

MITOMYCIN C IN THE TREATMENT OF URETHRIC STRICTURE AND ITS EFFECT ON ARGINASE/NO-SYNTHASE SYSTEM

Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Lviv, Ukraine)

kaf_medicalbiology@meduniv.lviv.ua

*Mitomycin C is an antibiotic produced by the culture of the fungus *Streptomyces caespitosus*. The primary mechanism of action of the drug is associated with the formation of cross-links between DNA strands that inhibit the action of helicase. This antibiotic is often used to prevent and treat scarring, including urethral strictures, which are one of the complications of surgery. It is known that a large number of antibiotics and cytostatics can also affect the regulatory systems of cells. An essential regulatory system is the nitric oxide system. The aim of the study was to determine the status of arginase / NO-synthase enzymes in peripheral blood lymphocytes under the action of mitomycin C. The study was performed on peripheral blood lymphocytes of almost healthy men. It has been shown that mitomycin C in concentrations of 10^{-6} – 10^{-3} M dose-dependently leads to an increase in arginase activity. In parallel with the increase in arginase activity, corresponding changes in the activity of the constitutive and inducible isoforms of NO synthase were revealed. Thus, under the action of mitomycin C at a concentration of 10^{-6} M, the activity of cNOS decreased 1.4 times relative to the control values, and the activity of iNOS is practically undetectable. When studying the effect of mitomycin C on the activity of iNOS lymphocytes, its activation was not observed, and the inhibitory effect could not be determined due to low activity. Oxidative stress was used to induce iNOS activity by preincubating blood lymphocytes with H₂O₂. Preincubation of lymphocytes with 0.2 mM H₂O₂ leads to increased iNOS activity by 22.4 times. Against the background of activation of iNOS by hydrogen peroxide, mitomycin C at a concentration of 10^{-6} M leads to an inhibition of enzyme activity by 1.4 times.*

Thus, the data on the mechanism of action of mitomycin C used in the treatment of urethral stricture indicate its additional effect on regulatory systems of the cell, in particular, disruption of arginase / NO-synthase system of blood lymphocytes, leading to an imbalance of regulatory systems of lymphocytes and regulatory function nitric oxide.

Key words: urethral stricture, mitomycin C, arginase, NO synthase.

Relationship of the publication with the planned research works. This work is a fragment of the research «Molecular genetics, immunological and biochemical factors for the prediction of urological diseases» (№ state registration 0118U 000107) and «Development of prognostic and diagnostic immunobiochemical criteria for exposure to extreme factors of different nature» (№ state registration 021U 100163).

Introduction. Urethral stricture is a common and complex urological pathology that is difficult to reconstruct and often relapses [1–5]. It is a pathological narrowing of the urethra, both congenital and acquired. The disease can occur due to injury or inflammation and lead to urination disorders as a result of narrowing of the urethral lumen. This disease occurs in 1–2 % of men and in recent decades, has been growing steadily [3, 5].

Risk factors for urethral stricture include old age, sexually transmitted infections, complications after radical or radiation treatment of prostate cancer, etc. [2, 4].

The pathogenesis of urethral stricture is based on damage to the epithelium of the urethra and the adjacent part of the spongy body, followed by squamous cell metaplasia, changes in the extracellular matrix of spongy urethral tissue and the development of spongiofibrosis [2, 4]. Normal connective tissue of the urethral wall is replaced by dense fibrous.

These changes decrease the proportion of smooth muscle tissue and collagen in the spongy body and scar progression [4]. This process is associated with tissue

hypoxia and inhibition of nitric oxide (NO) synthesis [4].

To reduce the frequency of relapses, some authors use pharmacological drugs with anticollagen and antifibroblast effects, particularly the cytostatic mitomycin C [6–8].

Mitomycin is an antitumor antibiotic derived from cultures of *Streptomyces caespitosus* [9, 10]. An alkylating agent inhibits DNA synthesis (and, at higher concentrations, RNA and protein synthesis) by cross-linking complementary strands of the DNA double helix [10]. This makes mitomycin a relatively unique microbiota-derived drug in treating tumors and scar tissue [9, 11]. Mitomycin has also been shown *in vitro* to inhibit the proliferation of B cells, T cells, and macrophages and disrupt antigen presentation and interferon secretion of gamma, TNF α , and IL-2, ie have some effect on the immune system, including blood lymphocytes [4, 11, 12]. Mitomycin C also induces genotoxic stress in endothelial cells, associated with the corresponding expression of proinflammatory cytokines [12].

Mitomycin C is commonly used to treat bladder cancer, but it has been increasingly used to treat postoperative scarring [6, 9, 13].

Since there is evidence of the involvement of nitric oxide in the formation of urethral strictures [4, 14, 15], it seems relevant to investigate the functioning of the arginase/NO-synthase system under the action of mitomycin, which is used to prevent scarring.

Nitric oxide (NO) is a messenger molecule with numerous molecular targets and controls virtually

all cellular functions, including vascular tone, gene transcription, mRNA translation, post-translational protein modification, etc. [14]. An essential method of inactivating NO is its reaction with superoxide anion ($O_2^- \bullet$) with the formation of powerful oxidant peroxynitrite ($ONOO^-$). This compound can cause oxidative damage, nitration and S-nitrosylation of biomolecules, including proteins, lipids and DNA. Nitrosative stress from $ONOO^-$ was involved in the breakdown of single-stranded DNA.

In mammals, NO can be formed by three different isoforms of NO synthase (NOS) – endothelial and neuronal, which belong to the constitutive forms (expressed constantly) and inducible, the synthesis of which is caused by proinflammatory cytokines in various inflammatory diseases. All NOS isoforms use L-arginine as a substrate and molecular oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) as substrates.

The aim of the work is to determine the state of enzymes of the arginase-NO-synthase system in peripheral blood lymphocytes under the action of mitomycin C.

Object and methods of research. Studies have been performed on peripheral blood lymphocytes of almost healthy men, as lymphocytes are considered a «metabolic mirror» of the body and respond quickly to all external and internal influences on the body.

Peripheral blood lymphocytes were isolated by a modified method of Boyum A. [16]. Blood diluted 1: 1 with saline was layered in a density gradient of phycol-triombast ($\rho = 1.08 \text{ g/cm}^3$) and centrifuged for 20 minutes at 500 g. The removed interphase rings of mononuclear cells were washed twice within 10 minutes with a physiological solution [16]. After the last centrifugation, a small amount of physiological solution was added to the precipitate, resuspended and the number of living and dead cells in Goryaev's chamber was counted with trypan blue [16]. The integrity and viability of blood lymphocytes in all experiments was at least 95 %. In addition, 0.2 % saponin was added to the suspension to permeabilize blood lymphocyte membranes and reveal latent enzymatic activities [17, 18].

Peripheral blood lymphocyte arginase activity was determined by the formation of urea, the content of which was measured using a diagnostic kit according to the manufacturer's instructions (Simko, Ukraine). Arginase activity was calculated and expressed in nanomoles of urea / min per 1 mg of total protein in the sample [19].

The activity of Ca^{2+} -dependent constitutive NO synthase was determined by the oxidation of NADPH (H) in the presence of 10 mM $CaCl_2$ [20]. The activity of Ca^{2+} -independent iNOS was determined similarly by adding a selective inhibitor of the inducible isoform aminoguanidine instead of $CaCl_2$ to the incubation medium. NO synthase activity was expressed in

nanomoles of oxidized NADPH (H⁺)/min per 1 mg of total protein in the sample.

Variational and statistical data processing was performed using the software package for *Microsoft Excel* personal computers. Basic statistical indicators such as arithmetic mean (M) and standard error (m) were determined. The results are presented as the arithmetic mean (M) $\pm$ standard error of the mean (m). The number of experiments (n) corresponds to the number of subjects studied in each case (each time used sperm obtained from one patient or a virtually healthy donor).

