

DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-5-27-35

УДК: 577.114.5:616-006.6:547.458]092.9

Для цитирования: Давыдов Д.Ж., Морозова Е.А., Комарова М.В., Ануфриева Н.В., Завильгельский Г.Б., Манухов И.В., Демидкина Т.В., Трещалина Е.М., Покровский В.С. Использование пиридоксина для повышения противоопухолевой активности метионин-гамма-лиазы на моделях перевиваемых опухолей мышей. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (5): 27–35. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-5-27-35.

For citation: Davydov D.Zh., Morozova E.A., Komarova M.V., Anufrieva N.V., Zaviilgelsky G.B., Manukhov I.V., Demidkina T.V., Treshchalina E.M., Pokrovsky V.S. Use of pyridoxine to increase anticancer activity of methionine-gamma-lyase in murine cancer models. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (5): 27–35. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-5-27-35.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИРИДОКСИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ МЕТИОНИН-ГАММА-ЛИАЗЫ НА МОДЕЛЯХ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ

Д.Ж. Давыдов¹, Е.А. Морозова², М.В. Комарова³, Н.В. Ануфриева²,
Г.Б. Завильгельский⁴, И.В. Манухов^{4,5}, Т.В. Демидкина², Е.М. Трещалина¹,
В.С. Покровский¹

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, г. Москва, Россия¹
115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23. E-mail: davydov.online@gmail.com¹

ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН, г. Москва, Россия²
119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32. E-mail: elmorozova@yahoo.com²

ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава РФ, г. Самара, Россия³
443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89. E-mail: marinakom@yandex.ru³

ФГУП «ГосНИИгенетика», г. Москва, Россия⁴
117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1⁴

ФГБОУ ВО «МФТИ», Лаборатория молекулярной генетики, г. Долгопрудный⁵
141700, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9⁵

Аннотация

Приведены экспериментальные данные монотерапии и комбинированной терапии моделей перевиваемых опухолей мышей препаратами метионин- γ -лиазы (МГЛ) и пиридоксина гидрохлорида. Изучены МГЛ *Clostridium sporogenes* и *Citrobacter freundii*. Используются перевиваемые модели опухолей мышей: карцинома легкого Льюис (LLC), меланома В16, лимфолейкоз Р388, лимфолейкоз L1210, лимфаденоз Фишера L5178у. На моделях Р388, L5178у МГЛ не показала противоопухолевой активности ни в моно-режиме, ни в сочетании с пиридоксином. На модели L1210 было получено пограничное увеличение продолжительности жизни (УПЖ) 22 %, $p=0,035$ при применении МГЛ *C. sporogenes* в дозе 2000 Е/кг 11-кратно внутрибрюшинно с интервалом 12 ч. На LLC показано, что на 1-е сут после окончания лечения одновременное внутрибрюшное (в/б) введение МГЛ *C. sporogenes* 400 Е/кг 4-кратно с интервалом 48 ч и пиридоксина в дозе 250 мг/кг вызывало ТРО=55 % ($p<0,001$), монотерапия МГЛ или пиридоксином в аналогичных дозах и режимах применения вызывала ТРО=24 % ($p=0,263$) и 21 % ($p=0,410$) соответственно. При попарном сравнении: комбинированная терапия МГЛ + пиридоксин против монотерапии МГЛ в аналогичном режиме $p=0,061$, против монотерапии пиридоксином $p=0,031$. На LLC МГЛ *C. freundii* 200 Е/кг 4-кратно с интервалом 48 ч и пиридоксина в дозе 500 мг/кг одновременно на 9-е сут после окончания лечения вызывало ТРО=50 % ($p=0,001$), при этом монотерапия МГЛ в разовой дозе 400 Е/кг или пиридоксином в аналогичном режиме применения вызывала ТРО=+5 % ($p=0,991$) и 4 % ($p=0,998$) соответственно. При попарном сравнении: комбинированная терапия МГЛ 200 Е/кг + пиридоксин против монотерапии МГЛ 400 Е/кг в аналогичном режиме $p<0,001$, против монотерапии пиридоксином $p=0,003$. На модели меланома В16 МГЛ 2000 в/б + пиридоксин 300 мг/кг вызывает ТРО 56 % на 1-е сут ($p=0,045$) и 35 % на 3-и сут ($p=0,038$). При комбинированной терапии МГЛ + пиридоксин последний значимо повышал противоопухолевую активность МГЛ в сочетаниях: МГЛ 1000 Е/кг в/б и МГЛ 1000 Е/кг в/б + пиридоксин 300 мг/кг ТРО=45 % ($p=0,034$) на 3-и сут после окончания лечения. При внутривенном введении МГЛ 500 Е/кг и МГЛ 500 Е/кг + пиридоксин последний повышал эффективность лечения: максимальное ТРО 50 % на 1-е сут после окончания лечения ($p=0,085$, различие не достоверно) и 21 % на 3-и сут после окончания лечения ТРО 22 % ($p=0,965$, различие не достоверно).

Разовая максимальная переносимая доза при многократном в/б введении составила 2000 Е/кг, одновременное применение пиридоксина не усугубляло токсичности МГЛ. Таким образом, LLC и меланома В16 обладают чувствительностью к терапии МГЛ. Одновременное введение пиридоксина на модели LLC и В16 достоверно повышает её эффективность.

Ключевые слова: метионин-γ-лиаза, МГЛ, пиридоксин, витамин В6, противоопухолевые ферменты, карцинома лёгкого Льюис (LLC), меланома В16, лимфолейкоз Р388, лимфаденоз Фишера L5178у.

L-метионин – незаменимая серосодержащая алифатическая α-аминокислота, которая необходима для синтеза витаминов, антиоксидантов, коферментов, полиаминов и ряда других молекул, требующихся для нормального функционирования клетки [1–3]. L-метионин является первой аминокислотой, которая используется в процессе синтеза белков и служит предшественником биосинтеза цистеина. Метиониновая зависимость опухолевых клеток была замечена ещё в 1959 г. на модели карциносаркомы Уокера у крыс [4]. Ограничение поступления метионина в метионинзависимые опухолевые клетки может приводить к остановке клеточного цикла в поздней фазе S/G₂ как *in vitro*, так и *in vivo* [5, 6]. Остановка клеточного цикла в фазе S/G₂ повышает вероятность их гибели.

Метионин-γ-лиаза (МГЛ, КФ 4.4.1.11) – пиридоксальфосфат-5'--(ПЛФ)-зависимый фермент [7, 8], который катализирует превращение L-метионина в α-кетобутират, метилмеркаптан и аммиак в реакции α, γ-элиминирования (рис. 1). МГЛ представляет интерес в качестве противоопухолевого агента, поскольку снижает концентрацию метионина в плазме крови, и метионин-зависимые опухолевые клетки погибают [9]. Ранее было показано наличие цитотоксичности МГЛ *C. sporogenes* и *C. freundii* на культурах опухолевых клеток K562, PC-3, LnCap, MCF7, L5178у, SCOV-3, а также установлены основные фармакокинетические параметры МГЛ и динамика снижения уровня метионина плазмы крови после её однократного введения [10, 11]. В частности, показано, что введение МГЛ *C. sporogenes* мышам внутривенно однократно в дозе 1000 Е/кг снижает уровень метионина ниже 0,05 мкМ/л в течение 8 час [11].

