Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза

В.П. Дерягина[1], Н.И. Рыжова[1], Л.В. Кривошеева[1], И.С. Голубева[2], Л.А. Савлучинская[1], Д.А. Хоченков[2]

[1]Научно-исследовательский институт канцерогенеза,
[2]Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: *Валентина Петровна Дерягина derygina@inbox.ru*

Изучены в динамике образование метаболитов оксида азота (NO): нитритов, нитратов, летучих нитрозаминов, а также экспрессия фермента – индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в экспериментах на мышах с подкожно перевиваемыми, спонтанными и химически индуцированными опухолями. Выявлено повышенное образование нитритов + нитратов в опухолях или их выделение с мочой при росте опухолей независимо от их гистологического типа. Суммарная концентрация нитритов и нитратов в опухолях достигает микромолярных уровней, характерных для нитрозирующего стресса. Способность перитонеальных макрофагов + моноцитов генерировать нитриты подавляется на стадии интенсивного роста карциномы легких Льюиса, что может указывать на снижение цитотоксических свойств иммунных клеток. Показана возможность образования в опухолях карциномы Эрлиха летучих N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина – соединений с выраженными канцерогенными свойствами. С использованием иммуногистохимического метода выявлена положительная экспрессия iNOS в отдельных участках опухолевой ткани карциномы легких на всех контролируемых сроках роста опухолей. Иммуноокрашивание отсутствовало или было слабым в метастазах легких. Это может свидетельствовать о селекционном отборе клеток с низкой активностью iNOS, мигрирующих в легкие.

Ключевые слова: *биосинтез, метаболиты оксида азота, нитриты, нитраты, нитрозамины, макрофаги, экспрессия iNOS, перевиваемые опухоли, спонтанные опухоли, химически индуцированные опухоли*

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73–80

iNOS expression and biosynthesis of nitric oxide metabolites in the course of tumor growth of different histogenesis

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

[1]Research Institute of Carcinogenesis,
[2]Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Cancer, N.N. Blokhin Russian Cancer Reseach Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

The dynamics of the production of nitric oxide (NO) metabolites: nitrites, nitrates, volatile nitrosamines and iNOS expression was studied in mice with subcutaneous transplanted, spontaneous and chemical- induced tumors. Tumor growth was accompanied by increased production of nitrites + nitrates in tumors or their release with urine that not dependent on tumor histotype. The total concentration of nitrites and nitrates in tumors reached micromolar levels characteristic of nitrosative stress. The ability of peritoneal macrophages + monocytes to generates nitrites was suppressed at the stage of intensive growth of the Lewis lung carcinoma, which may indicate a decrease in the cytotoxic properties of immune cells. The possibility of formation in the Erlich carcinoma of volative N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine compounds with pronounced carcinogenic properties was demonstrated. A positive expression of iNOS was revealed in some areas of lung carcinoma at all investigated time points using the immunohistochemical method. The lungs metastases were not stain or weakly stained. This may indicate selection of the cells with a low activity of iNOS migrating in the lungs.

Key words: *biosynthesis, nitric oxide metabolites, nitrites, nitrates, N-nitrosamines, macrophages, expression of iNOS, transplanted tumors, spontaneous tumors, chemical-induced tumors*

Введение

Оксид азота (NO) – универсальный и необходимый регулятор физиологических реакций: иммунных, нейрональных, сосудистых и др. [1]. За последние десятилетия получены убедительные доказательства участия NO в патогенезе злокачественных опухолей [2, 3]. 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 (NOS) [4, 5]. Полагают, что многократное повышение образования NO в опухолях является следствием активации одной из изоформ NOS – индуцибельной NOS (iNOS) под влиянием провоспалительных и антипатогенных факторов: интерферона γ, фактора некроза опухоли α, интерлейкина 1β, бактериального липополисахарида, белков теплового шока и др. [6, 7]. Продолжительная гиперпродукция NO и его метаболитов (нитритов, перокси-