The reliability of changes between the statistical characteristics of two alternative sets of parametric data was determined by Student's t-test. Critical levels of reliability in testing statistical hypotheses in studies were taken as 0.95, 0.99 and 0.999.

All studies were conducted with the proper permission of the Commission on Bioethical Expertise of Danylo Halytsky Lviv National Medical University and patients' written consent.

Research results and their discussion. Studies of arginase activity in cells, in particular peripheral blood lymphocytes, under the action of mitomycin C are virtually absent, although in the literature, mitomycin C affects the production of interleukins and proliferation of immunocompetent cells [12]. It is shown that mitomycin C in concentrations of 10^{-6} – 10^{-3} M dose-dependently leads to an increase in arginase activity in peripheral blood lymphocytes (**fig. 1**). At 10^{-6} M concentration of the drug – 1.2 times, from (126.2 ± 13.3) to (151.4 ± 13.9) nmol urea/min mg of protein, and at 10^{-3} M concentration to (188.5 ± 13.4) nmol urea/min mg protein, ie 1.5 times relative to control ($p < 0.05$).

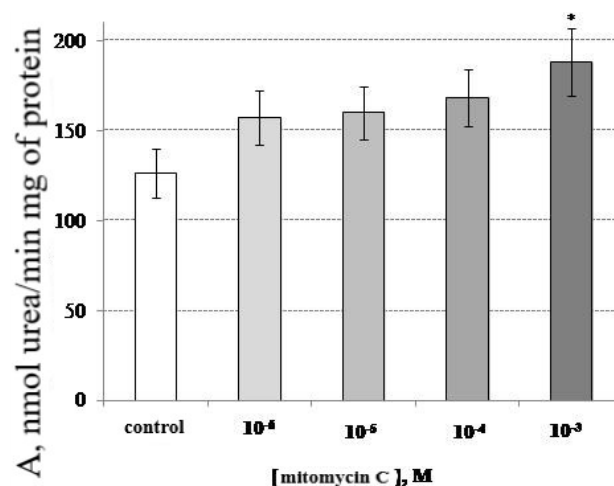


Figure 1 – Arginase activity of blood lymphocytes under the action of different concentrations of mitomycin C ($M \pm m$, $n=5$).

Notes: * $p < 0.05$ – changes are statistically significant for control.

Simultaneously with the increase in arginase activity, corresponding changes in the activity of the constitutive isoform of NO synthase were revealed. Thus, it is shown that in control, this activity in lymphocytes is (71.4 ± 6.9), and the activity of the inducible isoform (1.58 ± 0.18)

nmol NADPH (H^+)/min per 1 mg of protein (fig. 2). Under the action of mitomycin C at a concentration of 10^{-6} M, the activity of cNOS decreased 1.4 times ($p < 0.05$) relative to control values, and the activity of iNOS is practically undetectable.

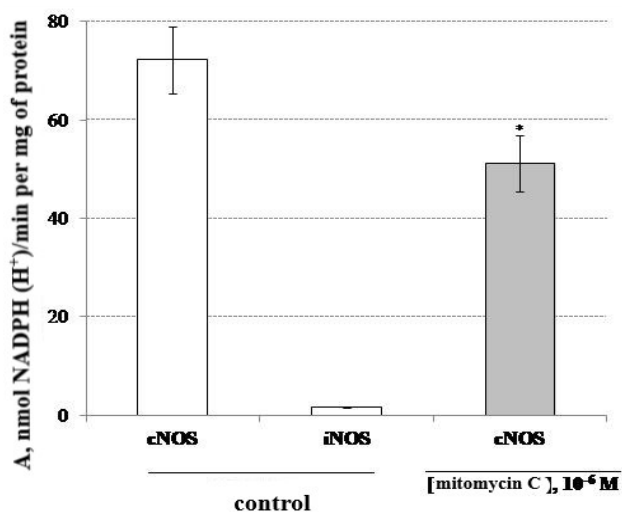


Figure 2 – Activity of constitutive and inducible isoforms of NO-synthase of peripheral blood lymphocytes under the action of mitomycin C ($M \pm m$, $n=5$).

Notes: * $p < 0.05$ – changes are statistically significant for control.

When studying the effect of mitomycin C on the activity of iNOS lymphocytes isolated from the blood of almost healthy men, its activation was not observed, and the inhibitory effect could not be determined due to low activity. Oxidative stress-induced iNOS activity in blood lymphocytes by preincubating H_2O_2 lymphocytes. Preincubation of lymphocytes with 0.2 mM H_2O_2 leads to an increase in iNOS activity by 22.4 times, from (1.57 ± 0.17) to (35.2 ± 0.28) nmol NADPH (H^+)/min per 1mg of protein (fig. 3). Against the background of activation of iNOS by hydrogen peroxide, mitomycin C at a concentration of 10^{-6} M leads to inhibition of enzyme activity by 1.4 times ($p < 0.05$).

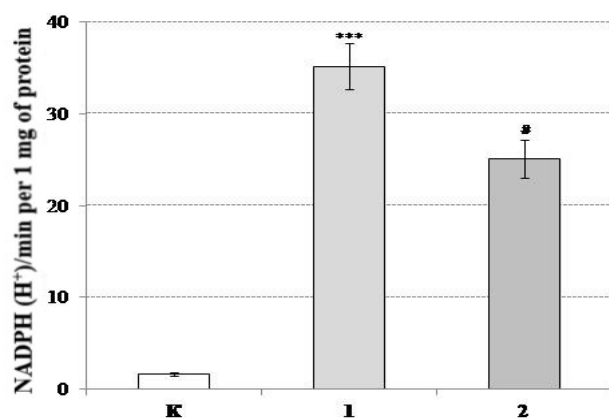


Figure 3 – Effect of mitomycin C (10^{-6} M) on the activity of the inducible isoform of NO synthase in peripheral blood lymphocytes under conditions of H_2O_2 -induced stress ($M \pm m$, $n=5$).

Notes: K – control; 1 – in the presence of H_2O_2 in the incubation medium; 2 – in the presence of H_2O_2 + mitomycin C; *** $p < 0.001$ – changes are statistically significant with respect to control; # $p < 0.05$ – changes are statistically significant for 1.

It has been shown that mitomycin C in concentrations of 10^{-6} – 10^{-3} M dose-dependently leads to inhibition of the activity of both isoforms of NO synthase in peripheral blood lymphocytes (fig. 4). To assess the variability of changes in NO-synthase activity under the action of mitomycin C, the parameters of their inhibition were determined by linearizing the obtained dose-effect curves in logarithmic Hill coordinates: $(\lg[(A_0 - A)/A] = -n_H \lg I_{0.5} + n_H \lg [I])$, where A_0 and A are the specific enzymatic activity in the absence and presence of inhibitor in concentration I in the incubation medium (table).

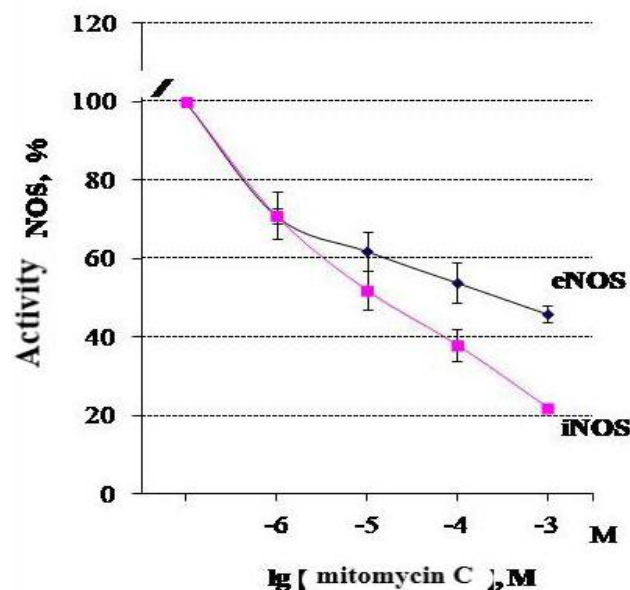


Figure 4 – Activity of constitutive and inducible isoforms of NO-synthase of blood lymphocytes under the action of different concentrations of mitomycin C ($M \pm m$, $n=5$).

