Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 661-667.

УДК 577;3
©Коллектив авторов

ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА ПРИ РОСТЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ С РАЗНЫМ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

В.П. Дерягина[1]*, Н.И. Рыжова[1], Л.В. Кривошеева[1], И.С. Голубева[2]

[1]НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва, Каширское ш., д. 24; тел.: (499)323-59-44; эл. почта: Derygina@inbox.ru
[2]НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, Москва

В исследованиях на мышах $F_1(C_{57}BlxCBA)$, Balb/c и BDF с подкожно перевитыми опухолями (карцинома Эрлиха – КЭ и метастазирующая карцинома лёгких Льюиса – КЛ) изучена динамика эндогенного образования метаболитов NO – нитритов (НИ), нитратов (НА), летучих нитрозаминов в организме, в опухолевой ткани и перитонеальными макрофагами. Показано, что рост КЭ в течение первых трех недель сопровождается статистически значимым увеличением суммарной концентрации НИ+НА в опухолевой ткани до уровней $(7,3\pm4,67)\times10^{-6}$ – $(7,8\pm2,57)\times10^{-5}$ (моль/кг), а также резкого увеличения выделения НИ+НА с мочой. В то же время, в опухолевой ткани КЛ максимальный уровень концентрации НИ+НА ($3,6\pm0,46x10^{-5}$) регистрировали на 7-е сутки, в дальнейшем он снижался, отрицательно коррелируя с массой опухоли. На этапе интенсивного роста КЛ (14, 21 сутки) обнаружено достоверное подавление секреции НИ перитонеальными макрофагами. На всех контролируемых сроках развития опухолевая ткань КЭ содержала канцерогенные N-нитрозодиметиламин и N-нитрозодиэтиламин, концентрация которых существенно варьировала. Таким образом, способность опухолевой ткани синтезировать метаболиты NO более выражена у КЭ, по сравнению с КЛ и зависит от временных параметров роста опухолей.

Ключевые слова: биосинтез нитритов, нитратов, N-нитрозаминов, опухолевая ткань, макрофаги, карцинома Эрлиха, карцинома лёгких Льюиса.

ВВЕДЕНИЕ

Роль оксида азота (NO) в биологии опухолей неоднозначна и изучена недостаточно. Известно, что синтез NO осуществляется многими типами клеток, в том числе опухолевыми, и основан на ферментативной трансформации гуанидинового фрагмента аминокислоты – L-аргинина в реакции с кислородом с участием коферментов – NADPH, FAD, FMN, тетрагидробиоптерина и NO-синтаз [1, 2]. Считают, что многократное повышение образования NO является следствием активации индуцибельной NO-синтазы (iNOS) под влиянием провоспалительных и антипатогенных факторов: интерферона-γ (IFN-γ), фактора некроза опухоли-α (TNF-α), интерлейкина 1β (IL-1β), бактериального липополисахарида (LPS), окислительного стресса и др. [3, 4]. В условиях гипоксии фагоциты, инфильтрирующие опухоли, могут синтезировать NO также под одновременным действием фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1) и IFN регулирующего фактора-1 (IRF-1) [5, 6]. Продолжительное образование избыточных количеств NO и его метаболитов (нитритов, пероксинитрита, окислов азота, нитрозосоединений и др.) приводит к повреждению ДНК (через дезаминирование и нитрование оснований, алкилирование, образование аддуктов, дозо-зависимых разрывов) [7-10] и вызывает посттрансляционную модификацию ДНК-репарирующих ферментов [11], инициируя прогрессию опухолей. Данные клинических исследований указывают на положительную зависимость между экспрессией iNOS в опухолях и плохим прогнозом у больных со злокачественными

* - адресат для переписки

опухолями молочной железы и меланомы [12]. В то же время, NO является важным медиатором противоопухолевой защиты. NO, продуцируемый иммунными клетками – макрофагами и нейтрофилами, оказывает цитостатическое и цитотоксическое действие на опухолевые клетки разного гистогенеза [9, 13]. Формирование биологического ответа клеток на действие NO зависит от концентрации, экспозиции, реакций с ключевыми реагентами (кислород и его активные формы, углекислый газ и др.) и мишенями (металлы, тиолсодержащие аминокислоты, гем-содержащие белки) и др. Гем-содержащие белки окисляют NO в нитрат (NO_3^-). Полагают, что оксид азота в реакции с кислородом, а также свободными радикалами (O_2^-, $^{\bullet}OH$), металлами переменной валентности окисляется до NO_2, ($2NO+O_2 \rightarrow 2NO_2$), но при увеличении концентрации NO в среде, происходит быстрое образование других оксидов азота – N_2O_3 и N_2O_4 ($NO_2+NO \leftrightarrow N_2O_3$; $NO_2+NO_2 \leftrightarrow N_2O_4$) [14].