В 1973 г. были опубликованы данные об эффективности МГЛ *C. sporogenes in vitro* в культуре клеток мышинной мастоцитомы P815 и *in vivo* на саркоме Уокера 256 крыс [12]. К МГЛ из *Pseudomonas putida* чувствительны культуры клеток гемобластозов SEM, Molt4, Molt16, K562, HL60 [13]. Цитотоксичность МГЛ из *Aspergillus flavipes* продемонстрирована на культурах клеток рака предстательной железы PC-3, печени HepG2

и молочной железы MCF-7 [13]. МГЛ из *Idiomarina* цитотоксична в отношении клеток острого Т-лимфобластного лейкоза SEM-C7 и MOLT-4 и острого миелобластного лейкоза MV4-11 и MOLM-13: IC₅₀ составила 1,7; 0,3; 0,64; 0,03 Ед/мл соответственно [15]. В ряде исследований показан синергизм цитотоксичности МГЛ и известных противоопухолевых препаратов. Например, на культуре клеток CCRF-CEM рекомбинантная МГЛ повышает цитотоксичность 5-фторурацила и фолиевой кислоты [16].

Эффективность фермента (нативного или рекомбинантного) из *P. putida* показана на широком спектре перевиваемых солидных опухолей животных и человека: саркоме Йошида, немелкоклеточном раке легкого NCL-H460 и Ma44, медуллобластоме Daou; нейробластоме LAN-1 и NMB-7, раке толстой кишки HCT116, HCT15, HT29, Colo205 и SW620, фибросаркоме HT1080, плоскоклеточном раке KB3-1, KB8-5 [17, 18]. На модели саркомы Уокера 256 у крыс Wistar МГЛ более эффективно замедляла опухолевый рост по сравнению с безметиониновой диетой [12].

На ксенографтах рака толстой кишки человека Colo205 и SW620, а также рака молочной железы человека MX-t показан синергизм комбинации рекомбинантной МГЛ с цисплатином [19–21]. На модели карциномы легкого Льюис мышей обнаружен потенцирующий эффект МГЛ при совместном применении с 5-фторурацилом [20]. На ксенографтах нейробластомы и глиобластомы человека эффективными были комбинации МГЛ с винкристином, темозоломидом или кармустином [17, 22]. В то же время эффективность МГЛ в монорежиме остается ограниченной.

Пиридоксин – одна из форм витамина В6, который является предшественником пиридоксаль-5'-фосфата (ПЛФ) – кофермента МГЛ [11]. В связи с тем, что МГЛ является ПЛФ-зависимым ферментом, важным становится вопрос о влиянии пиридоксина на противоопухолевую активность МГЛ, так как при высокой дозе МГЛ и недостаточном содержании кофермента активность МГЛ проявляется не в полной мере.

Цель исследования – определить чувствительные опухолевые модели *in vivo* к терапии МГЛ, а также диапазон эффективных и максимально переносимых доз; показать возможность увеличения противоопухолевого эффекта МГЛ при комбинированной терапии с пиридоксином на чувствительных моделях злокачественных опухолей мышей.

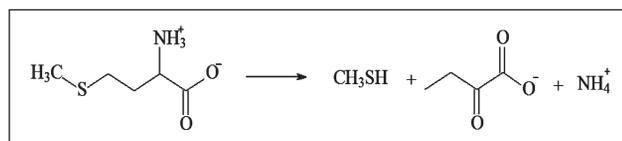


Рис. 1. Реакция γ-элиминирования L-метионина

Материал и методы

Животные: мыши чистых линий DBA₂ и C₅₇Bl₆, и гибридные BDF₁[DBA₂×C₅₇Bl₆], обоих полов, разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Опухолевые модели. Лимфолейкозы Р388, L1210, лимфаденоз Фишера L5178у – внутрибрюшинная трансплантация (в/б) по 10⁶ клеток; эпидермоидная карцинома лёгких Льюис LLC, меланома В16 – подкожная трансплантация (п/к) по 5×10⁶ клеток.

Препараты. МГЛ из *C. sporogenes* (выделена и очищена в ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» или ФГУП ГосНИИГенетика), и *C. freundii* 80-250 Е/мл (ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта»). Пиридоксина гидрохлорид, 50 мг/мл, ООО «Виал».

Дозы и режимы введения препаратов. На модели Р388 МГЛ вводили в дозах 50, 100 или 200 Е/кг внутривенно (в/в), 4-кратно с интервалом 48 ч, на модели L1210 – в дозах 1000 или 2000 Е/кг в/б 9- или 11-кратно с интервалом 12 ч, на модели L5178у – в дозах от 4000 до 16000 в/б 9-кратно с интервалом 24 ч. Лечение гемобластозов начинали через 24 ч после трансплантации. На модели LLC МГЛ вводили в дозах 200 или 400 Е/кг в/в 4-кратно с интервалом 48 ч, на модели В16 МГЛ вводили в/в или в/б 20-кратно в дозах 500, 1000 или 2000 Е/кг, интервал между введениями 12 ч. Лечение солидных опухолей начинали через 48 ч после трансплантации. Пиридоксин вводили в дозах 250, 300 или 500 мг/кг п/к или в/б одновременно с МГЛ.

Оценка противоопухолевого эффекта. Эффективность лечения мышей оценивали по увеличению продолжительности жизни (УПЖ) и торможению роста опухоли (ТРО). Значимыми считали УПЖ >25 % и ТРО >50 %. Показатели эффективности определяли в сравнении с контролем.

Оценка переносимости. О переносимости лечения судили по состоянию и поведению мышей. Состояние животных визуально оценивали ежедневно. Павших или умерщвленных передозировкой эфирного наркоза мышей подвергали аутопсии для визуального определения патологических изменений внутренних органов. Фиксировали достоверное уменьшение массы тела (≥30 %) и селезенки (косвенные признаки общей, гематологической и иммунотоксичности), а также гибель от токсичности. Сроки гибели леченых животных сравнивали с контрольной группой.

Статистический анализ данных выполняли в среде пакета IBM SPSS Statistics 21. Сравнения выполняли с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа, попарные сравнения групп по критерию Тьюки. В работе приведены среднее и среднеквадратическое отклонение ($M \pm s$). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Эффективность МГЛ на модели лимфолейкоза Р388. МГЛ *C. sporogenes* вводили в/в в дозах 50, 100, и 200 Е/кг 4-кратно с интервалом 48 ч. Пиридоксин вводили в дозах 250 или 500 мг/кг в/б одновременно с МГЛ. Терапия лимфолейкоза Р388 в изученном диапазоне доз была переносимой, но неэффективной. УПЖ_{max} – 7 %, при комбинированной терапии УПЖ_{max} – 9 %, различия статистически недостоверны. Средняя продолжительность жизни мышей, не получавших пиридоксин (n=34), составила 11,97±0,969 дней (среднее и стандартное отклонение), получавших пиридоксин в/б (n=28) – 12,61 ± 0,685 дней, получивших пиридоксин п/к (n=36) – 11,97 ± 0,878 дней, различия между группами статистически недостоверны. Переносимость всех видов лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

Эффективность МГЛ на модели лимфолейкоза L1210. МГЛ *C. sporogenes* вводили в дозах 1000 или 2000 Е/кг в/б 9- или 11-кратно с интервалом между введениями 12 ч. Терапия лимфолейкоза L1210 в изученном диапазоне доз была умеренно эффективной. Достоверный эффект в виде УПЖ=22 % наблюдался только при дозе 2000 Е/кг, демонстрируя статистически значимое увеличение продолжительности жизни против дозы 1000 Е/кг (p=0,014) и против контроля (p=0,035). Таким образом, применение МГЛ в разовой дозе 2000 Е/кг при многократном введении с интервалом 12 ч было минимально эффективным и переносимым, однако чувствительность модели L1210 к МГЛ также оказалась недостаточной.