Table – Values of constants of constitutive and inducible isoforms of NO-synthase of blood lymphocytes under the action of different concentrations of mitomycin C ($M \pm m$, $n=5$)

Inhibition parameters	cNOS	iNOS
Half-inhibition constant I_{50} (M)	$3,24 \cdot 10^{-5} \pm 3,56 \cdot 10^{-6}$	$8,48 \cdot 10^{-8} \pm 5,65 \cdot 10^{-9}$
Hill coefficient	$0,32 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$

For the constitutive isoform of NO synthase, there is a lower degree of mitomycin C inhibition, ie cNOS of blood lymphocytes has a lower sensitivity to mitomycin C than iNOS. iNOS is characterized by a more significant inhibitory effect of mitomycin C, so a small introduction of the active substance into the incubation medium is required to reduce the activity of iNOS blood lymphocytes by 50 %. This plays an important role because the inducible form of iNOS can produce NO in quantities that significantly exceed the amount of NO formed cNOS. Therefore, inhibition of iNOS activity activated under oxidative stress by low concentrations of mitomycin can significantly limit the overproduction of NO. At the same time, the Hill coefficient was significantly higher for cNOS than for iNOS, indicating a

higher positive cooperative binding between mitomycin C and the constitutive isoform of NOS.

It should be noted that similar results in modulating the arginase / NO synthase system with mitomycin C have been obtained in other sites. Thus, the relationship between the effects of mitomycin C, nitric oxide and oxidative stress on FancC – / – Cells culture cells has been shown [15].

It is shown that many pathophysiological processes are accompanied by deregulation of arginase / NOS balance, disturbance of homeostasis and functionality of the organism. Increased arginase expression is associated with several pathological processes ranging from cardiovascular, immune-mediated, and tumor conditions to neurodegenerative disorders [21].

Arginase inhibits the production of NO by several potential mechanisms, including competition with NO synthase (NOS) for the substrate L-arginine, separation of NOS, which leads to the interaction of NO and superoxide and the formation of peroxynitrite, inhibition of translation and stability of inducible protein activity of inducible NOS by urea formation and sensitization of NOS to its endogenous inhibitor, asymmetric dimethyl-L-arginine [22–24]. Increased arginase activity inhibits

endothelial NOS-mediated NO synthesis and may contribute to endothelial dysfunction in hypertension, aging, reperfusion ischemia, and diabetes mellitus [24].

Conclusions. Our results on the action of mitomycin C in the treatment of urethral stricture indicate an additional effect on the regulatory system of the cell, in particular, disruption of the arginase / NO-synthase system of blood lymphocytes, leading to an imbalance of lymphocyte regulatory systems and NO regulatory function. Decreased H₂O₂-induced iNOS activity by mitomycin C suggests that these antibiotics may prevent NO overproduction in blood lymphocytes. Nitric oxide, which is produced in excess in pathological conditions of the body, has a pronounced cytotoxic effect due to the formation of peroxynitrite – a product of the interaction of NO and superoxidanion-radical, capable of destroying almost all components of the cell. It is likely that one of the mechanisms of action of mitomycin C is a decrease in hyperproduction of NO.

Prospects for further research. In the future it is planned to study the effect of mitomycin C on the activity of Ca²⁺ -transport systems of cells and the role of ionized Ca²⁺ in the mechanism of action of this antibiotic.

References

1. Palminteri E, Berdondini E, Verze P, De Nunzio C, Vitarelli A, Carmignani L. Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world. *Urology*. 2013;81(1):191–196. DOI: 10.1016/j.urology.2012.08.062.
2. Maciejewski C, Rourke K. Imaging of urethral stricture disease. *Transl. Urol.* 2015;4(1):2–9. DOI: 10.3978/j.issn.2223–4683.2015.02.03.
3. Rourke KF, Welk B, Kodama R, Bailly G, Davies T, Santesso N, et al. Canadian Urological Association guideline on male urethral stricture. *Can. Urol. Assoc. J.* 2020;14(10):305–316. DOI: 10.5489/cuaj.6792.
4. Sinel'nikov LM, Protoshchak VV, Shestayev AY, Babkin PA, Barannikov MV, Kislycin PO. Striktura uretry: sovremennoye sostoyaniye problemy. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Urologiya*. 2016;2:80–87. [in Russian].
5. Smith TG. Current management of urethral stricture disease. *Indian J. Urol.* 2016;32:27–33. DOI: 10.4103/0970–1591.173108.
6. Vanni AJ, Zinman LN, Buckley JC. Radial urethrotomy and intralesional mitomycin C for the management of recurrent bladder neck contractures. *J. Urol.* 2011;186(1):156–160. DOI: 10.1016/j.juro.2011.03.019.
7. Noureldin YA, Abdallah Fathy A, Ahmed S, Ali S, Saki Z, Sebaey A. Intralesional injection of mitomycin C following internal urethrotomy of denovo bulbar urethral stricture: New experience using a novel adjustable-tip needle. *Arab. Journal of Urology*. 2021;19(4):473–479. DOI: <https://doi.org/10.1080/2090598X.2021.1891688>.
8. Park JJ, Kuo TL, Chapple CR. Mitomycin C in the treatment of anterior urethral strictures. *Nature Reviews Urology*. 2018;15:717–718. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0102-1>.
9. Kurt O, Gevher F, Yazic CM, Erboğa M, Dogru M, Aktas C. Effect of mitomycin – C and triamcinolone on preventing urethral strictures. *Int. Braz. J. Urol.* 2017;43(5):939–945. DOI: 10.1590/S 1677–5538.IBJU.2016.0191.
10. Lee YJ, Park SJ, Ciccone SL, Kim CR, Lee SH. An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):446–53.
11. Al-Otaibi WA, Alkhatib MH, Wali AN. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in breast and cervical cancer cells upon coadministration of mitomycin C and essential oils in nanoemulsion formulations. *Biomed. Pharmacother.* 2018;106:946–955.
12. Sinitsky MY, Kutikhin A, Tsepokina A, Shishkova DK, Ponasenkov AV. Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutation Research*. 2020; 858–860. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2020.503252.
13. Granada JF, Ensenat D, Keswani AN, Kaluza GL, Raizner AE, Liu XM, et al. Single Perivascular Delivery of Mitomycin C Stimulates p21 Expression and Inhibits Neointima Formation in Rat Arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25:2343–2348.
14. Forstermann U, Sessa WS. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012;33:829–837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304.
15. Biswas P, Patra B and Verma RS. Nitric Oxide Increases Mitomycin-C Cytotoxicity by Generation of Reactive Oxygen Species and Induces Cell Death by Apoptosis in FancC-/- Cells. *Ann. Hematol. Oncol.* 2021;8(8):1–6.
16. Lapovets' L, Lutsyk B. Laboratorna imunohiyya. K.: Aral; 2004. 173 s. [in Ukrainian].
17. Vorobets Z, Kimakovich O. Effect of proton pump blocker on enzyme activity of glutathione antioxidant system of the peripheral blood lymphocytes. *Annales Universitatis Mariae-Sklodowska*. 2006;19(1):131–134.
18. Fafula RV, Yefremova UR, Mel'nyk OV, Vorobets' ZD, Kulachkovs'kyi OR. Metodolohichnyy pidkhid do vyvchennya enzymatychnoho spektru limfotsytiv pry patolohichnykh stanakh z vykorystannyam deterhenta saponinu (ul'trastrukturne doslidzhennya). *Visnyk Problem Biolohiyi ta Medytsyny*. 2012;4(96):163–166. [in Ukrainian].
19. Shugaley VS, Kozina AS. Soderzhaniye mocheviny i aktivnost' arginazy v organakh krysa pri akklimatizatsii k kholodu. *Fiziol. Zhurn. SSSR*. 1977;8:1199–1202. [in Russian].

