно опухолевые клетки, аутокотрофные по аргинину, не вредя при этом нормальным клеткам организма.

В настоящее время, продолжают клинические испытания нескольких средств, истощающих аргинин, в том числе испытания пегилированной ADI [8, 9]. Однако большинство из исследований, посвященных ADI, основываются на ферменте, полученном из штаммов *Mycoplasma spp.* Хотя гADI из штаммов стрептококка представляется не менее перспективной благодаря своей большей, в сравнении с микоплазмой, молекулярной массой – около 45 кДа (т.е. более длительное время почечного клиренса) и выраженной антипролиферативной активности. Примечательно, что все исследования и клинические испытания ADI проводятся почти исключительно за рубежом.

В нашей работе рекомбинантная аргининдеиминаза показала свою эффективность и перспективность для дальнейших исследований на линии клеток карциномы кишечника человека Сасо-2 как в МТТ-тесте, так и при наблюдении в клеточном анализаторе xCELLigence. Минимальная рабочая концентрация гADI на данной клеточной линии составила 10 мг/л.

Также гADI оказалась достаточно эффективна в предварительном МТТ-тесте на линии клеток карциномы поджелудочной железы Panc02. Меньший цитотоксический эффект на клетках Panc02, в сравнении с Сасо-2, может объясняться большей скоростью пролиферации Panc02 (время удвоения количество клеток *in vitro* от 18 до 28 часов в сравнении с 50–80 часов у клеток линии Сасо-2). Поэтому для остановки клеточного деления и гибели опухолевых клеток могут потребоваться большие концентрации гADI.

Влияние гADI на замедление клеточного роста и апоптоз клеток линии гепатомы МН22а было менее выраженным и проявлялось только при максимальной исследуемой концентрации – 20 мг/л. Это также может объясняться высокой скоростью роста клеток гепатомы (время удвоения количества клеток *in vitro* от 18 до 24 часов).

Неодинаковое воздействие гADI на линии Panc02 и МН-22а, предположительно, может быть связано с неполным подавлением экспрессии гена и синтеза фермента обратного ADI – аргининсукцинатсинтетазы у клеток линии МН-22а, что делает их менее чувствительными к терапии, основанной на лишении аргинина.

В обоих тестах – МТТ и xCELLigence было показано низкое токсическое воздействие гADI на контрольные нормальные клетки, фибробла-

сты (рис. 1 и рис. 2, B). Некоторое снижение процента живых клеток при МТТ-тесте можно объяснить тем, что МТТ-тест показывает не прямую клеточную гибель, а снижение активности метаболизма клеток. Поэтому можно предположить, что в концентрации 20 мг/л гADI оказывает цитостатический эффект на нормальные клетки, фибробласты, при этом не вызывая их гибели, о чем свидетельствуют данные xCELLigence.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения аргининдеиминазы как потенциального противоопухолевого препарата. Обладая минимальным цитотоксическим действием на нормальные клетки фибробластов человека, гADI оказывал значительный эффект на снижение жизнеспособности клеток опухолевых клеток Сасо-2 и Рапс02. Однако, в будущем требуется более внимательное исследование дозозависимого эффекта гADI и диапазона рабочих концентраций на данных опухолевых культурах и других видах раковых клеток потенциально чувствительных к гADI.

### Литература

1. Егидарова Е.Ю., Грудинина Н.А., Карасева А.Б., Суворов А.Н., Соколов А.В. Получение рекомбинантной аргинин деиминазы *Streptococcus pyogenes* M22 и анализ ее ферментативной активности // Симбиоз-Россия 2022: сборник статей XIII Международной конференции ученых-биологов, Пермь, 24–25 октября 2022 года. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет. 2023. С. 258–261.
2. Прилепский А.Ю., Дроздов А.С., Богатырев В.А., Староверов С.А. Методы работы с клеточными культурами и определения токсичности наноматериалов: Учебно-методическое пособие. Университет ИТМО. 2019.
3. Fiedler T., Strauss M., Hering S., Redanz U., William D., Rosche Y., Classen C.F., Kreikemeyer B., Linnebacher M., Maletzki C. Arginine deprivation by arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* controls primary glioblastoma growth *in vitro* and *in vivo* // *Cancer Biol Ther.* 2015. V. 16. № 7. P. 1047–1055.
4. Liu J., Ma J., Wu Z., Li W., Zhang D., Han L., Wang F., Reindl K.M., Wu E., Ma Q. Arginine deiminase augments the chemosensitivity of argininosuccinate synthetase-deficient pancreatic cancer cells to gemcitabine via inhibition of NF-κB signaling // *BMC Cancer.* 2014. V. 14. P. 686.
5. Patil M.D., Bhaumik J., Babykutty S., Banerjee U.C., Fukumura D. Arginine dependence of tumor

cells: targeting a chink in cancer's armor // *Oncogene.* 2016. V. 35. № 38. P. 4957–4972.

6. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22 // *Biochem Cell Biol.* 2016. V. 94. № 2. P. 129–137.
7. Xiong L., Teng J.L., Botelho M.G., Lo R.C., Lau S.K., Woo P.C. Arginine Metabolism in Bacterial Pathogenesis and Cancer Therapy // *Int J Mol Sci.* 2016. V. 17. № 3. P. 363.
8. Tsai H.J., Hsiao H.H., Hsu Y.T., Liu Y.C., Kao H.W., Liu T.C., Cho S.F., Feng X., Johnston A., Bomalaski J.S., Kuo M.C., Chen T.Y. Phase I study of ADI-PEG20 plus low-dose cytarabine for the treatment of acute myeloid leukemia // *Cancer Med.* 2021. V. 10. № 9. P. 2946–2955.
9. Tsai H.J., Jiang S.S., Hung W.C., Borthakur G., Lin S.F., Pemmaraju N., Jabbour E., Bomalaski J.S., Chen Y.P., Hsiao H.H., Wang M.C., Kuo C.Y., Chang H., Yeh S.P., Cortes J., Chen L.T., Chen T.Y. A Phase II Study of Arginine Deiminase (ADI-PEG20) in Relapsed/Refractory or Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia Patients // *Sci Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11253.