Ранее было показано, что нитриты, N_2O_3 и N_2O_4, $ONOO^-$ при низких, физиологических и даже повышенных значениях pH (с участием патогенных бактерий) могут нитрозировать амины и тиолы с образованием N-нитрозаминов и нитрозотиолов [15-17]. Макрофаги, стимулированные липополисахаридом и цитокинами также могут синтезировать N-нитрозамины [18]. При некоторых патологических состояниях, например при сепсисе, обнаружено образование нитрозамина – нитрозопролина [16]. Учитывая литературные и собственные данные о существенном повышении биосинтеза опухолевой тканью нитрозирующих соединений (NO_2^-, N_2O_3 и N_2O_4, $ONOO^-$), нами было высказано предположение о возможности образования нитрозосоединений, в том числе N-нитрозаминов в самой опухоли [2, 7, 10, 19]. В многочисленных экспериментах показано, что N-нитрозамины проявляют сильные мутагенные и канцерогенные свойства и наряду с активными формами кислорода и азота, продуцируемых в избыточных количествах, могут формировать условия, способствующие поддержанию генетической нестабильности в клетках [16, 20, 21].

В зависимости от уровня концентраций NO и его метаболитов в микроокружении опухоли возможна активация онкогенных сигнальных путей, включая Akt, рецепторы эпидермального фактора роста, c-Myc и др., а также стимуляция ангиогенеза [22].

В свете вышесказанного, представляет существенный научный и практический интерес изучение интенсивности биосинтеза метаболитов NO в организме мышей с опухолями разного гистогенеза и метастатического потенциала.

Целью настоящего исследования было выявление закономерностей биосинтеза метаболитов NO опухолевой тканью и иммунными клетками в процессе роста перевиваемых опухолей.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить в динамике закономерности эндогенного образования метаболитов NO – нитритов (НИ), нитратов (НА) и нитрозосоединений (НС) в опухолевой ткани и в организме мышей с карциномой Эрлиха (КЭ).

Изучить содержание НИ и НА в опухолевой ткани и их образование перитонеальными макрофагами у мышей с метастатической карциномой лёгких Льюиса (КЛ).

Методика

Работа проведена на 180 мышах-самцах $F_1(C_{57}BlxCBA)$ (далее F_1, n=110), Balb/c (n=60) и BDF (n=10) массой 22-40 г, полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали на брикетированном корме (комбикорм полнорационный экструдированный для лабораторных животных, ООО “Аллер Петфуд” (Россия)) при свободном доступе к воде. Штаммы опухоли КЭ и КЛ получены из банка РОНЦ РАМН, использовали 2-3 пассажи опухоли *in vivo*. Инокуляцию опухолевых клеток КЭ и КЛ проводили п/к, соответственно по 10^6 или по 5×10^6 клеток на мышь в правую паховую или правую подмышечную область.

Эндогенное образование окисленных продуктов NO в организме оценивали на двух моделях опухолевого роста – КЛ и КЭ по показателям выделения NO_3^- и NO_2^- с мочой за сутки и их концентрации в опухолевой ткани мышей. Сбор суточной мочи для анализа НА и НИ у мышей-Balb/c с КЭ проводили до перевивки опухолей и после неё еженедельно на сроки, приведенные в таблице 2, а у мышей F_1 с КЛ – на 3, 7, 14, 21 и 29 сутки. Для сбора мочи мышей помещали по 5 штук в обменные клетки на сутки, лишив корма при свободном доступе к дистиллированной воде.

Для выделения опухолей на соответствующий контрольный срок мышей умерщвляли под эфирным наркозом. Выделенные опухоли гомогенизировали; навеску 0,2-5 г измельчённой опухолевой ткани помещали в термостойкую колбу, добавляли бидистиллированную воду (соотношение опухолевая ткань/вода = 1:10)

и нагревали при температуре 60°С в течение 15 мин. Чтобы предотвратить разрушение НИ, pH водной суспензии образца доводили до 7,2-7,4 добавлением аммиачного буфера. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры; для удаления белково-углеводной составляющей использовали водные растворы 17% гексоцианоферрата калия и 50% сернокислого цинка. Суспензию центрифугировали 15 мин при 500 g, отделяли надосадочную жидкость и дополнительно фильтровали. На всех этапах анализа проводили контроль воды и всех реагентов на содержание НИ и НА.