20. Giraldez RR, Zweier JL. An improved assay for measurement of nitric oxide synthase activity in biological tissues. *Anal. Biochem.* 1998;261(1):29–35. DOI: 10.1006/abio.1998.2721.
21. Clemente GS, van Waarde A, Domling A, Elsinga PH. Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(5291):2–36. DOI: 10.3390/ijms 21155291.
22. Chicoine LG, Paffet ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004;287: L60-L68.
23. Xu W, Kaneko T, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary artery hypertension. *FASEB J.* 2004;18:1746–1748.
24. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007;34(9):906–911. DOI: 10.1111/j.1440–1681.2007.04638.x.

МІТОМІЦИН С В ЛІКУВАННІ СТРИКТУРИ УРЕТРИ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА АРГІНАЗА/НО-СИНТАЗНУ СИСТЕМУ

Шеремета Д.Р., Сverdан О.П., Воробець Д.З., Фафула Р.В., Воробець З.Д.

Резюме. Мітоміцин С застосовується для лікування чи попередження формування рубцевих змін, зокрема уретральних стриктур, в постопераційний період. В залежності від локалізації оперативного поля його вводять внутрішньовенно, внутрішньоміхурово, внутрішньочеревно, так і місцево. Рубцеві зміни є одним із ускладнень оперативних втручань. Препарат мітоміцин С має виражені антифіброblastичні властивості та перешкоджає утворенню колагену у тканинах. Однак, відомо, що великий ряд антибіотиків і цитостатиків може також впливати на регуляторні системи клітин. Важливою регулятором системою є система оксиду азоту, до якої входять такі ферменти як аргіназа та окремі ізоформи NO-синтаз. Виходячи з того метою роботи було з'ясування стану ферментів аргінази/NO-синтазної системи системи в лімфоцитах периферичної крові при дії мітоміцину С.

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові практично здорових чоловіків, оскільки вони вважаються «метаболічним дзеркалом» організму та оперативно реагують на всі зовнішні та внутрішні впливи на організм. Показано, що мітоміцин С у концентраціях 10^{-6} – 10^{-3} М дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності в лімфоцитах периферичної крові. При 10^{-6} М концентрації препарату – в 1,2 раза, а при 10^{-3} М концентрації в 1,5 раза щодо контролю.

Паралельно зі зростанням активності аргінази, виявлені відповідні зміни в активності конститутивної ізоформи NO-синтази. Так, показано, що у контролі її активність в лімфоцитах складає ($71,4 \pm 6,9$), а активність індукційної ізоформи ($1,58 \pm 0,18$) нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну. За дії мітоміцину С в концентрації 10^{-6} М активність cNOS знижувалась в 1,4 раза, щодо контрольних значень, а активність iNOS практично не детектується. При вивченні впливу мітоміцину С на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових чоловіків, її активації ми не спостерігали, а інгібуючий ефект неможливо було визначити через низьку активність. Для індукції активності iNOS в лімфоцитах крові використовували оксидативний стрес, преінкубуючи лімфоцити крові з H_2O_2 . Преінкубація лімфоцитів із 0,2 мМ H_2O_2 призводить до зростання активності iNOS в 22,4 раза. На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, мітоміцин С в концентрації 10^{-6} М призводить до інгібування активності ферменту в 1,4 раза.

Таким чином, отримані нами результати щодо механізму дії мітоміцину С, що застосовується в лікуванні стриктури уретри, вказують на додатковий вплив на регуляторні системи клітини, зокрема, порушення аргінази/NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що призводить до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів і регуляторної функції NO. Ймовірно, що одним із механізмів дії мітоміцину С є зниження гіперпродукції NO.

Ключові слова: стриктура уретри, мітоміцин С, аргіназа, NO-синтаза.

MITOMYCIN C IN THE TREATMENT OF URETHRIC STRICTURE AND ITS EFFECT ON ARGINASE/NO-SYNTHASE SYSTEM

Sheremeta D.R., Sverdhan O.P., Vorobets D.Z., Fafula R.V., Vorobets Z.D.

Abstract. Mitomycin C is used to treat or prevent scar formation, urethral strictures in particular, in the postoperative period. Depending on the location of operating field, it is administered intravenously, intravesically, intraperitoneally, and topically. Cicatricial changes are one of the postoperative complications. Mitomycin C has significant anti-fibroblastic properties and prevents collagen production in tissues. However, it is known that a wide range of antibiotics and cytostatics can also affect the cell regulatory systems. The nitric oxide system is an important regulatory system, which includes enzymes such as arginase and certain nitric oxide synthase isoforms.

The objective of the study is to determine the effect of mitomycin C on the enzymes of arginase/ NO synthase system activity. The research was performed on peripheral blood lymphocytes obtained from practically healthy men as they are considered as «metabolic mirror» of organism and they respond quickly to all external and internal influences on the body. It has been shown that mitomycin C at concentrations of 10^{-6} – 10^{-3} M caused a dose-dependent increase in arginase activity in peripheral blood lymphocytes. At drug concentration of 10^{-6} M – by 1.2 times, at drug concentration of 10^{-3} M – by 1.5 times compared to the control values.

In parallel with the increase in arginase activity, the corresponding changes in the activity of constitutive isoform of nitric oxide synthase were revealed. It has been shown that activity in control lymphocytes is (71.4 ± 6.9), and the inducible isoform activity is (1.58 ± 0.18) nmol NADPH/(H^+)/min per 1 mg of protein. Under effect of mitomycin C at concentration of 10^{-6} M cNOS activity was decreasing by 1.4 times concerning control values, iNOS activity is almost

undetectable. When studying the effect of mitomycin C on iNOS activity in lymphocytes, isolated from the blood of practically healthy men, we did not observe its activity, and the inhibitory effect could not be determined due to its low activity. Oxidative stress was used to induce iNOS activity in blood lymphocytes with H₂O₂ lymphocytes preincubation. Lymphocytes preincubation with 0.2 mM H₂O₂ leads to an increase in iNOS by 22.4 times. By activation of iNOS with hydrogen peroxide, 10⁻⁶ M concentration of mitomycin C leads to inhibition of enzyme activity by 1.4 times.

Thus, the results we obtained concerning the mechanism of action of mitomycin C, that is used to treat urethral strictures, indicate an additional effect on the cell regulatory systems in particular a disorder of arginase/NO-synthase system of blood lymphocytes that leads to disbalance of lymphocytes regulatory system and the regulatory function of NO. Presumably, one of the mechanisms of action of mitomycin C is the decrease in NO hyperproduction.

Key words: urethral stricture, mitomycin C, arginase, NO synthase.

ORCID and contributionship:

Sheremeta D.R.: — ^{BD}

Sverdau O.P.: 0000–0003–3227–296X ^{BD}

Vorobets D.Z.: 0000–0002–8431–5151 ^E

Fafula R.V.: 0000–0002–0121–9093 ^C

Vorobets Z.D.: 0000–0001–6016–0186 ^{AF}

Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

Corresponding author

Vorobets Zinovy Dmytrovykh

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

Ukraine, 79010, Lviv, 69 Pekarska str

Tel.: +380674943154

E-mail: kaf_medicalbiology@meduniv.lviv.ua

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article.

Received 29.11.2021

Accepted 06.05.2022

DOI 10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-276-287

УДК 615.273.3:616.62:577.151.042]-055.1

Шеремета Д.Р., Свердан О.П., Воробець Д.З., Фафула Р.В., Воробець З.Д.