нитрита, окислов азота, нитрозаминов) приводит к повреждению ДНК через дезаминирование и нитрование оснований, алкилирование, образование аддуктов, дозозависимых разрывов, а также посттрансляционной химической модификации ДНК-репарирующих ферментов, способствуя таким образом прогрессии опухолей [8–11]. Данные клинических исследований показывают, что содержание и активность iNOS существенно увеличиваются в опухолях различной локализации и гистогенеза и положительно коррелируют со стадией и плохим прогнозом у больных меланомой, при опухолях молочной железы, яичников, головы и шеи и колоректальной карциноме [8]. Формирование биологического ответа клеток на действие NO зависит от его концентрации в клетках и межклеточной среде, а также от времени поддержания этих концентраций [12–14]. В то же время внимание исследователей сосредоточено на изучении реакций NO с ключевыми реагентами (кислород и его активные формы, углекислый газ и др.) и на биохимических (под влиянием NO) модификациях белков, содержащих гем, тиоловые и тирозиновые остатки, металлы переменной валентности. Однако направление действия NO, изменяющего активность критических сигнальных белков, вовлеченных в канцерогенез, в значительной мере определяется концентрацией соединения [13, 14].

Известно, что NO в реакции с кислородом, а также свободными радикалами (O_2^-, •OH) и металлами переменной валентности окисляется до NO_2 ($2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$), но при увеличении концентрации NO в среде, происходит быстрое образование других окислов азота – N_2O_3 и N_2O_4 ($NO_2 + NO \leftrightarrows N_2O_3$; $NO_2 + NO_2 \leftrightarrows N_2O_4$). N_2O_3 и N_2O_4, $ONOO^-$ и нитриты проявляют нитрозирующие свойства (в условиях низких, физиологических и даже повышенных значений уровня pH) в реакциях с аминами и тиолами, что может приводить к образованию N-нитрозаминов и нитрозотиолов [13, 15–17]. Макрофаги, стимулированные липополисахаридами и цитокинами, также могут синтезировать N-нитрозамины [17]. С учетом собственных данных и данных литературы о существенном повышении биосинтеза опухолевой тканью соединений с нитрозирующими свойствами мы предположили возможность образования нитрозосоединений, в том числе канцерогенных N-нитрозаминов в самой опухоли. Таким образом, представляет научный и практический интерес изучение интенсивности биосинтеза соединений с нитрозирующими свойствами метаболитов NO, экспрессии фермента iNOS в опухолях на моделях опухолевого роста, отличающихся метастатическим потенциалом.

Задачи исследования:

- определить уровни эндогенного образования метаболитов NO – нитритов, нитратов и нитрозосоединений у мышей на разных моделях опухолевого роста;
- изучить в динамике биосинтез нитритов перитонеальными макрофагами у мышей с метастазирующей карциномой легких Льюиса;
- изучить в динамике экспрессию iNOS в опухолевой ткани и метастазах у мышей с карциномой легких Льюиса.

Материалы и методы

Работа проведена на мышах-самцах линий F_1 (CBA/Lac×C57BL/6) (далее F_1, $n = 140$), Balb/c ($n = 60$), F_1 (C57BL/6×DBA/2) (далее BDF, $n = 50$) и CBA/Lac ($n = 30$), полученных из питомника «Столбовая». Всех животных содержали на брикетированном корме при свободном доступе к воде. Штаммы опухоли карциномы Эрлиха и карциномы Льюиса получены из банка РОНЦ им. Н.Н. Блохина (использовали 2–3-и пассажи опухоли *in vivo*). Опухолевые клетки карциномы Эрлиха (10^6 клеток на мышь) перевивали подкожно в правую паховую область, а карциномы Льюиса (5×10^6 клеток на мышь) – в правую подмышечную область.

Биосинтез NO определяли по концентрации стабильных продуктов аэробного окисления NO – ионов NO_3^- и NO_2^- в опухолях – и по их выделению с мочой у мышей с перевиваемыми опухолями. Известно, что нитриты и нитраты являются конечными метаболитами NO и до 95 % их выводятся с мочой.

Сбор суточной мочи проводили до перевивки опухолей и после нее еженедельно в сроки, приведенные в табл. 1. Для этого мышей помещали по 5 штук в обменные клетки на сутки, лишив корма, при свободном доступе к дистиллированной воде.