Эффективность МГЛ на модели лимфаденоза Фишера L5178у. МГЛ вводили в разовых дозах 4000 Е/кг (в монорежиме или в сочетании с пиридоксином), 8000 Е/кг (в монорежиме или в сочетании с пиридоксином) и 16000 Е/кг в/б 9-кратно. Во всех изученных дозовых режимах терапия лимфаденоза Фишера L5178у с МГЛ *C. sporogenes* не выявила достоверного противоопухолевого эффекта. Комбинированная терапия в сочетании с пиридоксином в дозах 4000 и 8000 также не показала эффективности (p=0,060). При разовых дозах выше 4000 Е/кг, как в схемах лечения с пиридоксином, так и без него была получена выраженная токсичность с гибелью с 5-х по 14-е сут. Так, в группе мышей, получивших МГЛ в дозе 16000 Е/кг гибель наблюдалась после 4-го введения, все мыши пали на 56-е сут после трансплантации при явлениях выраженной адинамии, снижения массы тела (>20 % по сравнению с исходным уровнем), на аутопсии были выявлены признаки выраженной гепатотоксичности и перитонита. В группе мышей, получивших МГЛ в дозе 8000 Е/кг (как в монорежиме, так и в сочетании с пиридоксином), животные погибали на 9–14-е сут после трансплантации (после 8 введений), при аналогичных признаках токсичности. Использование дозы 4000 Е/кг

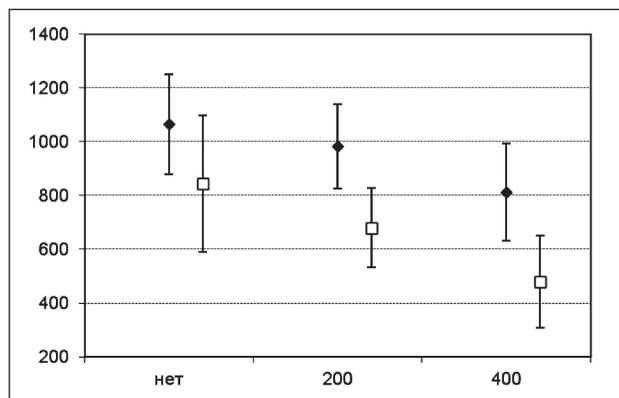


Рис. 2. Средние размеры опухолей у мышей с LLC, МГЛ или МГЛ + пиридоксин, 10-е сут, мм³, 95 % ДИ. По оси абсцисс указаны дозы МГЛ: ♦ – без пиридоксина □ – пиридоксин в дозе 250 мг/кг

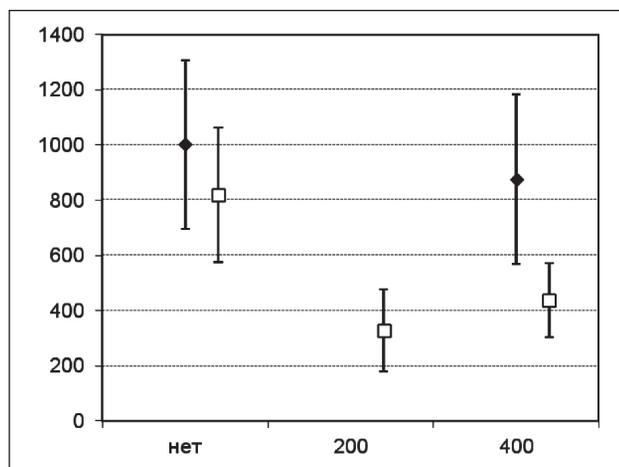


Рис. 3. Средние размеры опухолей у мышей с LLC, МГЛ *C. freundii* 200 или 400 Е/кг четырехкратно или МГЛ + пиридоксин 500 мг/кг четырехкратно, 10-е сут, мм³, 95 % ДИ. По оси абсцисс указаны дозы МГЛ: ♦ – без пиридоксина □ – пиридоксин в дозе 250 мг/кг

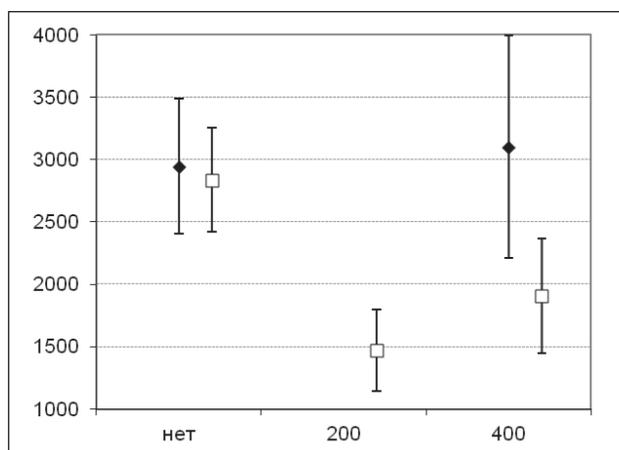


Рис. 4. Средние размеры опухолей у мышей с LLC, МГЛ 200 или 400 Е/кг четырехкратно МГЛ + пиридоксин 500 мг/кг четырехкратно, 18-е сут, мм³, 95 % ДИ. По оси абсцисс указаны дозы МГЛ: ♦ – без пиридоксина □ – пиридоксин в дозе 250 мг/кг

9-кратно не сопровождалось гибелью, но также было токсичным для животных: снижение массы тела после последнего дня лечения составило 18 % по сравнению с исходной.

Таким образом, увеличение дозы выше 4000 Е/кг в/б во много раз чаще приводило к гибели животных. Максимальная переносимая доза МГЛ *C. sporogenes* при многократном в/б введении с интервалом 24 ч, использованная для последующих экспериментов, составила 2000 Е/кг, до 10 введений. Введение пиридоксина не усугубляло токсичности МГЛ.

Эффективность МГЛ *C. sporogenes* на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC). МГЛ *C. sporogenes* вводили в дозах 200 или 400 Е/кг в/в 4-кратно с интервалом 48 ч. На модели LLC показано наличие достоверного противоопухолевого эффекта. По критерию ТРО был продемонстрирован пограничный эффект МГЛ *C. sporogenes* в разовой дозе 400 МЕ/кг в сочетании с пиридоксином в дозе 250 мг/кг (рис. 2). На 10-е сут после трансплантации опухоли одновременное введение МГЛ и пиридоксина вызывало ТРО на уровне 55 %, при этом монотерапия МГЛ или пиридоксином в аналогичных дозах и режимах применения вызывала ТРО –24 и 21 % соответственно.