МІТОМІЦІН С В ЛІКУВАННІ СТРИКТУРИ УРЕТРИ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА АРГІНАЗА/NO-СИНТАЗНУ СИСТЕМУ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів, Україна)

kaf_medicalbiology@meduniv.lviv.ua

Мітоміцин С – антибіотик, що продукується культурою грибів Streptomyces caespitosus. Основний механізм дії препарату пов'язаний з утворенням поперечних зшивок між нитками ДНК, що перешкоджають дії гелікази. Цей антибіотик часто використовується для попередження та лікування рубцевих змін, зокрема уретральних стриктур, які є одним із ускладнень оперативних втручань. Відомо, що великий ряд антибіотиків і цитостатиків може впливати також на регуляторні системи клітин. Важливою регуляторною системою є система оксиду азоту. Метою дослідження було з'ясування стану ензимів аргіназа/NO-синтазної системи в лімфоцитах периферичної крові при дії мітоміцину С. Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові практично здорових чоловіків. Показано, що мітоміцин С у концентраціях 10⁻⁶–10⁻³ М дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності. Паралельно зі зростанням активності аргінази, виявлені відповідні зміни в активності конститутивної та індукційної ізоформи NO-синтази. Так, за дії мітоміцину С в концентрації 10⁻⁶ М активність cNOS знижувалась в 1,4 раза, щодо контрольних значень, а активність iNOS практично не детектується. При вивченні впливу мітоміцину С на активність iNOS лімфоцитів, її активації ми не спостерігали, а інгібуючий ефект неможливо було визначити через низьку активність. Для індукції активності iNOS використовували оксидативний стрес, преінкубуючи лімфоцити крові з H₂O₂. Преінкубація лімфоцитів із 0,2 мМ H₂O₂ призводить до зростання активності iNOS в 22,4 раза. На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, мітоміцин С в концентрації 10⁻⁶ М призводить до інгібування активності ензиму в 1,4 раза.

Таким чином, отримані дані щодо механізму дії мітоміцину С, що застосовується в лікуванні стриктури уретри, вказують на додатковий його вплив на регуляторні системи клітини, зокрема, порушення аргіназа/NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що призводить до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів і регуляторної функції оксиду азоту.

Ключові слова: стриктура уретри, мітоміцин С, аргіназа, NO-синтаза.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дана робота є фрагментом НДР «Молекулярно-генетичні, імунологічні та біохімічні фактори прогнозування урологічних захворювань» (№ державної реєстрації 0118U 000107) і «Розробка прогностичних і діагностичних імунобіохімічних критеріїв за дії на організм екстремальних чинників різної природи (№ державної реєстрації 021U 100163).

Вступ. Стриктура уретри – розповсюджена та складна урологічна патологія, що важко піддається реконструктивному лікуванню і часто рецидивує [1–5]. Вона являє собою патологічне звуження сечовипускного каналу, яке буває як вродженим, так і набутим. Хвороба може виникати в результаті травми чи запального процесу і призводить до розладів сечовипускання в результаті звуження просвіту уретри. Це захворювання зустрічається в 1–2 % чоловіків і в останні десятиліття неухильно зростає [3, 5].

До факторів ризику розвитку стриктури уретри відносять похилий вік, перенесені інфекції, що передаються статевим шляхом, ускладнення після радикального чи променевого лікування рака простати тощо [2, 4].

В основі патогенезу стриктури уретри лежить пошкодження епітелію сечовипускного каналу та прилеглої частини спонгіозного тіла з наступною плоскоклітинною метаплазією, змінами позаклітинного матриксу спонгіозної тканини уретри та розвитком спонгіофіброзу [2, 4]. Нормальна сполучна тканина стінки сечовипускного каналу заміщується щільно-волокнистою. Ці зміни призводять до зниження частки гладком'язевої тканини та колагену в спонгіозному тілі та рубцевої прогресії [4]. Припускається, що цей процес пов'язаний із гіпоксією тканини та інгібуванням синтезу оксиду азоту (NO) [4].

Для зниження частоти рецидивів ряд авторів застосовує фармакологічні препарати, що володіють антиколагеновим та антифіброblastним ефектами, зокрема цитостатик мітоміцин С [6–8].

Мітоміцин – це протипухлинний антибіотик отриманий з культур *Streptomyces caespitosus* [9, 10]. Це алкілюючий агент, який інгібує синтез ДНК (і, у більш високих концентраціях, синтез РНК і протеїнів) шляхом перехресного зшивання комплементарних ланцюгів подвійної спіралі ДНК [10]. Це робить мітоміцин відносно унікальним отриманим з мікробіоти фармпрепаратом у лікуванні пухлинних новоутворень та рубцевих тканин [9, 11]. Було також показано, що мітоміцин *in vitro* пригнічує проліферацію В-клітин, Т-клітин і макрофагів і порушує презентацію антигену, а також секрецію інтерферону

гамма, TNFα та IL-2, тобто спричиняє певний вплив на імунну систему, зокрема лімфоцити крові [4, 11, 12]. Мітоміцин С індукує також генотоксичний стрес в ендотеліальних клітинах, що асоційовано з відповідною експресією прозапальних цитокінів [12].

Мітоміцин С зазвичай використовується для лікування раку сечового міхура, але в останні роки його все частіше застосовують для лікування постопераційного рубцювання тканин [6, 9, 13].

Оскільки є дані про участь оксиду азоту у формуванні стриктури уретри [4, 14, 15], видається актуальним дослідити функціонування аргіназа/NO-синтазної системи при дії мітоміцину, що використовують для запобігання рубцювання тканин.

Відомо, що оксид азоту (NO) – це молекула-месенджер, яка має численні молекулярні мішені та контролює практично всі клітинні функції, зокрема судинний тонус, транскрипцію генів, трансляцію мРНК, забезпечує пост-трансляційну модифікацію протеїнів тощо [14]. Важливим способом інактивації NO є його реакція з супероксид-аніоном ($O_2^{\bullet-}$) з утворенням потужного окиснювача пероксинітриту ($ONOO^-$). Ця сполука може спричинити окисне пошкодження, нітрування та S-нітрозилювання біомолекул, включаючи протеїни, ліпіди та ДНК. Нітрозативний стрес від $ONOO^-$ був причетний до розриву одноланцюгової ДНК.

У ссавців NO може утворюватися трьома різними ізоформами NO-синтази (NOS) – ендотеліальною та нейрональною, що належать до конститутивних форм (експресуються постійно) та індукцибельної, синтез якої спричиняється прозапальними цитокінами при різних запальних захворюваннях. Усі ізоформи NOS використовують L-аргінін як субстрат, а молекулярний кисень і відновлений нікотинамід-аденін-динуклеотидфосфат (НАДФН) як субстрати.

Мета роботи – з'ясування стану ензимів аргіназо-NO-синтазної системи в лімфоцитах периферичної крові при дії мітоміцину С.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові практично здорових чоловіків, оскільки лімфоцити вважаються «метаболічним дзеркалом» організму та оперативно реагують на всі зовнішні та внутрішні впливи на організм.

Лімфоцити периферичної крові виділяли за модифікованим методом Boynt A. [16]. Кров, розведену в співвідношенні 1:1 фізіологічним розчином, нашої розробки у градієнті густини фікол-тріумбасту ($\rho=1,08 \text{ г/см}^3$) й центрифугували 20 хвилин при 500 г. Зняті інтерфазні кільця мононуклеарних клітин двічі відмивали впродовж 10 хвилин фізіологічним розчином [16]. Після останнього центрифугування до осаду додавали невелику кількість фізіологічного

розчину, ресуспензували та за допомогою трипанового синього проводили підрахунок кількості живих і мертвих клітин в камері Горяєва [16]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів крові в усіх дослідках становила не менше 95 %. Для пермеабілізації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентних ензиматичних активностей до суспензії додавали 0,2 % сапонін [17, 18].

Активність аргінази лімфоцитів периферичної крові визначали за утворенням сечовини, вміст якої вимірювали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Simko, Україна). Активність аргінази обчислювали і виражали у наномолях сечовини/хв на 1 мг загального протеїну у пробі [19].