Концентрацию нитритов и нитратов (с предварительным восстановлением нитратов до нитритов пористым кадмием) определяли спектрофотометрическим

Таблица 1. *Выделение нитритов (NO_2^-) + нитратов (NO_3^-) с мочой в процессе роста карциномы Эрлиха у мышей линии Balb/c (n = 10) и карциномы легких Льюиса у мышей линии F_1 (CBA/Lac × C57BL/6) (n = 10)*

Сутки роста опухоли	Выделение $NO_2^- + NO_3^-$, моль/кг массы тела животного	
	Карцинома Эрлиха	Карцинома легких Льюиса
Контроль	$(1{,}10 \pm 0{,}44) \times 10^{-7}$	$(5{,}60 \pm 2{,}74) \times 10^{-7}$
3-и		$(2{,}44 \pm 1{,}22) \times 10^{-6}$*
4-е	$(4{,}45 \pm 3{,}29) \times 10^{-7}$*	
7-е		$(2{,}09 \pm 0{,}23) \times 10^{-6}$*
10-е	$(1{,}34 \pm 0{,}38) \times 10^{-6}$*	
14-е		$(3{,}78 \pm 1{,}83) \times 10^{-6}$*
17-е	$(3{,}88 \pm 1{,}41) \times 10^{-6}$*	
21-е		$(7{,}25 \pm 2{,}05) \times 10^{-7}$
24-е	$(4{,}10 \pm 0{,}73) \times 10^{-6}$*	
29-е		$(8{,}14 \pm 2{,}76) \times 10^{-7}$
32-е	$(7{,}0 \pm 3{,}63) \times 10^{-6}$*	

* *Сравнение с контролем, $p < 0{,}01$.*

методом с использованием реагента Грисса в опухолях, моче, перитонеальной жидкости [18]. Оптическую плотность окрашенных растворов определяли на спектрофотометре СФ-46. Концентрацию нитритов + нитратов в опухолевой ткани выражали в моль/кг ткани и в моль/кг массы тела животного (м.т.ж.), при расчете учитывали массу опухоли и массу животного на момент контроля. Для выделения опухолей мышей умерщвляли под эфирным наркозом.

Образование нитритов макрофагами и моноцитами определяли по содержанию в перитонеальной жидкости NO_2^- (моль) в расчете на 10^6 клеток на 7, 14, 21 и 29-е сутки роста карциномы Льюиса у мышей линии F_1 (табл. 2). Резидентные клетки перитонеальной жидкости получали промыванием брюшной полости раствором Хенкса в объеме 2 мл. Количество клеток в перитонеальной жидкости подсчитывали в камере Горяева, клеточный состав определяли по морфологическим критериям в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимза.

Таблица 2. *Образование нитритов (NO_2^-) перитонеальными клетками (макрофагами + моноцитами) мышей линии F_1 (CBA/Lac × C57BL/6) с перевиваемой карциномой легких Льюиса*

Сутки роста опухоли	Количество макрофагов (× 10^3) в 1 мкл	Количество NO_2^- на 10^6 клеток, моль
7-е	1,32 ± 0,23	(1,5 ± 0,9) × 10^{-7}
14-е	1,81 ± 0,09*	Не обнаружено
21-е	1,57 ± 0,09*	(6,0 ± 3,0) × 10^{-8}*
29-е (n = 6)	2,0 ± 0,26*	(3,5 ± 2,1) × 10^{-7}
Здоровые животные	1,42 ± 0,09	(1,8 ± 0,46) × 10^{-7}

Примечание. *В группах по 10 животных, кроме указанного значения n. * Сравнение с показателем для здоровых животных, $p < 0,01$.*

Анализ содержания летучих N-нитрозаминов в образцах опухолевой ткани проводили методом, включающим перегонку исследуемых соединений с водяным паром, экстракцию из водного дистиллята дихлорметаном с последующей очисткой и концентрированием экстракта [19]. Идентификацию и количественное определение N-нитрозаминов осуществляли газохроматографическим методом с использованием термоэнергетического анализатора TEA-800 (Cambridge Scientific, Великобритания) с программным обеспечением для автоматической обработки данных Clarity.

Экспрессию iNOS определяли иммуногистохимическим методом в парафиновых микросрезах легких и опухолей, полученных от мышей с карциномой Льюиса [20]. Для выявления iNOS использовали поликлональные кроличьи антитела к iNOS (Santa Cruz Biotechnology, США), для предотвращения неспецифического связывания антител с опухолью применяли блокатор (Invitrogen, США) и дополнительно блокирующий пептид sc-649P (Santa Cruz Biotechnology, США). Препараты изучали под световым микроскопом Biolam (Ломо, Россия).

Мы применяли комбинированную (количественную и качественную) оценку экспрессии iNOS в опухолевой ткани.