Концентрацию НИ и НА в опухолевой ткани, моче, перитонеальной жидкости определяли спектрофотометрическим методом с использованием реагента Грисса с предварительным восстановлением НА до НИ свежеприготовленным пористым кадмием при pH 9,6 и при интенсивном встряхивании. Метод Грисса основан на диазотировании нитрит-иона в кислой среде сульфаниламидом и взаимодействии диазосоединения с N-(1-нафтил)этилендиамином с образованием окрашенного производного [23]. Величину оптической плотности раствора измеряли спектрофотометрически при длине волны, равной 540 нм. Концентрацию НИ и НА в опухолевой ткани выражали в моль/кг ткани и моль/кг массы тела животного (м.т.ж.; при расчёте учитывали на момент контроля массу опухоли и массу животного), экскрецию НИ и НА с мочой рассчитывали в моль/кг м.т.ж.

Образование НИ макрофагами и моноцитами определяли по содержанию в перитонеальной жидкости NO_2^- (моль), в расчёте на10^6 клеток на 7, 14, 21, 29 сутки роста КЛ у мышей F_1. Резидентные клетки перитонеальной жидкости получали промыванием брюшной полости раствором Хенкса в объёме 2 мл. Перитонеальные клетки осаждались на предметном стекле в термостате при температуре 37°С в течение 20 мин, затем их фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза. Количество клеток в перитонеальной жидкости подсчитывали в камере Горяева, клеточный состав определяли в окрашенных мазках по морфологическим критериям.

Анализ содержания летучих N-нитрозаминов в образцах опухолевой ткани проводили методом [24], включающим перегонку исследуемых соединений с водяным паром, экстракцию из водного дистиллята дихлорметаном с последующей очисткой и концентрированием экстракта. Идентификацию и количественное определение N-нитрозаминов осуществляли газохроматографическим методом с использованием термоэнергетического анализатора TEA-800 фирмы “Cambridge Scientific” (Великобритания) с программным обеспечением для автоматической обработки данных Clarity.

Проверку значимости различий между данными (представленными в таблицах как среднее арифметическое значение ± выборочное стандартное отклонение), проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Гипотезу о наличии связи между показателями проверяли с помощью регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания НИ и НА в опухолевой ткани КЭ (табл. 1) мышей F_1 показывает, что НИ в образцах обнаруживались не во все сроки, в то время как концентрация НА по мере роста опухолей увеличивалась, достигая своего максимума на 21 сутки $(7,8\pm2,57)\times10^{-5}$ моль/кг. Суммарная концентрация НИ и НА в опухолевой ткани с ростом КЭ увеличивалась, особенно интенсивно на третьей неделе, достоверно превышая в 10,7 раза аналогичный показатель, зарегистрированный на 7-ые сутки. На 28-ые сутки роста КЭ отмечали снижение концентрации НИ+НА в опухолевой ткани.

Таблица 1. Содержание NO_2^- и NO_3^- в опухолевой ткани карциномы Эрлиха (КЭ) мышей-самцов $F_1(C_{57}BlxCBA)$.

Сутки роста КЭ	Средняя масса опухоли, г	Концентрация NO_2^- и NO_3^-, моль/кг опухолевой ткани			Содержание NO_2^-+ NO_3^-	
		NO_2^-	NO_3^-	Сумма NO_2^-+ NO_3^- (в пересчёте на NO_3^-)	в опухоли, моль	моль/ кг м.т.ж.
7	0,912±0,3	$(0,65\pm0,6)\times10^{-6}$	$(6,65\pm3,0)\times10^{-6}$	$(7,3\pm3,49)\times10^{-6}$	$(6,65\pm3,18)\times10^{-9}$	$(1,66\pm0,79)\times10^{-7}$
14	1,695±0,276	0	$(1,73\pm0,76)\times10^{-5}$**	$(1,73\pm0,76)\times10^{-5}$**	$(2,93\pm1,29)\times10^{-8}$**	$(7,33\pm3,22)\times10^{-7}$**
21	3,395±0,679	0	$(7,8\pm2,57)\times10^{-5}$**	$(7,8\pm2,57)\times10^{-5}$**	$(2,65\pm0,87)\times10^{-7}$**	$(6,63\pm2,18)\times10^{-6}$**
28	5,42±1,626	$(2,29\pm1,88)\times10^{-6}$*	$(1,82\pm1,2)\times10^{-5}$**	$(2,05\pm1,44)\times10^{-5}$*	$(1,11\pm0,78)\times10^{-7}$**	$(2,78\pm1,95)\times10^{-6}$**

Примечание. Здесь и в таблицах 2-5 приведено среднеарифметическое значение ± стандартное отклонение (SD), n=10. * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ (сравнение с соответствующим показателем на 7 сутки роста КЭ).