Активність Ca^{2+} -залежної конститутивної NO-синтази визначали за окисненням NADPH(H) за наявності 10 мМ CaCl_2 [20]. Активність Ca^{2+} -незалежної iNOS визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище селективний інгібітор індукційної ізоформи аміногуанідин замість CaCl_2 . Активність NO-синтази виражали в наномолях окисненого NADPH(H^+)/хв на 1 мг загального протеїну у пробі.

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M) та стандартну похибку (m). Результати представлені як середнє арифметичне (M) $\pm$ стандартна похибка середнього (m). Кількість дослідів (n) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували сперматозоїди отримані від одного пацієнта або практично здорового донора).

Достовірність змін між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей параметричних даних встановлювали за t-критерієм Стьюдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали рівними 0,95, 0,99 та 0,999.

Усі дослідження проводилися з належного дозволу Комісії з питань біоетичної експертизи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та з письмової згоди пацієнтів.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження активності аргінази у клітинах, зокрема лімфоцитах периферичної крові, при дії мітоміцину С практично відсутні, хоча як свідчать дані літератури мітоміцин С впливає на продукування інтерлейкінів і проліферацію імунотропних клітин [12].

Показано, що мітоміцин С у концентраціях 10^{-6} – 10^{-3} М дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності в лімфоцитах периферичної крові (рис. 1). При 10^{-6} М концентрації препарату – в 1,2 раза, з $(126,2 \pm 13,3)$ до $(151,4 \pm 13,9)$ нмоль сечовини/хв·мг протеїну, а при 10^{-3} М концентрації до $(188,5 \pm 13,4)$ нмоль сечовини/хв·мг протеїну, тобто в 1,5 раза щодо контролю ($p < 0,05$).

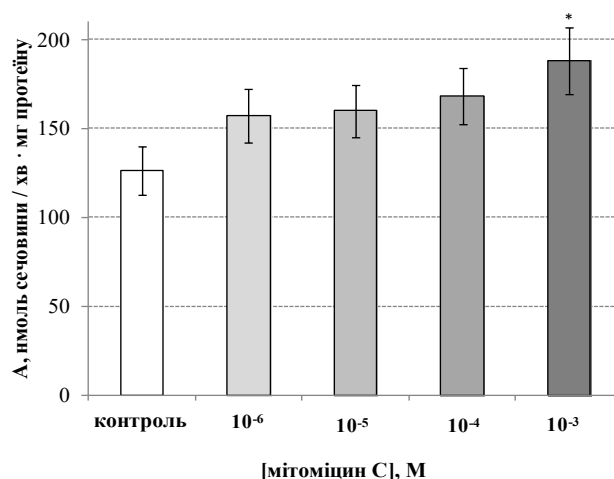


Рисунок 1 – Аргіназна активність лімфоцитів крові за дії різних концентрацій мітоміцину С ($M \pm m$, $n=5$).

Примітки: * $p < 0,05$ – зміни статистично вірогідні стосовно контролю.

Одночасно зі зростанням активності аргінази, виявлені відповідні зміни в активності конститутивної ізоформи NO-синтази. Так, показано, що в контролі ця активність в лімфоцитах складає $(71,4 \pm 6,9)$, а активність індукційної ізоформи $(1,58 \pm 0,18)$ нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну (рис. 2). За дії мітоміцину С в концентрації 10^{-6} М активність cNOS знижувалась в 1,4 раза ($p < 0,05$) щодо контрольних значень, а активність iNOS практично не детектується.

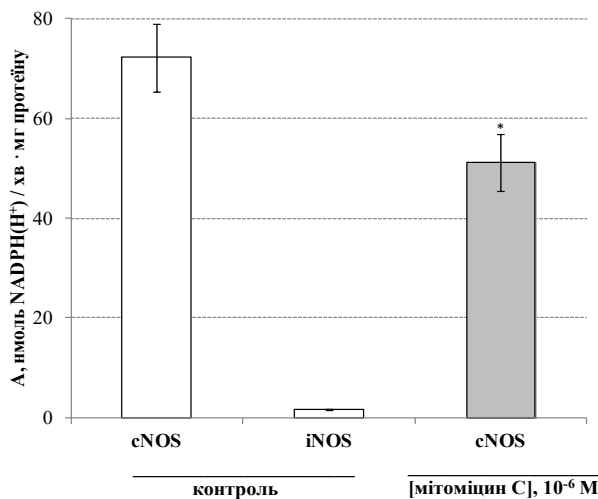


Рисунок 2 – Активність конститутивної та індукційної ізоформ NO-синтази лімфоцитів периферичної крові за дії мітоміцину С ($M \pm m$, $n=5$).

Примітки: * $p < 0,05$ – зміни статистично вірогідні стосовно контролю.

При вивченні впливу мітоміцину С на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових чоловіків, її активації ми не спостерігали, а інгібуючий ефект неможливо було визначити через низьку активність. Для індукції активності iNOS в лімфоцитах крові використовували оксидативний стрес, преінкубуючи лімфоцити з H_2O_2 . Преінкубація лімфоцитів із 0,2 мМ H_2O_2 призводить до зростання активності iNOS в 22,4 раза, з

($1,57 \pm 0,17$) до ($35,2 \pm 0,28$) нмоль NADPH(H^+)/хв на 1мг протеїну (рис. 3). На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, мітоміцин С в концентрації 10^{-6} М призводить до інгібування активності ензиму в 1,4 раза ($p < 0,05$).

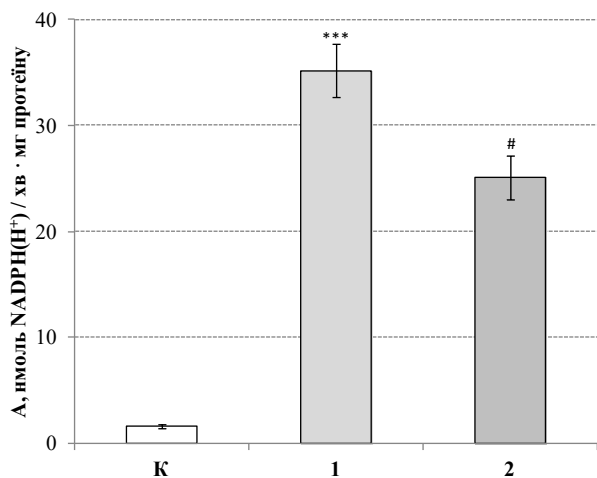


Рисунок 3 – Вплив мітоміцину С (10^{-6} М) на активність індукційної ізоформи NO-синтази в лімфоцитах периферичної крові за умов H_2O_2 -індукованого стресу ($M \pm m$, $n=5$).
Примітки: К – контроль; 1 – за присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі; 2 – за присутності H_2O_2 + мітоміцин С; *** $p < 0,001$ – зміни статистично вірогідні стосовно контролю; # $p < 0,05$ – зміни статистично вірогідні стосовно 1.

Показано, що мітоміцин С у концентраціях 10^{-6} – 10^{-3} М дозозалежно призводить до пригнічення активності обох ізоформ NO-синтази в лімфоцитах периферичної крові (рис. 4). Для оцінки характеристики варіабельності змін NO-синтазної активності за умов дії мітоміцину С визначено параметри їх інгібування, шляхом лінеаризації одержаних кривих доза-ефект у логарифмічних координатах Хілла: $\lg[(A_0 - A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [I]$, де A_0 і A – питома ензимна активність за відсутності і присутності інгібітора у концентрації I в середовищі інкубації (табл.).