Статистически значимые отличия выявлены на 10-е сут наблюдения (1-й день после окончания лечения) в группах МГЛ в дозе 400 МЕ/кг + пиридоксин 250 мг/кг ($p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой) и МГЛ в дозе 200 МЕ/кг + пиридоксин 250 мг/кг ($p = 0,019$ по сравнению с контрольной группой). Эффект в группе МГЛ в дозе 200 МЕ/кг + пиридоксин 250 мг/кг пролонгировался до 18-х сут после трансплантации (9-е сут после окончания лечения), $p = 0,02$ против контрольной группы. При попарном сравнении опытных групп достоверные отличия были выявлены для монотерапии МГЛ 200 Е/кг и комбинированной терапии МГЛ 400 Е/кг + пиридоксин ($p = 0,001$) на 10-е сут после трансплантации. Эффект МГЛ в дозе 400 МЕ/кг + пиридоксин 250 мг/кг на 10-е сут был также достоверно выше по сравнению с монотерапией пиридоксином ($p = 0,031$). Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не наблюдалось. Добавление пиридоксина значимо увеличивало эффективность МГЛ для дозы МГЛ 200 Е/кг ($p = 0,005$) и для дозы МГЛ 400 Е/кг ($p = 0,007$).

Эффективность МГЛ *C. freundii* на модели карциномы легкого Льюис LLC. Для воспроизведения эффекта МГЛ в сочетании с пиридоксином был проведен эксперимент с МГЛ *C. freundii* в дозах 200 или 400 МЕ/кг в/в и пиридоксина в дозе 500 мг/кг в/б (рис. 3, 4). Монотерапия МГЛ *C. freundii*, как и монотерапия МГЛ *C. sporogenes*, не давала достоверного эффекта на модели LLC. Добавление пиридоксина в дозе 500 мг/кг дало достоверный эффект у МГЛ *C. freundii* как в дозе

400 МЕ/кг, так и в дозе 200 МЕ/кг. Значение ТРО на 10-е сут после трансплантации (1-е сут после окончания терапии) составило 67 и 56 %, достоверное ТРО сохранялось на протяжении 18 сут после трансплантации (9-е сут после окончания лечения). Получить достоверное значение УПЖ, как и в случае с МГЛ *C. freundii*, не удалось. Двукратное увеличение разовой дозы пиридоксина в монотерапии (с 250 до 500 мг/кг) не повышало эффективности монотерапии. Эффект взаимодействия, оцененный по размерам опухоли на 18-е сут, оказался статистически значимым и свидетельствует о том, что пиридоксин уменьшает размер опухоли только при наличии МГЛ ($p=0,003$).

Как на 10-е, так и на 18-е сут после трансплантации использование комбинированной терапии МГЛ *C. freundii* давало достоверный биологически значимый эффект ($p=0,001-0,038$). Эффективность комбинированной терапии была также достоверной по отношению к монотерапии МГЛ в дозе 400 МЕ/кг, а эффект комбинированной терапии МГЛ 200 МЕ/кг + пиридоксин 500 мг/кг был также значимо выше, чем при монотерапии пиридоксином в аналогичной дозе ($p=0,016$) на 10-е сут после трансплантации (1-е сут после окончания лечения) и на 18-е сут ($p=0,003$) после трансплантации (9-е сут после окончания лечения).

Эффективность МГЛ на модели меланомы В16. МГЛ *C. sporogenes* вводили в/в или в/б 20-кратно в дозах 500, 1000 или 2000 Е/кг, интервал между введениями 12 ч. Пиридоксин вводили в дозе 300 мг/кг. Для модели меланомы В16 показана умеренная чувствительность к терапии МГЛ *C. sporogenes*. Добавление к схеме лечения пиридоксина достоверно повышало противоопухолевую активность фермента. По сравнению с контрольной группой на 10-е сут после трансплантации наблюдался достоверный значимый противоопухолевый эффект: ТРО 59 % в 1-й день после окончания лечения в группе 2000 Е/кг в/б ($p=0,045$), 53 % в 1-й день после окончания лечения в группе МГЛ 1000 Е/кг в/б + пиридоксин ($p=0,085$ различия не достоверны) и 50 % в 1-й день после окончания лечения в группе 500 Е/кг в/в + пиридоксин ($p=0,104$ различия недостоверны). Различия между группами МГЛ 1000 Е/кг в/б + пиридоксин и МГЛ 1000 Е/кг в/б были значимыми на 3-и сут после окончания лечения ($p=0,034$), что свидетельствует о влиянии пиридоксина на повышение противоопухолевой активности МГЛ при данной схеме лечения. МГЛ 500 Е/кг в/в + пиридоксин и МГЛ 500 Е/кг в/в были статистически не достоверными ($p>0,05$), что говорит о сопоставимой противоопухолевой активности МГЛ и МГЛ в сочетании с пиридоксином. На 14-й день после трансплантации (3-и сут после окончания лечения) наблюдаемый противоопухолевый эффект был менее выраженным, но в некоторых группах также достигал 35 % (в группе 2000 Е/кг в/б ($p=0,395$, различия статистически

не значимы) и 45 % в группе МГЛ 1000 Е/кг в/б + пиридоксин ($p=0,200$, различия статистически не значимы). Увеличение продолжительности жизни за счёт применения комбинированной терапии по отношению к монотерапии МГЛ не было статистически значимым.

Обсуждение

Применение в онкологии ферментных препаратов, необратимо разрушающих определенные аминокислоты, основано на метаболической специфичности некоторых опухолевых клеток, характерной особенностью которых являются отсутствие или низкая активность синтетаз определенных аминокислот [23, 24]. Среди представителей этого класса наиболее известна L-аспарагиназа *E. coli*, которая применяется для лечения острых лимфобластных лейкозов уже более 30 лет [25–27]. В последние годы выделены и изучены L-аспарагиназы из различных источников [28–30], L-лизин-альфа-оксидаза *Trichoderma cf. aureoviride Rifai* [31], L-фенилаланин-аммиакилаза [32], L-аргининдезимидаза [33] и др.

Сложность изучения противоопухолевой активности ряда ферментов определяется необходимостью наличия в среде кофермента для реализации ферментативной активности. Одним из примеров кофермента ряда ферментов, катализирующих разнообразные реакции превращений аминокислот и аминов, является ПЛФ. Молекулярные механизмы реакций, катализируемых ПЛФ, были предложены практически одновременно и независимо А.Е. Браунштейном и М.М. Шемякиным, Д. Мецлером и Э. Снеллом [34–36].

Существующего в плазме крови мышей исходного уровня ПЛФ для поддержания реакции в течение всего периода циркуляции фермента недостаточно, поэтому для выявления противоопухолевого эффекта МГЛ необходимо дополнительное введение ПЛФ [37, 38]. Базовый уровень ПЛФ в плазме крови мышей составляет 0,3 мкМ, для проявления эффекта МГЛ необходимо увеличить его концентрацию до стабильного уровня 5–10 мкМ в течение 2–5 ч после введения фермента [38]. В отсутствие дополнительного введения ПЛФ концентрация метионина снижается до <5 % исходной непосредственно после введения МГЛ в средних дозах, а инактивация МГЛ в связи с диссоциацией ПЛФ у мышей происходит через 2 ч после введения [39, 40]. В качестве возможных источников кофермента ранее были изучены подкожно имплантируемые помпы с постоянным высвобождением ПЛФ из резервуара и рацион с повышенным содержанием пиридоксина [38]. К достоинствам первой методики относятся контролируемое высвобождение ПЛФ и возможность получения постоянной прогнозируемой концентрации в плазме крови, к достоинствам второй – неинвазивность. Однако адаптация подобных методик использо-

вания МГЛ в клинической практике трудоемка и обладает крайне низкой комплаентностью: требует либо имплантации подкожной помпы, либо постоянного мониторинга уровня ПЛФ в плазме крови. В этой связи представлялась актуальной разработка простого и воспроизводимого метода оценки противоопухолевого эффекта МГЛ с использованием доступных препаратов, который может быть применен в клинической практике без опасности снижения эффективности терапии.