Если расчёт провести с учётом концентрации метаболитов в опухолевой ткани и её массы (которая при росте КЭ увеличивается), а результаты выразить в расчёте на кг массы тела животного, то данные показывают, что уровень суммарного биосинтеза достигает максимального значения на 21 сутки и в 39,9 раза ($p<0,01$) превышает аналогичный показатель, зарегистрированный на 7 сутки. Обращает на себя внимание то, что в опухолевой ткани КЭ преобладает образование НА, которые менее химически активны и токсичны, чем НИ.

Результаты определения в динамике выделения НИ и НА с мочой у мышей линии Balb/c с перевиваемой КЭ показывают, что рост опухолей сопровождался нарастанием выделения каждого из метаболитов, а также суммарной их экскреции (табл. 2). К концу опыта (32 сутки), выделение НИ и НА с мочой возросло, соответственно в 3,6 и 67 раза по сравнению с показателями, зарегистрированными у животных при появлении первых опухолевых узлов (4 сутки). Выделение НИ у мышей с КЭ изменялось в диапазоне от $(3,6\pm2,6)\times10^{-7}$ до $(1,3\pm0,55)\times10^{-6}$ моль/кг м.т.ж., а НА от $(8,5\pm9,9)\times10^{-8}$ до $(5,7\pm2,97)\times10^{-6}$ моль/кг м.т.ж. Выделение НИ + НА на 32 сутки роста КЭ увеличилось в 63,6 раза ($p<0,01$) в сравнении с показателем здоровых мышей. Средний объем опухоли за этот период увеличился в 67,3 раза. При этом прослеживается положительная регрессионная зависимость между объёмом КЭ и уровнем суточного выделения НИ и НА с мочой ($r=0,99$). Примечательно, что в моче, как и в опухолевой ткани, преобладает более окисленная форма NO – нитраты.

Изменение уровня концентрации НИ и НА в процессе роста КЛ у мышей $F_1(C_{57}BlxCBA)$ имело свои особенности. Концентрация НИ в опухолевой ткани КЛ (табл. 3) была в пределах $(2,73\text{-}5,86)\times10^{-6}$ моль/кг, причём на терминальной стадии развития опухоли она имела наименьшее значение. Что касается НА, то их концентрация пропорционально убывала по мере увеличения массы опухолей и имела минимальное значение – $(4,19\pm3,43)\times10^{-6}$ моль/кг на 29 сутки роста КЛ. Максимальная суммарная концентрация НИ и НА в опухолевой ткани зарегистрирована на 7 сутки роста КЛ, в дальнейшем она снижалась; регрессионный анализ выявил отрицательную корреляцию между массой КЛ и показателем суммарной концентрации НИ и НА ($r=-0,9039$). Расчёт биосинтеза НИ и НА (моль/кг м.т.ж., с учётом массы опухоли) в организме мышей с КЛ показал, что он увеличивался до 21 суток за счёт растущей опухолевой массы и на этот срок был

Таблица 2. Выделение нитритов и нитратов с мочой у мышей Balb/c в процессе роста карциномы Эрлиха (КЭ).

Сутки роста КЭ	Объём опухоли, мм^3	Выделение NO_2^- и NO_3^-, моль/кг м.т.ж.		
		NO_2^-	NO_3^-	Сумма NO_2^-+ NO_3^-
Контроль 0	0	0	$(1,1\pm0,44)\times10^{-7}$	$(1,1\pm0,44)\times10^{-7}$
4	49±21	$(3,6\pm2,6)\times10^{-7}$	$(8,5\pm9,9)\times10^{-8}$	$(4,45\pm3,29)\times10^{-7}$**
10	720±117	$(4,5\pm1,09)\times10^{-7}$	$(8,9\pm3,0)\times10^{-7}$	$(1,34\pm0,38)\times10^{-6}$**
17	1480±197	$(5,8\pm4,64)\times10^{-7}$	$(3,3\pm1,1)\times10^{-6}$	$(3,88\pm1,41)\times10^{-6}$**
24	2189±809	$(1,0\pm0,53)\times10^{-6}$	$(3,1\pm0,3)\times10^{-6}$	$(4,1\pm0,73)\times10^{-6}$**
32	3300±462	$(1,3\pm0,55)\times10^{-6}$	$(5,7\pm2,97)\times10^{-6}$	$(7,0\pm3,63)\times10^{-6}$**