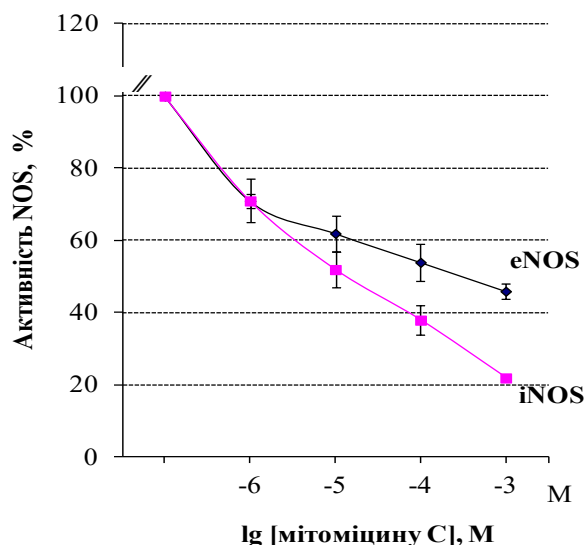


Рисунок 4 – Активність конститутивної та індукційної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові за дії різних концентрацій мітоміцину С ($M \pm m$, $n=5$).

Таблиця – Значення констант конститутивної та індукційної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові за дії різних концентрацій мітоміцину С ($M \pm m$, $n=5$)

Параметри інгібування	cNOS	iNOS
Константа напівінгібування I_{50} (М)	$3,24 \cdot 10^{-5} \pm 3,56 \cdot 10^{-6}$	$8,48 \cdot 10^{-8} \pm 5,65 \cdot 10^{-9}$
Коефіцієнт Хілла	$0,32 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$

Для конститутивної ізоформи NO-синтази відмічається менший ступінь інгібування мітоміцином С, тобто cNOS лімфоцитів крові володіє нижчою чутливістю до мітоміцину С, ніж iNOS. Для iNOS характерний більший інгібувальний вплив мітоміцином С, тому необхідне невелике введення діючої речовини в середовищі інкубації, щоб знизити активність iNOS лімфоцитів крові на 50 %. Ця має вагомий роль, адже індукційна форма iNOS здатна продукувати NO в кількостях, які значно перевищують кількість NO утвореного cNOS. Тому пригнічення активності iNOS активованої в умовах оксидативного стресу низькими концентраціями мітоміцину здатне суттєво обмежити гіперпродукцію NO. Водночас коефіцієнт Хілла був вірогідно вищим для cNOS, ніж для iNOS, що вказує на вище позитивне кооперативне зв'язування між мітоміцином С та конститутивною ізоформою NOS.

Слід відмітити, що подібні результати щодо модулювання аргіназа/NO-синтазної системи мітоміцином С отримані і на інших об'єктах. Так, показано взаємозв'язок між ефектами мітоміцину С, оксидом азоту та оксидативним стресом на культуральних клітинах FancC-/- Cells [15].

Показано, що ряд патофізіологічних процесів супроводжуються дерегулюванням балансу аргінази/NOS, порушенням гомеостазу та функціональності організму. Підвищена експресія аргінази пов'язані з кількома патологічними процесами, які можуть варіюватися від серцево-судинних, імунітопосередкованих, і пухлинних станів до нейродегенеративних розладів [21].

Аргіназа пригнічує продукування NO за допомогою кількох потенційних механізмів, включаючи конкуренцію з NO-синтазою (NOS) за субстрат L-аргінін, роз'єднання NOS, що призводить до взаємодії NO і супероксиду та утворення пероксинітриду, пригнічення трансляції та стабільності індукційного протеїну NOS, інгібування активності індукційної NOS шляхом утворення сечовини та сенсibilізації NOS до його ендogenous інгібітора, асиметричного диметил-L-аргініну [22–24]. Зростання активності аргінази пригнічує ендотеліальний NOS-опосередкований синтез NO і може сприяти ендотеліальній дисфункції при гіпертонії, старінні, ішемії-реперфузії та цукровому діабеті [24].

Висновки. Отримані нами результати щодо дії мітоміцину С, що застосовується в лікуванні стриктури уретри, вказують на додатковий вплив на регуляторні системи клітини, зокрема, порушення аргі-

наза/NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що призводить до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів і регуляторної функції NO. Зниження індукованої H_2O_2 активності iNOS за дії мітоміцину С свідчить про те, що ці антибіотики можуть запобігати гіперпродукції NO в лімфоцитах крові. Оксид азоту, що продукується у надмірній кількості при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриду – продукту

взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини. Ймовірно, що одним із механізмів дії мітоміцину С є зниження гіперпродукції NO.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується вивчення впливу мітоміцину С на активність Ca^{2+} -транспортуючих систем клітин і ролі іонізованого Ca^{2+} в механізмі дії цього антибіотика.

Література

1. Palminteri E, Berdondini E, Verze P, De Nunzio C, Vitarelli A, Carmignani L. Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world. *Urology*. 2013;81(1):191–196. DOI: 10.1016/j.urology.2012.08.062.
2. Maciejewski C, Rourke K. Imaging of urethral stricture disease. *Transl. Urol.* 2015;4(1):2–9. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.02.03.
3. Rourke KF, Welk B, Kodama R, Bailly G, Davies T, Santesso N, et al. Canadian Urological Association guideline on male urethral stricture. *Can. Urol. Assoc. J.* 2020;14(10):305–316. DOI: 10.5489/cuaj.6792.
4. Sinel'nikov LM, Protoshchak VV, Shestayev AY, Babkin PA, Barannikov MV, Kislycin PO. Striktura uretry: sovremennoye sostoyaniye problemy. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Urologiya*. 2016;2:80–87. [in Russian].
5. Smith TG. Current management of urethral stricture disease. *Indian J. Urol.* 2016;32:27–33. DOI: 10.4103/0970-1591.173108.
6. Vanni AJ, Zinman LN, Buckley JC. Radial urethrotomy and intralesional mitomycin C for the management of recurrent bladder neck contractures. *J. Urol.* 2011;186(1):156–160. DOI: 10.1016/j.juro.2011.03.019.
7. Noureldin YA, Abdallah Fathy A, Ahmed S, Ali S, Saki Z, Sebaey A. Intralesional injection of mitomycin C following internal urethrotomy of denovo bulbar urethral stricture: New experience using a novel adjustable-tip needle. *Arab. Journal of Urology*. 2021;19(4):473–479. DOI: <https://doi.org/10.1080/2090598X.2021.1891688>.
8. Park JJ, Kuo TL, Chapple CR. Mitomycin C in the treatment of anterior urethral strictures. *Nature Reviews Urology*. 2018;15:717–718. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0102-1>.
9. Kurt O, Gevher F, Yazic CM, Erboglu M, Dogru M, Aktas C. Effect of mitomycin – C and triamcinolone on preventing urethral strictures. *Int. Braz. J. Urol.* 2017;43(5):939–945. DOI: 10.1590/S 1677-5538.IBJU.2016.0191.
10. Lee YJ, Park SJ, Ciccone SL, Kim CR, Lee SH. An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):446–53.
11. Al-Otaibi WA, Alkhatib MH, Wali AN. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in breast and cervical cancer cells upon coadministration of mitomycin C and essential oils in nanoemulsion formulations. *Biomed. Pharmacother.* 2018;106:946–955.
12. Sinitsky MY, Kutikhin A, Tsepokina A, Shishkova DK, Ponasenko AV. Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutation Research*. 2020; 858–860. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2020.503252.
13. Granada JF, Ensenat D, Keswani AN, Kaluza GL, Raizner AE, Liu XM, et al. Single Perivascular Delivery of Mitomycin C Stimulates p21 Expression and Inhibits Neointima Formation in Rat Arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25:2343–2348.
14. Forstermann U, Sessa WS. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012;33:829–837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs304.
15. Biswas P, Patra B and Verma RS. Nitric Oxide Increases Mitomycin-C Cytotoxicity by Generation of Reactive Oxygen Species and Induces Cell Death by Apoptosis in FancC-/- Cells. *Ann. Hematol. Oncol.* 2021;8(8):1–6.
16. Lapovets' L, Lutsyk B. Laboratorna imunohiyya. K.: Aral; 2004. 173 s. [in Ukrainian].
17. Vorobets Z, Kimakovich O. Effect of proton pump blocker on enzyme activity of glutathione antioxidant system of the peripheral blood lymphocytes. *Annales Universitatis Mariae-Skłodowska*. 2006;19(1):131–134.
18. Fafula RV, Yefremova UR, Mel'nyk OV, Vorobets' ZD, Kulachkovs'kyi OR. Metodolohichnyy pidkhid do vyvchennya enzymatichnoho spektru limfotsytiv pry patolohichnykh stanakh z vykorystannyam deterhenta saponinu (ul'trastrukturne doslidzhennya). *Visnyk Problem Biologiyi ta Medytsyny*. 2012;4(96):163–166. [in Ukrainian].
19. Shugaley VS, Kozina AS. Soderzhaniye mocheviny i aktivnost' arginazy v organakh krysa pri akklimatizatsii k kholodu. *Fiziol. Zhurn. SSSR*. 1977;8:1199–1202. [in Russian].
20. Giraldez RR, Zweier JL. An improved assay for measurement of nitric oxide synthase activity in biological tissues. *Anal. Biochem.* 1998;261(1):29–35. DOI: 10.1006/abio.1998.2721.
21. Clemente GS, van Waarde A, Domling A, Elsinga PH. Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(5291):2–36. DOI: 10.3390/ijms 21155291.
22. Chicoine LG, Paffet ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004;287: L60-L68.
23. Xu W, Kaneko T, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary artery hypertension. *FASEB J.* 2004;18:1746–1748.
24. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007;34(9):906–911. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x.