Количественная оценка. При окрашивании участка опухолевой ткани, который составляет менее 25 % общей площади среза, экспрессию iNOS считали отрицательной (0), 25–50 % – умеренной (1+), 50–75 % – сильной (2+), > 75 % – очень сильной (3+).

Качественная оценка. Интенсивность окрашивания опухолевой ткани, метастазов, ткани легких оценивали по следующим критериям: отсутствие окрашивания (0), слабая интенсивность окрашивания более 25 % опухолевой ткани (1+), средняя интенсивность окрашивания более 25 % опухолевой ткани (2+), сильная интенсивность окрашивания более 25 % опухолевой ткани (3+).

Выраженность экспрессии оценивали с учетом суммарного значения количественного и качественного показателей: отсутствие экспрессии считали при суммарном значении, равном 0 или 1, экспрессия была положительной при суммарном значении 2 (+), умеренной – при 3–4 (++), сильной – при 5–6 (+++).

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

Результаты и обсуждение

Результаты определения концентрации нитритов и нитратов показали, что суммарное значение метаболитов в опухолях с ростом карциномы Эрлиха увеличивалось особенно интенсивно на 3-й неделе, достигая уровня (7,80 ± 2,57) × 10^{-5} моль/кг опухоли, что в 10,7 раза ($p < 0,01$) выше аналогичного показателя, зарегистрированного на 7-е сутки (табл. 3). На терминальной стадии роста карциномы Эрлиха (28-е сутки) отмечали существенное снижение концентрации нитритов + нитратов в опухолевой ткани. При определении концентрации нитритов + нитратов, рассчитанной на кг м.т.ж., максимальное увеличение (в 39,9 раза ($p < 0,01$)) зарегистрировано на 3-й неделе роста опухоли по сравнению с показателем, отмеченным на 7-е сутки у мышей с карциномой Эрлиха (см. табл. 3). Оценка суммарного биосинтеза метаболитов NO по экскреции с мочой выявила увеличение их выделения в процессе роста карциномы Эрлиха у мышей линии Balb/c (см. табл. 1). Так, выделение нитритов + нитратов на 24-е сутки возросло в 37,3 раза ($p < 0,01$) по сравнению с показателем здоровых мышей ((1,1 ± 0,44) × 10^{-7} моль/кг м.т.ж.) Средний объем опухоли за этот период увеличился в 44,7 ± 10,6 раза. Прослеживается положительная связь между объемом карциномы Эрлиха и уровнем суточного выделения нитритов + нитратов с мочой (коэффициент детерминации 0,99). Следует отметить, что

Таблица 3. *Концентрация нитритов (NO_2^-) + нитратов (NO_3^-) в опухолях карциномы Эрлиха и карциномы легких Льюиса в разные сроки их роста у мышей линии F_1 (CBA/Lac × C57BL/6) (n = 10)*

Сутки роста опухоли	Карцинома Эрлиха			Карцинома легких Льюиса		
	Масса опухоли, г	Концентрация NO_2^- + NO_3^-, моль/кг опухоли	Концентрация NO_2^- + NO_3^-, моль/кг массы тела животного	Масса опухоли, г	Концентрация NO_2^- + NO_3^-, моль/кг опухоли	Концентрация NO_2^- + NO_3^-, моль/кг массы тела животного
7-е	0,912 ± 0,30	(7,30 ± 3,49) × 10^{-6}	(1,66 ± 0,79) × 10^{-7}	0,240 ± 0,11	(3,60 ± 0,46) × 10^{-5}	(2,88 ± 0,37) × 10^{-7}
14-е	1,695 ± 0,28	(1,73 ± 0,76) × 10^{-5}**	(7,33 ± 3,22) × 10^{-7}**	1,742 ± 0,61	(1,96 ± 0,54) × 10^{-5}**	(1,14 ± 0,31) × 10^{-6}**
21-е	3,395 ± 0,68	(7,80 ± 2,57) × 10^{-5}**	(6,63 ± 2,18) × 10^{-6}**	4,910 ± 1,75	(1,09 ± 0,29) × 10^{-5}**	(1,78 ± 0,47) × 10^{-6}**
28-е	5,42 ± 1,63	(2,05 ± 1,44) × 10^{-5}*	(2,78 ± 1,95) × 10^{-6}**	–	–	–
29-е	–	–	–	8,292 ± 1,66	(6,92 ± 3,92) × 10^{-6}**	(4,87 ± 2,76) × 10^{-7}*

** $p < 0,05$. ** Сравнение с соответствующим показателем на 7-е сутки роста опухолей, $p < 0,01$.*

нитраты являлись основной окисленной формой NO, обнаруживаемой как в опухолевой ткани, так и в моче.