Примечание: n=10. * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$. Сравнение с контролем.

Таблица 3. Содержание NO_2^- и NO_3^- в опухолевой ткани карциномы лёгких Льюиса (КЛ) мышей $F_1(C_{57}BlxCBA)$.

Сутки роста КЛ	Средняя масса опухоли, г	Концентрация NO_2^- и NO_3^-, моль/кг опухолевой ткани			Содержание NO_2^- + NO_3^- опухоли, моль	Содержание NO_2^-+ NO_3^- моль/кг м.т.ж
		NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-+ NO_3^-		
7	0,240±0,112	$(4,0\pm0,5)\times10^{-6}$	$(3,2\pm0,4)\times10^{-5}$	$(3,6\pm0,46)\times10^{-5}$	$(8,64\pm1,10)\times10^{-9}$	$(2,88\pm0,37)\times10^{-7}$
14	1,742±0,614	$(5,86\pm1,21)\times10^{-6}$**	$(1,37\pm0,46)\times10^{-5}$**	$(1,96\pm0,54)\times10^{-5}$**	$(3,41\pm0,94)\times10^{-8}$**	$(1,14\pm0,31)\times10^{-6}$**
21	4,910±1,746	$(3,68\pm1,23)\times10^{-6}$	$(7,22\pm2,64)\times10^{-6}$**	$(1,09\pm0,29)\times10^{-5}$**	$(5,35\pm1,42)\times10^{-8}$**	$(1,78\pm0,47)\times10^{-6}$**
29	8,292±1,658	$(2,73\pm0,17)\times10^{-6}$**	$(4,19\pm3,43)\times10^{-6}$**	$(6,92\pm3,92)\times10^{-6}$**	$(1,46\pm0,83)\times10^{-8}$*	$(4,87\pm2,76)\times10^{-7}$*

Примечание: n=10. * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ (сравнение с соответствующим показателем на 7 сутки роста КЛ).

в 6,2 раза ($p<0,01$) больше, чем на срок в 7 суток. Сравнение максимальных концентраций НИ+НА в различающихся по гистогенезу опухолях выявило, что в опухолевой ткани КЭ биосинтез метаболитов NO был в 2,17 раза ($p<0,01$) более интенсивный, чем в ткани КЛ.

Анализ данных, отражающих уровни выделения с мочой НИ и НА у мышей F_1 с КЛ, показал (табл. 4), что выделение обоих метаболитов в течение роста КЛ было выше уровня, определяемого у здоровых мышей. Суммарное выделение НИ+НА с мочой нарастало в течение 14 суток роста КЛ, в дальнейшем оно снижалось до уровней, близких к показателям контроля.

Результаты определения активности перитонеальных макрофагов+моноцитов по образованию ими нитритов (моль $NO_2^-/10^6$ клеток) приведены в таблице 5. Как видно из данных таблицы, существенное снижение концентрации NO_2^- в перитонеальной жидкости определяли на 14 и 21 сутки роста КЛ. На эти сроки концентрация нитритов в перитонеальном жидкости или не определялась или имела очень малые значения.

Определение N-нитрозаминов в опухолях, выделенных у 14 мышей F_1 на 14, 21 и 28 сутки роста КЭ и у 5 мышей BDF с перевиваемой КЭ (35 сутки) выявило следующие соединения: N-нитрозодиметиламин (НДМА) и N-нитрозодиэтиламин (НДЭА). Отмечается выраженная вариабельность концентраций указанных соединений в отдельных опухолях мышей F_1 на всех контролируемых сроках, которая изменялась для НДМА от 0,029 до 0,546, а для НДЭА от 0,14 до 0,49 мкг/100 г опухолевой ткани. В опухолях КЭ, выделенных на терминальной стадии роста мышей BDF, средняя концентрация (± стандартное отклонение) НДМА равнялась 0,165±0,148, а НДЭА – 0,48±0,46 мкг/100 г ткани.