### Reference

1. Egidarova E.Ju., Grudinina N.A., Karaseva A.B., Suvorov A.N., Sokolov A.V. Poluchenie rekombinantnoj arginin deiminazy *Streptococcus pyogenes* M22 i analiz ee fermentativnoj aktivnosti // Simbioz-Rossija 2022: sbornik statej XIII Mezhdunarodnoj konferencii uchenyh-biologov, Perm', 24–25 oktjabrja 2022 goda. Perm': Permskij gosudarstvennyj nacional'nyj issledovatel'skij universitet. 2023. S. 258–261.
2. Prilepskij A.Ju., Drozdov A.S., Bogatyrev V.A., Staroverov S.A. Metody raboty s kletochnymi kulturami i opredelenija toksichnosti nanomaterialov: Uchebno-metodicheskoe posobie. Universitet ITMO. 2019.
3. Fiedler T., Strauss M., Hering S., Redanz U., William D., Rosche Y., Classen C.F., Kreikemeyer B., Linnebacher M., Maletzki C. Arginine deprivation by arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* controls primary glioblastoma growth *in vitro* and *in vivo* // *Cancer Biol Ther.* 2015. V. 16. № 7. P. 1047–1055.
4. Liu J., Ma J., Wu Z., Li W., Zhang D., Han L., Wang F., Reindl K.M., Wu E., Ma Q. Arginine deiminase augments the chemosensitivity of argininosuccinate synthetase-deficient pancreatic cancer cells to gemcitabine via inhibition of NF-κB signaling // *BMC Cancer.* 2014. V. 14. P. 686.
5. Patil M.D., Bhaumik J., Babykutty S., Banerjee U.C., Fukumura D. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor // *Oncogene.* 2016. V. 35. № 38. P. 4957–4972.
6. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical

and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22 // *Biochem Cell Biol.* 2016. V. 94. № 2. P. 129–137.

7. Xiong L., Teng J.L., Botelho M.G., Lo R.C., Lau S.K., Woo P.C. Arginine Metabolism in Bacterial Pathogenesis and Cancer Therapy // *Int J Mol Sci.* 2016. V. 17. № 3. P. 363.

8. Tsai H.J., Hsiao H.H., Hsu Y.T., Liu Y.C., Kao H.W., Liu T.C., Cho S.F., Feng X., Johnston A., Bomalaski J.S., Kuo M.C., Chen T.Y. Phase I study of

ADI-PEG20 plus low-dose cytarabine for the treatment of acute myeloid leukemia // *Cancer Med.* 2021 V. 10. № 9. P. 2946–2955.

9. Tsai H.J., Jiang S.S., Hung W.C., Borthakur G., Lin S.F., Pemmaraju N., Jabbour E., Bomalaski J.S., Chen Y.P., Hsiao H.H., Wang M.C., Kuo C.Y., Chang H., Yeh S.P., Cortes J., Chen L.T., Chen T.Y. A Phase II Study of Arginine Deiminase (ADI-PEG20) in Relapsed/Refractory or Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia Patients // *Sci Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11253.



## THE EFFECT OF RECOMBINANT *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ARGININE DEIMINASE ON TUMOR CELL VIABILITY

© E.Y. Egidarova, T.A. Filatenkova, A.N. Tsapieva, A.N. Suvorov, A.V. Sokolov

Institute of Experimental Medicine,  
12, st. Academician Pavlova, 197376, St. Petersburg, Russian Federation

One of the current interests of our time is the search for new targets for cancer therapy and the development of new drugs that target tumor cells. Many tumors suffer from altered cellular metabolism, resulting in the loss of the ability to independently synthesize certain compounds necessary for normal cell function. Arginine deiminase (ADI) is a bacterial enzyme known to exhibit antiproliferative activity against a number of arginine-auxotrophic tumor cells. Therefore, this enzyme is considered a potential candidate for the development of a promising antitumor drug. Previous studies of ADI obtained from *Streptococcus pyogenes* M22 cell lysate have shown its antitumor potential. However, of the greatest interest for further study is recombinant arginine deiminase (rADI), obtained from the *E. coli* producer strain, due to the low amount of ADI in the lysate of the original streptococcal strain.

Studies were conducted to evaluate the effects of rADI on a range of tumor cells, including Panc02 pancreatic carcinoma, MH22a hepatoma, and Caco-2 colon cancer, which, according to the literature, are arginine auxotrophs. Fibroblast cells served as a control for normal cells. We used an MTT assay and real-time assessment of rADI activity by using the xCELLigence Real-Time Cell Analysis system to determine the cytotoxic effect of rADI. The minimum effective concentration of rADI on Panc02 and Caco-2 cells was determined to be 10 mg/l. H22a cells were less sensitive to rADI, with a slight decrease in viability observed only at 20 mg/l. However, the effect on normal fibroblast cells was minor and did not result in cell death.

Based on the obtained results, it can be concluded that rADI has a selective effect on various tumor cell lines and it is nontoxic for normal fibroblasts. Therefore, further research is needed to identify optimal rADI concentrations and the most sensitive tumor cultures to evaluate its potential as an anticancer drug.

Keywords: Arginine deiminase, tumor cells, cytotoxicity, colon carcinoma Caco-2, pancreatic carcinoma Panc02, hepatoma H22a.