Изменение концентраций нитритов + нитратов в процессе роста метастазирующей карциномы Льюиса у мышей линии F_1 имело свои особенности (см. табл. 3). Максимальная суммарная концентрация нитритов и нитратов в опухолевой ткани карциномы Льюиса, зарегистрированная на 7-е сутки, составила (3,60 ± 0,46) × 10^{-5} моль/кг опухоли, в дальнейшем она снижалась. В то же время при расчете концентрации нитритов и нитратов, выраженной в моль/кг м.т.ж., этот показатель достигал максимального значения на 21-е сутки и в 6,2 раза превышал показатель, определяемый на 7-е сутки. Следует отметить, что расчет концентрации нитритов + нитратов на кг м.т.ж. позволяет учитывать влияние увеличения массы опухоли, продуцирующей NO. Определение биосинтеза метаболитов NO по экскреции с мочой выявило достоверный рост их выделения в 6,75 раза в контрольный срок 14-х суток у мышей линии F_1 с карциномой Льюиса (см. табл. 1).

В экспериментах на мышах-самцах линии CBA/Lac, предрасположенных к образованию гепатом, повышенную ((3,73 ± 1,87) × 10^{-5} моль/кг м.т.ж.) экскрецию нитритов + нитратов с мочой обнаружили у 8-месячных мышей (период появления первых спонтанных опухолей). У 20-месячных мышей (91 % животных с опухолями) регистрировали снижение выделения не только по сравнению с 8-месячными, но и с 3-месячными мышами в 4,6 и 2,1 раза соответственно.

В опытах на мышах-самцах линии F_1 с индуцированными бенз(а)пиреном (в сумме 144 мкг на мышь) опухолями различной локализации в возрасте 22 и 25 мес регистрировали достоверное увеличение экскреции нитритов + нитратов в 10 и 17 раз соответственно. Следует отметить, что выделение метаболитов у мышей со спонтанными и индуцированными бенз(а)пиреном опухолями сопоставимо с аналогичным показателем у мышей с перевиваемыми опухолями.

Оценивая используемые подходы анализа эндогенного синтеза нитритов + нитратов, основанные на определении их концентрации в опухолевой ткани или экскреции с мочой, можно отметить наличие синхронности изменений показателей в первые 3 недели роста карциномы Эрлиха у мышей различных линий (F_1 и Balb/c). Для карциномы Льюиса такой очевидной согласованности в результатах, полученных разными способами, нет, однако и здесь подтверждается нарушение регуляции биосинтеза NO при прогрессии опухоли. Необходимо отметить, что показатель биосинтеза, оцениваемый по экскреции метаболитов NO с мочой, является интегральным и включает также метаболиты NO, образовавшиеся другими типами клеток для поддержания жизненно важных физиологических процессов [1, 5]. Помимо этого, следует указать на возможность депонирования NO в виде динитрозильных железосерных комплексов, S-нитрозотиолов, S-нитрозогемоглобина (Hb-SNO), нитрозильных комплексов гемоглобина (HbNO) и других комплексов. Кроме того, количество NO, связанное в комплексах и молекулах, может превышать количество NO в форме нитритов и нитратов [21–23]. Также возможно восстановление нитритов до NO неэнзиматическим путем в условиях снижения уровня pH в опухолевой ткани, а также с помощью ферментов дыхательной цепи митохондрий, электронно-транспортной цепи эндоплазматического ретикулума и цитохрома P-450 микросом [24].

Известно, что NO – важный медиатор противоопухолевой защиты. Продуцируемый иммунными клетками (макрофагами и нейтрофилами) NO оказывает цитостатическое и цитотоксическое действия на опухолевые клетки различного гистогенеза и туморогенности [25].