Таким образом, проведенные исследования показали, что рост КЭ и КЛ происходит на фоне повышенного эндогенного образования метаболитов NO, однако алгоритм их биосинтеза различен для каждого из типов опухолей. Развитие КЭ сопровождается повышением концентрации НИ+НА в опухолевой ткани в течение первых трёх недель её роста со снижением концентрации метаболитов на терминальной стадии роста опухоли. В опухолях КЛ максимальная концентрация НИ+НА, регистрируемая на 7 сутки, по мере роста опухоли снижалась, будучи отрицательно связанной с показателем массы опухолей ($r=-0,9039$). Данные расчёта биосинтеза НИ+НА (с учётом массы опухолей, массы животного), выраженные в моль/кг м.т.ж., показывают,

Таблица 4. Выделение нитритов и нитратов с мочой у мышей F_1 в процессе роста карциномы лёгких Льюиса (КЛ).

Сутки роста КЭ	Средняя масса опухоли, г	Выделение NO_2^- и NO_3^-, моль/кг м.т.ж.		
		NO_2^-	NO_3^-	Сумма NO_2^-+ NO_3^-
Контроль 0	0	$(0,8±0,11)\times10^{-7}$	$(4,8±2,4)\times10^{-7}$	$(5,6±2,74)\times10^{-7}$
3	а)	$(2,19±0,33)\times10^{-7}$**	$(2,22±1,07)\times10^{-6}$**	$(2,44±1,22)\times10^{-6}$**
7	0,240±0,112	$(1,95±0,11)\times10^{-7}$**	$(1,89±0,2)\times10^{-6}$**	$(2,09±0,23)\times10^{-6}$**
14	1,742±0,614	$(1,69±0,89)\times10^{-7}$**	$(3,61±1,6)\times10^{-6}$**	$(3,78±1,83)\times10^{-6}$**
21	4,910±1,746	$(1,47±0,06)\times10^{-7}$**	$(5,78±1,8)\times10^{-7}$	$(7,25±2,05)\times10^{-7}$
29	8,292±1,658	$(3,17±0,63)\times10^{-7}$**	$(4,97±2,34)\times10^{-7}$	$(8,14±2,76)\times10^{-7}$

Примечание: n=10. * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ (сравнение с контролем). а) - опухолевый узел не сформирован.

Таблица 5. Образование нитритов (NO_2^-) перитонеальными клетками (макрофаги+моноциты) мышей F_1, с перевиваемой карциномой лёгких Льюиса (КЛ)

Сутки роста опухоли	Кол-во макрофагов ($\times10^3$) в 1 мкл	Моль $NO_2^-/10^6$ клеток
7	1,32±0,23	$(1,5±0,9)\times10^{-7}$
14	1,81±0,09**	не обнаружено
21	1,57±0,09**	$(6,0±3,0)\times10^{-8}$**
29	2,0±0,26** n=6	$(3,5±2,1)\times10^{-7}$ n=6
Здоровые животные	1,42±0,09	$(1,8±0,46)\times10^{-7}$

Примечание: ** - $p<0,01$ (сравнение с показателем для здоровых животных). В группах, кроме указанного значения n, по 10 животных.

что синтез НИ+НА увеличивается в течение первых трёх недель роста опухолей, но с более выраженной интенсивностью у мышей с КЭ, чем с КЛ.

Работ, посвященных количественной оценке биосинтеза метаболитов NO в развивающихся опухолях и в организме животных с опухолями немного. Исследования, проведённые на культуре опухолевых клеток молочной железы (MCF7), обнаружили зависимость активности ряда важных для канцерогенеза белков: HIF-1α, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), и p53 от уровня концентрации NO в микроокружении. При низких уровнях концентраций NO (<50 нМ), фосфорилируется ERK посредством гуанилатциклазо-зависимого механизма. Аккумуляцию HIF-1α наблюдали при средних уровнях NO (>$1{,}0\times10^{-7}$ М), в то время как фосфорилирование серина p53-P-(Ser-15) имело место при значительно более высоких уровнях (>$3{,}0\times10^{-7}$ М). Условия, при которых концентрации NO в клетках и межклеточном пространстве >1 мкМ, исследователи определяют как нитрозирующий стресс. В этих условиях превалируют реакции нитрозирования с участием эквивалента нитрозония (NO^+), который взаимодействует с тиолами, вторичными аминами или гидроксильными группами [16].