МІТОМІЦИН С В ЛІКУВАННІ СТРИКТУРИ УРЕТРИ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА АРГІНАЗА/НО-СИНТАЗНУ СИСТЕМУ

Шеремета Д.Р., Свєрдан О.П., Воробець Д.З., Фафула Р.В., Воробець З.Д.

Резюме. Мітоміцин С застосовується для лікування чи попередження формування рубцевих змін, зокрема уретральних стриктур, в постопераційний період. В залежності від локалізації оперативного поля його вводять внутрішньовенно, внутрішньоміхурово, внутрішньочеревно, так і місцево. Рубцеві зміни є одним із ускладнень

оперативних втручань. Препарат мітоміцин С має виражені антифіброblastичні властивості та перешкоджає утворенню колагену у тканинах. Однак, відомо, що великий ряд антибіотиків і цитостатиків може також впливати на регуляторні системи клітин. Важливою регуляторною системою є система оксиду азоту, до якої входять такі ензими як аргіназа та окремі ізоформи NO-синтаз. Виходячи з того метою роботи було з'ясування стану ензимів аргіназа/NO-синтазної системи системи в лімфоцитах периферичної крові при дії мітоміцину С.

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові практично здорових чоловіків, оскільки вони вважаються «метаболічним дзеркалом» організму та оперативно реагують на всі зовнішні та внутрішні впливи на організм. Показано, що мітоміцин С у концентраціях 10^{-6} – 10^{-3} М дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності в лімфоцитах периферичної крові. При 10^{-6} М концентрації препарату – в 1,2 раза, а при 10^{-3} М концентрації в 1,5 раза щодо контролю.

Паралельно зі зростанням активності аргінази, виявлені відповідні зміни в активності конститутивної ізоформи NO-синтази. Так, показано, що у контролі її активність в лімфоцитах складає ($71,4 \pm 6,9$), а активність індукбельної ізоформи ($1,58 \pm 0,18$) нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну. За дії мітоміцину С в концентрації 10^{-6} М активність cNOS знижувалась в 1,4 раза, щодо контрольних значень, а активність iNOS практично не детектується. При вивченні впливу мітоміцину С на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових чоловіків, її активації ми не спостерігали, а інгібуючий ефект неможливо було визначити через низьку активність. Для індукування активності iNOS в лімфоцитах крові використовували оксидативний стрес, преінкубуючи лімфоцити крові з H_2O_2 . Преінкубація лімфоцитів із 0,2 мМ H_2O_2 призводить до зростання активності iNOS в 22,4 раза. На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, мітоміцин С в концентрації 10^{-6} М призводить до інгібування активності ензиму в 1,4 раза.

Таким чином, отримані нами результати щодо механізму дії мітоміцину С, що застосовується в лікуванні стриктури уретри, вказують на додатковий вплив на регуляторні системи клітини, зокрема, порушення аргіназа/NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що призводить до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів і регуляторної функції NO. Ймовірно, що одним із механізмів дії мітоміцину С є зниження гіперпродукування NO.

Ключові слова: стриктура уретри, мітоміцин С, аргіназа, NO-синтаза.

MITOMYCIN C IN THE TREATMENT OF URETHRIC STRICTURE AND ITS EFFECT ON ARGINASE/NO-SYNTHASE SYSTEM Sheremeta D.R., Sverdani O.P., Vorobets D.Z., Fafula R.V., Vorobets Z.D.

Abstract. Mitomycin C is used to treat or prevent scar formation, urethral strictures in particular, in the postoperative period. Depending on the location of operating field, it is administered intravenously, intravesically, intraperitoneally, and topically. Cicatricial changes are one of the postoperative complications. Mitomycin C has significant anti-fibroblastic properties and prevents collagen production in tissues. However, it is known that a wide range of antibiotics and cytostatics can also affect the cell regulatory systems. The nitric oxide system is an important regulatory system, which includes enzymes such as arginase and certain nitric oxide synthase isoforms.

The objective of the study is to determine the effect of mitomycin C on the enzymes of arginase/ NO synthase system activity. The research was performed on peripheral blood lymphocytes obtained from practically healthy men as they are considered as «metabolic mirror» of organism and they respond quickly to all external and internal influences on the body. It has been shown that mitomycin C at concentrations of 10^{-6} – 10^{-3} M caused a dose-dependent increase in arginase activity in peripheral blood lymphocytes. At drug concentration of 10^{-6} M – by 1.2 times, at drug concentration of 10^{-3} M – by 1.5 times compared to the control values.

In parallel with the increase in arginase activity, the corresponding changes in the activity of constitutive isoform of nitric oxide synthase were revealed. It has been shown that activity in control lymphocytes is (71.4 ± 6.9), and the inducible isoform activity is (1.58 ± 0.18) nmol NADPH/(H^+)/min per 1 mg of protein. Under effect of mitomycin C at concentration of 10^{-6} M cNOS activity was decreasing by 1.4 times concerning control values, iNOS activity is almost undetectable. When studying the effect of mitomycin C on iNOS activity in lymphocytes, isolated from the blood of practically healthy men, we did not observe its activity, and the inhibitory effect could not be determined due to its low activity. Oxidative stress was used to induce iNOS activity in blood lymphocytes with H_2O_2 lymphocytes preincubation. Lymphocytes preincubation with 0.2 mM H_2O_2 leads to an increase in iNOS by 22.4 times. By activation of iNOS with hydrogen peroxide, 10^{-6} M concentration of mitomycin C leads to inhibition of enzyme activity by 1.4 times.

Thus, the results we obtained concerning the mechanism of action of mitomycin C, that is used to treat urethral strictures, indicate an additional effect on the cell regulatory systems in particular a disorder of arginase/NO-synthase system of blood lymphocytes that leads to disbalance of lymphocytes regulatory system and the regulatory function of NO. Presumably, one of the mechanisms of action of mitomycin C is the decrease in NO hyperproduction.

Key words: urethral stricture, mitomycin C, arginase, NO synthase.

ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Sheremeta D.R.: — ^{BD}

Sverdani O.P.: 0000–0003–3227–296X ^{BD}

Vorobets D.Z.: 0000–0002–8431–5151 ^E

Fafula R.V.: 0000–0002–0121–9093 ^C

Vorobets Z.D.: 0000–0001–6016–0186 ^{AF}

Конфлікт інтересів:

Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Воробець Зіновій Дмитрович

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Адреса: Україна, 79010, м. Львів, вул. Пекарська 69

Тел.: +380674943154

E-mail: kaf_medicalbiology@meduniv.lviv.ua

A – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Стаття надійшла 29.11.2022 року
Стаття прийнята до друку 06.05.2022 року