В такой модели в качестве источника ПЛФ может быть использован его предшественник – пиридоксин, существующий в виде препарата, разрешенного для парентерального применения у человека. В качестве базовых предпосылок при разработке модели были использованы известные параметры фармакокинетики, метаболизма и токсичности пиридоксина у мышей [38], а также возможность его применения вместе с МГЛ по примеру компонентов комбинированной терапии, что может быть относительно легко перенесено в клиническую практику.

В нашем исследовании пиридоксин был использован в качестве модификатора противоопухолевой активности МГЛ *in vivo* с целью повышения эффективности терапии. Модели гемобластозов мышей (L5178у, P388 и L1210) оказались малочувствительными к терапии МГЛ как в монорежиме, так и в сочетании с пиридоксином. Нечувствительность указанных моделей может быть объяснена как исходной их нечувствительностью к МГЛ, независимо от эффективности протекания ферментативной реакции, так и низкой использованной дозой МГЛ или недостаточностью поддерживаемой концентрации ПЛФ во время циркуляции МГЛ в плазме

крови. На модели L5178у были определены максимальные (или близкие к максимальным) переносимые дозы МГЛ при многократном введении: 2000 Е/кг в/б при 10-кратном введении.

Терапия карциномы лёгкого Льюис (LLC) и меланомы В16 показала наличие умеренной чувствительности этих моделей к препаратам МГЛ. Добавление к схеме лечения пиридоксина продемонстрировало статистически значимый синергетический эффект, что свидетельствует о повышении пиридоксином противоопухолевого эффекта МГЛ при комбинированной терапии.

Заключение

Гемобластозы мышей (лимфолейкоз P388, лимфаденоз Фишера L5178у, лимфолейкоз L1210) нечувствительны к терапии препаратами МГЛ, а дополнительное введение пиридоксина не влияет на ее эффективность. Рекомендуемая максимальная доза при изучении противоопухолевой активности МГЛ не должна превышать 2000 Е/кг при в/б введении 10-кратно. Солидные опухоли – карцинома Льюис (LLC) и меланома В16 – обладают чувствительностью к терапии препаратами из МГЛ. Дополнительное введение пиридоксина при комбинированной терапии вышеуказанных чувствительных моделей повышает её эффективность. Таким образом, при терапии чувствительных к МГЛ опухолей мышей возможно применение пиридоксина для повышения её эффективности.

Работа поддержана РФФИ – грант № 15-04-03523-а и грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых ученых МД.1780.2017.7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thomas D., Surdin-Kerjan Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997 Dec; 61 (4): 503–32.
2. Ravel S., Gakière B., Job D., Douce R. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Jun 23; 95 (13): 7805–12.
3. Sekowska A., Kung H., Danchin A. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000 Apr; 2 (2): 145–77.
4. Sugimura T., Birnbaum S.M., Winitz M., Greenstein J.P. Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 81 (2): 448–455.
5. Guo H.Y., Herrera H., Groce A., Hoffman R.M. Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer Res.* 1993; 53 (11): 2479–83.
6. Kim D.H., Muto M., Kuwahara Y., Nakanishi Y., Watanabe H., Aoyagi K., Sasaki H. Array-based comparative genomic hybridization of circulating esophageal tumor cells. *Oncol Rep.* 2006; 16 (5): 1053–1059.
7. Käck H., Sandmark J., Gibson K., Schneider G., Lindqvist Y. Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J Mol Biol.* 1999; 291: 857–876.
8. Tanaka H., Esaki N., Soda K. Versatile bacterial enzyme: L-methionine γ -Lyase. *Enzyme Microb Technol.* 1985; 7: 530–537.
9. Cellarier E., Durando X., Vasson M.P., Farges M.C., Demiden A., Maurizis J.C., Madelmont J.C., Chollet P. Methionine dependence and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews.* 2003; 29 (6): 489–499.
10. Morozova E.A., Kulikova V.V., Yashin D.V., Anufrieva N.V., Anisimova N.Y., Revtovich S.V., Demidkina T.V. Kinetic Parameters and

Cytotoxic Activity of Recombinant Methionine γ -Lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Citrobacter freundii*. *Acta Naturae.* 2013; 5 (3): 92–8.

11. Morozova E.A., Anufrieva N.V., Davydov D.Z., Komarova M.V., Dyakov I.N., Rodionov A.N., Pokrovsky V.S. Plasma methionine depletion and pharmacokinetic properties in mice of methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* and *Clostridium sporogenes*. *Biomed Pharmacother.* 2017; 5 (88): 978–984. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.127.
12. Покровский В.С., Лесная Н.А., Трецалина Е.М., Лукашева Е.В., Березов Т.Т. Перспективы разработки новых ферментных противоопухолевых препаратов. *Вопросы онкологии.* 2011; 57 (2): 155–164.
13. Покровский В.С., Трецалина Е.М. Ферментные препараты в онкогематологии: актуальные направления экспериментальных исследований и перспективы клинического применения. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2014; 7 (1): 28–38.
14. Egler R.A., Ahuja S.P., Matloub Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pharmacol Pharmacother.* 2016; 7 (2): 62–71.
15. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Veselovskiy A.V., Grishin D.V., Abakumova O.Y., Sokolov N.N. Identification of functional regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase by site-directed mutagenesis. *Mol Biotechnol.* 2015; 57 (3): 251–264. doi: 10.1007/s12033-014-9819-0.
16. Демидкина Т.В. Тирозин-фенол-лиаза: структура и функции [Дис. ... д-ра хим. наук]. [Москва]; 1998. 203.
17. Sun X., Yang Z., Li S. In vivo efficacy of recombinant methioninase is enhanced by the combination of polyethylene glycol conjugation and pyridoxal 5'-phosphate supplementation. *Cancer Res.* 2003; 63 (23): 8377–8383.