В нашем опыте, суммарная концентрация НИ+НА (моль/кг ткани) в опухолевой ткани КЭ варьировала в пределах $(7{,}3\pm4{,}67)\times10^{-6}$ – $(7{,}8\pm2{,}57)\times10^{-5}$, а в опухолевой ткани КЛ – $(6{,}92\pm3{,}92)\times10^{-6}$ – $(3{,}6\pm0{,}46)\times10^{-5}$; такие концентрации на основе предложенной [22] классификации характерны для нитрозирующего стресса. Исследования показывают, что при таких уровнях концентрации NO могут ингибироваться ДНК-репарирующие белки, (PARP), каспазы, митохондриальное дыхание и др. [22, 25, 26].

Следует добавить, что в настоящей работе уровень эндогенного образования NO определяли по количеству только двух метаболитов разной стабильности – НИ и НА. Известно, что NO депонируется в организме в виде динитрозильных железосерных комплексов, S-нитрозотиолов, S-нитрозогемоглобина (Hb-SNO), нитрозильных комплексов Hb (HbNO) и др. и количество NO, связанное в комплексах и молекулах может превышать количество NO в форме НА и НИ [27-30].

Обнаружение в опухолевой ткани летучих нитрозаминов является ещё одним непрямым индикатором образования реактивных форм азота, вероятнее всего, N_2O_3, последний в реакции нитрозирования при взаимодействии со вторичными аминами может образовать канцерогенные нитрозамины. Известно, что N-нитрозамины сильные мутагены, алкилируют ДНК и проявляют высокую бластомогенную активность, причём установлено, что ни один вид подопытных животных не оказался резистентным к их действию [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие подкожно перевиваемой КЭ у мышей F_1 происходит на фоне выраженного статистически значимого увеличения концентрации НА+НИ в опухолевой ткани в течение первых трёх недель роста и увеличения суммарного их выделения с мочой у мышей Balb/c.

Суммарная концентрации НА и НИ в опухолевой ткани мышей F_1 с метастазирующей КЛ достигала своего максимального значения на 7 сутки, в дальнейшем она снижалась, в отрицательной зависимости от массы опухоли. Наряду с этим зарегистрировано усиление экскреции НИ+НА с мочой мышей F_1 в течение первых двух недель роста КЛ, которое затем убывало и было близким к показателю контроля.

Обнаружено угнетение способности перитонеальных макрофагов+моноцитов секретировать НИ на стадии интенсивного роста метастазирующей КЛ.

Показана возможность образования канцерогенных N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в опухолевой ткани при росте КЭ.

Таким образом, способность опухолевой ткани разного гистогенеза синтезировать метаболиты NO зависит от временных параметров и более выражена для КЭ, чем для КЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hibbs J.B.J.* (1991) Res. Immunol., **142**, 565-569.
2. *Граник В.Г., Григорьев Н.Б.* (2004) Оксид азота. М.: "Вузовская книга".
3. *Nathan C., Xie Q.W.* (1994) J. Biol. Chem., **269**, 13725-13728.
4. *Bogdan C.* (2001) Trends Cell Biol., **11**, 66-75.
5. *Rockwell S., Moulder J.E.* (1990) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., **19**, 197-202.
6. *Melillo G., Musso T., Sica A., Taylor L.S., Cox G.W., Varesio L.* (1995) J. Exp. Med., **182**, 1683-1693.
7. *Pinlaor S., Spira B., Ma N., Hiraku Y., Yongvanit P., Wongkham S., Pairojkul C., Bhudhisawasdi V., Oikawa S., Murata M., Semba R., Kawanishi S.* (2005) World J. Gastroenterol., **11**, 4644-4649.