18. Yang Z., Sun X., Li S. Circulating half-life of PEGylated recombinant methioninase holoenzyme is highly dose dependent on cofactor pyridoxal-5'-phosphate. *Cancer Res.* 2004; 64 (16): 5775–5778.
19. Kokkinakis D.M., Schold S.C. Jr., Hori H., Nobori T. Effect of long-term depletion of plasma methionine on the growth and survival of human brain tumor xenografts in athymic mice. *Nutr. Cancer.* 1997; 29 (3): 195–204.
20. Yang Z., Wang J., Lu Q., Xu J., Kobayashi Y., Takakura T., Takimoto A., Yoshioka T., Lian C., Chen C., Zhang D., Zhang Y., Li S., Sun X., Tan Y., Yagi S., Frenkel E.P., Hoffman R.M. PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates. *Cancer Res.* 2004; 64: 6673–6678.
21. Furth-Walker D., Leibman D., Smolen A. Changes in pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate in blood, liver and brain in the pregnant mouse. *J Nutr.* 1989; 119 (5): 750–756.
22. Colombini C.E., McCoy E.E. Vitamin B6 metabolism. The utilization of [¹⁴C] pyridoxine by the normal mouse. 1970; 9 (3): 533–538.
23. Kreis W., Hession C. Isolation and purification of L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase (L-methioninase) from *Clostridium sporogenes*. *Cancer Res.* 1973 Aug; 33 (8): 1862–5.
24. Hori H., Takabayashi K., Orvis L., Carson D.A., Nobori T. Gene cloning and characterization of *Pseudomonas putida* L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase. *Cancer Res.* 1996; 56 (9): 2116–2122.
25. El-Sayed A.S., Shouman S.A., Nassrat H.M. Pharmacokinetics, immunogenicity and anticancer efficiency of *Aspergillus flavipes* L-methioninase. *Enzyme Microb Technol.* 2012; 51 (4): 200–210. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.06.004.
26. Huang K.Y., Hu H.Y., Tang Y.L., Xia F.G., Luo X.Q., Liu J.Z. High-level expression, purification and large-scale production of L-methionine γ -Lyase from *Ideomarina* as a novel anti-leucemic. *Mar Drugs.* 2015; 13: 5492–5507. doi: 10.3390/md13085492.
27. Machover D., Zittoun J., Broët P., Metzger G., Orrico M., Goldschmidt E., Luccioni C. Cytotoxic synergism of methioninase in combination with 5-fluorouracil and folinic acid. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61 (7): 867–876.
28. Hu J., Cheung N.K. Methionine depletion with recombinant methioninase: In vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drug. *Int. J Cancer.* 2009; 124 (7): 1700–1706. doi: 10.1002/ijc.24104.
29. Tan Y., Xu M., Guo H., Sun X., Kubota T., Hoffman R.M. Anticancer efficacy of methioninase in vivo. *Anticancer Res.* 1996; 16 (6C): 3931–3936.
30. Tan Y., Sun X., Xu M., Tan X., Sasson A., Rashidi B., Han Q., Tan X., Wang X., An Z., Sun F.X., Hoffman R.M. Efficacy of recombinant methioninase in combination with cisplatin on human colon tumors in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5 (8): 2157–2163.
31. Yoshioka T., Wada T., Uchida N., Maki H., Yoshida H., Ide N., Kasai H., Hojo K., Shono K., Maekawa R., Yagi S., Hoffman R.M., Sugita K. Anticancer efficacy in vivo and in vitro, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase. *Cancer Res.* 1998; 58 (12): 2583–2587.
32. Hoshiya Y., Kubota T., Matsuzaki S.W., Kitajima M., Hoffman R.M. Methionine starvation modulates the efficacy of cisplatin on human breast cancer in nude mice. *Anticancer Res.* 1996; 16 (6B): 3515–3517.
33. Kokkinakis D.M., Hoffman R.M., Frenkel E.P., Wick J.B., Han Q., Xu M., Tan Y., Schold S.C. Synergy between methionine stress and chemotherapy in the treatment of brain tumor xenografts in athymic mice. *Cancer Res.* 2001; 61: 4017–4023.
34. Pokrovsky V.S., Kazanov M.D., Dyakov I.N., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S. Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of different bacterial L-asparaginases. *BMC Cancer.* 2016; 16 (1): 89. doi: 10.1186/s12885-016-2125-4.
35. Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., Gubaydullin I.I., Chestukhina G.G., Ryabichenko V.V., Shtil A.A. The modified heparin-binding L-asparaginase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Biotechnol.* 2016; 58 (8–9): 528–539. doi: 10.1007/s12033-016-9950-1.
36. Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С. Физико-химические свойства и антипролиферативная активность рекомбинантной L-аспарагиназы *Yersinia pseudotuberculosis*. Прикладная биохимия и микробиология. 2013; 49 (1): 24.
37. Pokrovskaya M.V., Pokrovskiy V.S., Aleksandrova S.S., Anisimova N.Y., Andrianov R.M., Treshalina E.M., Sokolov N.N. Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry.* 2012; 6 (2): 123–131.
38. Pokrovsky V.S., Treshalina H.M., Lukashova E.V., Sedakova L.A., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Y., Berezov T.T. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* rifai BKMF-4268D. *Anticancer Drugs.* 2013; 24 (8): 846–851. doi: 10.1097/CAD.0b013e328362f2be2.
39. Babich O.O., Prosekov A.Y., Pokrovsky V.S., Sokolov N.N., Anisimova N.Y. Recombinant L-phenylalanine ammonia lyase from *Rhodospiridium toruloides* as a potential anticancer agent. *Biotechnol Appl Biochem.* 2013; 60 (3): 316–322. doi: 10.1002/bab.1089.
40. Han R.Z., Xu G.C., Dong J.J., Ni Y. Arginine deiminase: recent advances in discovery, crystal structure, and protein engineering for improved properties as an anti-tumor drug. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Jun; 100 (11): 4747–60. doi: 10.1007/s00253-016-7490-z.

Поступила 23.05.17

Принята в печать 27.07.17

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Давыдов Денис Жанович, лаборант-исследователь, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ (г. Москва, Россия). E-mail: davydov.online@gmail.com. SPIN-код: 6543-3596.

Морозова Елена Андреевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН (г. Москва, Россия). E-mail: elmorozova@yahoo.com.

Комарова Марина Валериевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры лазерных и биотехнических систем, ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава РФ Россия (г. Самара, Россия). E-mail: marinakom@yandex.ru. SPIN-код: 4359-2715.

Ануфриева Наталья Валерьевна, младший научный сотрудник, ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН (г. Москва, Россия). E-mail: lazyfox@rambler.ru. SPIN-код: 3212-7374.

Завильгельский Геннадий Борисович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ФГУП «ГосНИИгенетика» (г. Москва, Россия). E-mail: gzavilgel@yandex.ru

Демидкина Татьяна Викторовна, заведующая лабораторией химических основ биокатализа, ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН Россия (г. Москва, Россия).

Трещалина Елена Михайловна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ (г. Москва, Россия). E-mail: treshalina@yandex.ru. SPIN-код: 7230-1364

Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, ФГУП «ГосНИИгенетика». МФТИ (г. Москва, Россия). E-mail: manukhovi@mail.ru. SPIN-код: 3711-4901.

Покровский Вадим Сергеевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией комбинированной терапии опухолей, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ (г. Москва, Россия). E-mail: vadimpokrovsky@gmail.com. SPIN-код: 4552-1226.

USE OF PYRIDOXINE TO INCREASE ANTICANCER ACTIVITY OF METHIONINE-GAMMA-LYASE IN MURINE CANCER MODELS

D.Zh. Davydov¹, E.A. Morozova², M.V. Komarova³, N.V. Anufrieva²,
G.B. Zavilgelsky⁴, I.V. Manukhov^{4,5}, T.V. Demidkina², E.M. Treshchalina¹,
V.S. Pokrovsky¹

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia¹
23, Kashirskoe shosse, 115478-Moscow, Russia. E-mail: davydov.online@gmail.com¹
V.A. Engelgardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia²
32, Vavilova Street, 119991-Moscow, Russia. E-mail: elmorozova@yahoo.com²
Samara State Medical University, Samara, Russia³
89, Chapaevskaya Street, 443099-Samara, Russia. E-mail: marinakom@yandex.ru³
State Research Institute of Genetics, Moscow, Russia. E-mail: gzavilgel@yandex.ru⁴
1, Fist Dorozhny proezd, 117545-Moscow, Russia⁴
Laboratory of Molecular Genetics, Dolgoprudny, Moscow region, Russia⁵
9, Institut'skiy per., 141700-Dolgoprudny, Moscow region, Russia. E-mail: manukhovi@mail.ru⁵

Abstract

We presented results of monotherapy and combination therapy of transplantable murine tumor models using methionine-gamma-lyase (MGL) and pyridoxine hydrochloride. We studied MGL from *Clostridium sporogenes* and *Citrobacter freundii*. We used Lewis lung carcinoma (LLC), melanoma B16, leukemias P388 and L1210 and Fisher lymphadenosis L5178y. Neither monotherapy with MGL nor combination of MGL and pyridoxine demonstrated antitumor activity against P388 and L5178y. In the murine L1210 leukemia model, MGL *C. sporogenes* injected intraperitoneally in the dose of 2000 U/kg, 11 times with a 12-hour interval increased the life span of mice (ILS=22 %, p=0.035). In the LLC model, the combination of MGL *C. sporogenes* at a dose of 400 U/kg, i.p., 4 times with a 48-hour interval and pyridoxine at a dose of 250 mg/kg led to tumor growth inhibition (TGI=55 %, p<0.001) on the first day after the completion of treatment. Monotherapy with MGL or pyridoxine in the same regimens resulted in a 24 % TGI (p=0.263) or 21 % TGI (p=0.410), respectively. In a pair-wise comparison of treatments, MGL + pyridoxine was more effective compared to MGL used alone (p=0.061) and MGL + pyridoxine was more effective than pyridoxine alone (p=0.031). MGL from *C. freundii* at a dose of 200 U/kg, 4 times with a 48-hour interval plus pyridoxine at a dose of 500 mg/kg injected on day 9 after the completion of treatment led to 50 % TGI, whereas MGL monotherapy at a single dose of 400 U/kg or pyridoxine monotherapy in the same regimen showed 5 % TGI (p=0.991) and 4 % TGI (p=0.998), respectively. The pair-wise comparison showed that MGL (200 U/kg) + pyridoxine was more effective than MGL (400 U/kg) alone (p<0.001) and pyridoxine alone (p=0.003). In the B16 model, the combination of MGL injected i.p at a dose of 2000 U/kg and pyridoxine at a dose of 300 mg/kg showed 56 % TGI on day 1 after the completion of treatment (p=0.045) and 35 % TGI on day 3 (p=0.038). Pyridoxine significantly increased the anticancer effect of MGL: MGL 1000 U/kg i.p and MGL 1000 U/kg i.p. + pyridoxine 300 mg/kg led to TGI=45 % (p=0.034) on day 3 after the completion of treatment. Single maximum tolerated dose after multiple i.p. administration was defined as 2000 U/kg, simultaneous administration of pyridoxine did not increase the toxicity of MGL. In conclusion, LLC and B16 are sensitive to MGL treatment, and pyridoxine may increase the efficacy of MGL.

Key words: methionine-gamma-lyase, MGL, pyridoxine, anticancer enzyme, Lewis lung carcinoma, B16 melanoma, P388 leukemia, L5178y.

REFERENCES

1. Thomas D., Surdin-Kerjan Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997 Dec; 61 (4): 503–32.
2. Ravel S., Gakière B., Job D., Douce R. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Jun 23; 95 (13): 7805–12.
3. Sekowska A., Kung H., Danchin A. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000 Apr; 2 (2): 145–77.
4. Sugimura T., Birnbaum S.M., Winitz M., Greenstein J.P. Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Arch Biochem Bioophys.* 1959; 81 (2): 448–455.
5. Guo H.Y., Herrera H., Groce A., Hoffman R.M. Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer Res.* 1993; 53 (11): 2479–83.
6. Kim D.H., Muto M., Kuwahara Y., Nakanishi Y., Watanabe H., Aoyagi K., Sasaki H. Array-based comparative genomic hybridization of circulating esophageal tumor cells. *Oncol Rep.* 2006; 16 (5): 1053–1059.
7. Käck H., Sandmark J., Gibson K., Schneider G., Lindqvist Y. Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J Mol Biol.* 1999; 291: 857–876.
8. Tanaka H., Esaki N., Soda K. Versatile bacterial enzyme: L-methionine γ -Lyase. *Enzyme Microb Technol.* 1985; 7: 530–537.
9. Cellarier E., Durando X., Vasson M.P., Farges M.C., Demiden A., Maurizis J.C., Madelmont J.C., Chollet P. Methionine dependence and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews.* 2003; 29 (6): 489–499.
10. Morozova E.A., Kulikova V.V., Yashin D.V., Anufrieva N.V., Anisimova N.Y., Revtovich S.V., Demidkina T.V. Kinetic Parameters and Cytotoxic Activity of Recombinant Methionine γ -Lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Citrobacter freundii*. *Acta Naturae.* 2013; 5 (3): 92–8.
11. Morozova E.A., Anufrieva N.V., Davydov D.Z., Komarova M.V., Dyakov I.N., Rodionov A.N., Pokrovsky V.S. Plasma methionine depletion and pharmacokinetic properties in mice of methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* and *Clostridium sporogenes*. *Biomed Pharmacother.* 2017; 5 (88): 978–984. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.127.
12. Pokrovsky V.S., Lesnaya N.A., Treshchalina E.M., Lukasheva E.V., Beregov T.T. Prospects for developing new enzyme antitumor drugs. *Problems in Oncology.* 2011; 57 (2): 155–164. [in Russian]