8. *Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dunams T.M., Cebula T.A., Koch W.H., Andrews A.W., Allen J.S.* (1991) Science, **254**(5034), 1001-1003.
9. *Xu W., Liu L.Z., Loizidou M., Ahmed M., Charles I.G.* (2002) Cell Research, **12**, 311-320.
10. *Felley-Bosco E.* (1998) Cancer Metastasis Rev., **17**, 25-37.
11. *Jones L.E., Ying J.L., Hofseth A.B., Jelezcova E., Sobol R.W., Ambs S., Harris C.C., Espey M.G., Hofseth L.J., Wyatt M.D.* (2009) Carcinogenesis, **30**, 2123-2129.
12. *Vakkala M., Kahlos K., Lakari E., Paakko P., Kinnula V., Soini Y.* (2000) Clin. Cancer Res., **6,** 2408-2416.
13. *Garban H.J., Bonavida B.* (1999) Cynecol. Oncol., **73**, 257-264.
14. *Недоспасов А.А.* (1998) Биохимия, **63**, 881-904.
15. *Bartsch H.* (1991) IARC Sci Publ., **105**, 1-10.
16. *Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer Ch.H., Donzellie S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C., Harris C., Roberts D.D., Wink D.A.* (2008) Free Rad. Biol. Med., **45**, 18-31.
17. *Mirvish S.S.* (1995) Cancer Lett., **93**, 17-48.
18. *Miwa M., Stuehr D.J., Marletta M.A., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* (1987) IARC Sci Publ. **84**, 340-344.
19. *Дерягина В.П., Рыжова Н.И.* (2007) Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, **18**, 32-37.
20. *Choudhari Sh.K., Chaudhary M., Bagde S., Gadbail A.R., Joshi V.* (2013) World J. Oncol., **11**, 118.
21. *Preussmann R.* (1984) Naturwissenschaften, **71**, 25-30.
22. *Thomas D.D., Espey M.G., Ridnour L.A., Hofseth L.J., Mancardi D., Harris C.C., Wink D.A.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 8894-8899.
23. *Tsikas D.* (2007) J. Chromatog., **851**, 51-70.
24. Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах. Методические указания по методам контроля. (1993) МУК 4.4.1.011-93.
25. *Ridnour L.A., Thomas D.D., Mancardi D., Espey M.G., Miranda K.M., Paolocci N., Feelisch M., Fukuto J., Wink D.A.* (2004) Biol. Chem., **385**, 1-10.
26. *Cleeter M.W., Cooper J.M., Darley-Usmar V.M., Moncada S., Schapira A.H.* (1994) FEBS Lett., **345**, 50-54.
27. *Vanin A.F., Mordvintcev P.I., Hauschildt S., Mulsch A.* (1993) Biochim. Biophys. Acta, **1177**, 37-42.
28. *Gaston B., Reilly J., Drazen J.M., Fackler J., Ramdev P., Arnelle D., Mullins M.E., Sugarbaker D.J., Chee C., Singel D.J.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 10957-10961.
29. *Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А.* (2007) Усп. биол. химии, **47**, 259-292.
30. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С.* (1997). Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. Наука, М.

Поступила: 07. 11. 2013.

PRODUCTION OF NITRIC OXIDE METABOLITES DURING TRANSPLANTED TUMORS GROWTH WITH DIFFERENT METASTATIC POTENTIAL

V.P. Deryagina[1], N.I. Ryzhova[1], L.V. Krivosheeva[1], I.S. Golubeva[2]

[1]Institute of Carcinogenesis, Blokhin Russian Cancer Research Center,
24, Kashirskoye, Moscow, 115478 Russia; tel.: (499)323-59-44; e-mail: Derygina@inbox.ru
[2]Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Cancer, Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

The endogenous formation of metabolites of NO – nitrite (NI), nitrates (NA) and volatile nitrosamines in the body, tumor tissue and by abdominal cavity by macrophages for dynamics was investigated in mice $F_1(C_{57}BlxCBA)$, Balb/c and BDF with subcutaneous transplanted tumors (Erlich carcinoma – EC and metastatic Lewis lung carcinoma – LLC). It was shown that growth of EC was accompanied by a statistically significant increase in the concentrations of NI and NA in tumor tissue to $(7.3\pm4.67)\times10^{-6}$ – $(7.8\pm2.57)\times10^{-5}$ (mol/kg) for the first three weeks and a sharp increase in urinary excretion of NI and NA. The maximum total concentration of NI and NA – $(3.6\pm0.46)\times10^{-5}$ in tissue LLC was registered during the early stage of the tumor growth (7 days); it later declined, negatively correlating with the mass of the tumor. NI secretion by abdominal cavity macrophages demonstrated statistically significantly decrease at the stage of intensive growth LLC (14, 21 days). The tissue of EC contained varied concentration of cancerogenic N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine at all investigated time points. Thus, the ability of different gistogenesis tumor tissue to synthesize metabolites NO depended on time parameters and was more pronounced for EC, than LLC.

Key words: biosynthesis of nitrites, nitrates, N-nitrosamines, tumoral tissue, macrophages, Ehrlich carcinoma, Lewis lung carcinoma.