13. Pokrovsky V.S., Treshchalina E.M. Enzyme drugs in hematological oncology: current trends of experimental research and prospects of clinical application. *Clinical Hematological Oncology. Basic Research and Clinical Practice*. 2014; 7 (1): 28–38. [in Russian]
14. Egler R.A., Ahuja S.P., Matloub Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pharmacol Pharmacother*. 2016; 7 (2): 62–71.
15. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Veselovskiy A.V., Grishin D.V., Abakumova O.Y., Sokolov N.N. Identification of functional regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase by site-directed mutagenesis. *Mol Biotechnol*. 2015; 57 (3): 251–264. doi: 10.1007/s12033-014-9819-0.
16. Demidkina T.V. Tyrosine-phenol-lyase: structure and functions. [Abstract of doctoral thesis]. [Moscow]; 1998. 203. [in Russian]
17. Sun X., Yang Z., Li S. In vivo efficacy of recombinant methioninase is enhanced by the combination of polyethylene glycol conjugation and pyridoxal 5'-phosphate supplementation. *Cancer Res*. 2003; 63 (23): 8377–8383.
18. Yang Z., Sun X., Li S. Circulating half-life of PEGylated recombinant methioninase holoenzyme is highly dose dependent on cofactor pyridoxal-5'-phosphate. *Cancer Res*. 2004; 64 (16): 5775–5778.
19. Kokkinakis D.M., Schold S.C. Jr., Hori H., Nobori T. Effect of long-term depletion of plasma methionine on the growth and survival of human brain tumor xenografts in athymic mice. *Nutr. Cancer*. 1997; 29 (3): 195–204.
20. Yang Z., Wang J., Lu Q., Xu J., Kobayashi Y., Takakura T., Takimoto A., Yoshioka T., Lian C., Chen C., Zhang D., Zhang Y., Li S., Sun X., Tan Y., Yagi S., Frenkel E.P., Hoffman R.M. PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates. *Cancer Res*. 2004; 64: 6673–6678.
21. Furth-Walker D., Leibman D., Smolen A. Changes in pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate in blood, liver and brain in the pregnant mouse. *J Nutr*. 1989; 119 (5): 750–756.
22. Colombini C.E., McCoy E.E. Vitamin B6 metabolism. The utilization of [¹⁴C] pyridoxine by the normal mouse. 1970; 9 (3): 533–538.
23. Kreis W., Hession C. Isolation and purification of L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase (L-methioninase) from *Clostridium sporogenes*. *Cancer Res*. 1973 Aug; 33 (8): 1862–5.
24. Hori H., Takabayashi K., Orvis L., Carson D.A., Nobori T. Gene cloning and characterization of *Pseudomonas putida* L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase. *Cancer Res*. 1996; 56 (9): 2116–2122.
25. El-Sayed A.S., Shouman S.A., Nassrat H.M. Pharmacokinetics, immunogenicity and anticancer efficiency of *Aspergillus flavipes* L-methioninase. *Enzyme Microb Technol*. 2012; 51 (4): 200–210. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.06.004.
26. Huang K.Y., Hu H.Y., Tang Y.L., Xia F.G., Luo X.Q., Liu J.Z. High-level expression, purification and large-scale production of L-methionine γ -Lyase from *Ideomarina* as a novel anti-leucemic. *Mar Drugs*. 2015; 13: 5492–5507. doi: 10.3390/md13085492.
27. Machover D., Zittoun J., Broët P., Metzger G., Orrico M., Goldschmidt E., Luccioni C. Cytotoxic synergism of methioninase in combination with 5-fluorouracil and folinic acid. *Biochem Pharmacol*. 2001; 61 (7): 867–876.
28. Hu J., Cheung N.K. Methionine depletion with recombinant methioninase: In vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drug. *Int. J. Cancer*. 2009; 124 (7): 1700–1706. doi: 10.1002/ijc.24104.
29. Tan Y., Xu M., Guo H., Sun X., Kubota T., Hoffman R.M. Anticancer efficacy of methioninase in vivo. *Anticancer Res*. 1996; 16 (6C): 3931–3936.
30. Tan Y., Sun X., Xu M., Tan X., Sasson A., Rashidi B., Han Q., Tan X., Wang X., An Z., Sun F.X., Hoffman R.M. Efficacy of recombinant methioninase in combination with cisplatin on human colon tumors in nude mice. *Clin. Cancer Res*. 1999; 5 (8): 2157–2163.
31. Yoshioka T., Wada T., Uchida N., Maki H., Yoshida H., Ide N., Kasai H., Hojo K., Shono K., Maekawa R., Yagi S., Hoffman R.M., Sugita K. Anticancer efficacy in vivo and in vitro, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase. *Cancer Res*. 1998; 58 (12): 2583–2587.
32. Hoshiya Y., Kubota T., Matsuzaki S.W., Kitajima M., Hoffman R.M. Methionine starvation modulates the efficacy of cisplatin on human breast cancer in nude mice. *Anticancer Res*. 1996; 16 (6B): 3515–3517.
33. Kokkinakis D.M., Hoffman R.M., Frenkel E.P., Wick J.B., Han Q., Xu M., Tan Y., Schold S.C. Synergy between methionine stress and chemotherapy in the treatment of brain tumor xenografts in athymic mice. *Cancer Res*. 2001; 61: 4017–4023.
34. Pokrovsky V.S., Kazanov M.D., Dyakov I.N., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S. Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of different bacterial L-asparaginases. *BMC Cancer*. 2016; 16 (1): 89. doi: 10.1186/s12885-016-2125-4.
35. Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., Gubaydulina I.I., Chestukhina G.G., Ryabichenko V.V., Shtil A.A. The modified heparin-binding L-asparaginase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Biotechnol*. 2016; 58 (8–9): 528–539. doi: 10.1007/s12033-016-9950-1.
36. Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S. Physical and chemical properties and antiproliferative activity of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. *Appl Biochem Microbiol*. 2013; 49(1): 24. [in Russian]
37. Pokrovskaya M.V., Pokrovskiy V.S., Aleksandrova S.S., Anisimova N.Y., Andrianov R.M., Treshchalina E.M., Sokolov N.N. Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry*. 2012; 6 (2): 123–131.
38. Pokrovsky V.S., Treshalina H.M., Lukasheva E.V., Sedakova L.A., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Y., Berezov T.T. Enzymatic properties and anticancer activity of l-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* rifai BKMF-4268D. *Anticancer Drugs*. 2013; 24 (8): 846–851. doi: 10.1097/CAD.0b013e328362f8e2.
39. Babich O.O., Prosekov A.Y., Pokrovsky V.S., Sokolov N.N., Anisimova N.Y. Recombinant L-phenylalanine ammonia lyase from *Rhodospiridium toruloides* as a potential anticancer agent. *Biotechnol Appl Biochem*. 2013; 60 (3): 316–322. doi: 10.1002/bab.1089.
40. Han R.Z., Xu G.C., Dong J.J., Ni Y. Arginine deiminase: recent advances in discovery, crystal structure, and protein engineering for improved properties as an anti-tumor drug. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Jun; 100 (11): 4747–60. doi: 10.1007/s00253-016-7490-z.

Received 23.05.17
Accepted 27.07.17

ABOUT THE AUTHORS

Denis Zh. Davydov, Researcher, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: davydov.online@gmail.com. SPIN-code: 6543-3596.

Elena A. Morozova, PhD, Senior Researcher, V.A. Engelgardt Institute of Molecular Biology (Moscow, Russia). E-mail: elmorozova@yahoo.com. SPIN-code: 9143-9540

Marina V. Komarova, PhD, Associate Professor of the Department of Laser and Biotechnical Systems, Samara State Medical University (Samara, Russia). E-mail: marinakom@yandex.ru. SPIN-код: 4359-2715.

Natalia V. Anufrieva, Researcher, V.A. Engelgardt Institute of Molecular Biology (Moscow, Russia). E-mail: lazyfox@rambler.ru. SPIN-code: 3212-7374.

Gennady B. Zavilgeisky, DSc, Senior Researcher, State Research Institute of Genetics (Moscow, Russia). E-mail: gzavilgel@yandex.ru

Tatiana V. Demidkina, Head of the Laboratory of Chemical Bases of Biocatalysis, V.A. Engelgardt Institute of Molecular Biology (Moscow, Russia).

Elene M. Treshchalina, MD, DSc, Senior Researcher, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: treshalina@yandex.ru. SPIN-code: 7230-1364

Илья V. Manukhov, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, State Research Institute of Genetics (Moscow, Russia). E-mail: manukhovi@mail.ru. SPIN-код: 3711-4901.

Vadim S. Pokrovsky, MD, DSc, Head of the Laboratory of Combination Therapy for Tumors, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: vadimpokrovsky@gmail.com. SPIN-code: 4552-1226.