Результаты определения активности резидентных перитонеальных макрофагов + моноцитов по образованию ими NO_2^- (моль на 10^6 клеток) показали существенное снижение концентрации NO_2^- в перитонеальной жидкости мышей с карциномой Льюиса на 14-е и 21-е сутки роста опухоли. В эти сроки концентрация NO_2^- в перитонеальной жидкости либо не определялась, либо имела очень малые значения

(см. табл. 1). Можно полагать, что уменьшение продукции NO макрофагами может привести к снижению их цитотоксических свойств.

К настоящему времени выявлены органы (носоглотка, ротовая полость, желудок, пораженная гельминтами печень, инфицированный желчный пузырь, кишечник, инфицированный мочевой пузырь и инфицированное влагалище), в которых при определенных условиях возможно образование канцерогенных N-нитрозосоединений. В результате паразитарной или бактериальной инфекции, развития воспалительных процессов и возникновения активных форм азота (АФА), проявляющих нитрозирующую активность, возможно образование N-нитрозаминов и нитрозотиолов в условиях низких, физиологических и даже повышенных значений pH [26].

Газохроматографический анализ опухолей карциномы Эрлиха (рис. 1), выделенных у мышей-самцов (n = 24) линий F_1 и BDF на 14, 21, 28 и 35-е сутки выявил следующие соединения: N-нитрозодиметиламин (НДМА) и N-нитрозодиэтиламин (НДЭА). Отмечается выраженная вариабельность концентраций нитрозаминов в опухолях мышей линии F_1, которая изменялась от 0,029 до 0,546 мкг/100 г ткани для НДМА, от 0,14 до 0,49 мкг/100 г ткани для НДЭА. На позднем сроке роста карциномы Эрлиха средняя концентрация НДМА в опухолях мышей линии BDF составила 0,165 ± 0,148 мкг/100 г, а НДЭА – 0,48 ± 0,46 мкг/100 г. В контрольных образцах мышечной ткани, полученной от мышей, нитрозамины не обнаружены (рис. 2).

Есть основания полагать, что увеличение биосинтеза метаболитов NO опухолью происходит, прежде всего, за счет активации iNOS, однако нельзя исключить участия других изоформ NOS, особенно эндотелиальной [27].

Иммуногистохимическое определение экспрессии iNOS в микросрезах опухолевой ткани карциномы Льюиса (рис. 3) показало, что фермент выявлялся в основном на участках, расположенных ближе к периферии опухоли и в клетках стромы на всех контролируемых сроках. При этом интенсивность иммуноокрашивания несколько уменьшалась на 2-й неделе, однако на терминальной стадии количество клеток, экспрессирующих фермент, увеличивалось, при этом окрашивание было менее выраженным. В целом экспрессию фермента в опухолевой ткани можно оценить как положительную (табл. 4).

В опухолевых клетках, метастазирующих в легкие (см. рис. 3), иммуноокрашивание отсутствовало, что может свидетельствовать о селекционном отборе мигрирующих в легкие опухолевых клеток с низкой активностью iNOS.

Таким образом, полученные данные отражают возможность образования метаболитов NO в опухолях различного гистогенеза. Суммарная среднеарифметическая концентрация $NO_2^- + NO_3^-$ в опухолевой ткани карциномы Эрлиха изменялась в интервале от 3,5

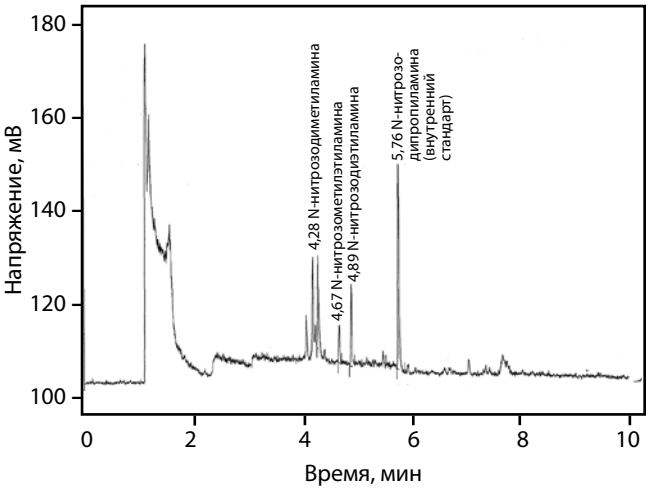

Рис. 1. *Результаты анализа на содержание N-нитрозаминов в опухолях у мышей линии F_1 (CBA/Lac× C57BL/6) с карциномой Эрлиха (14-е сутки)*

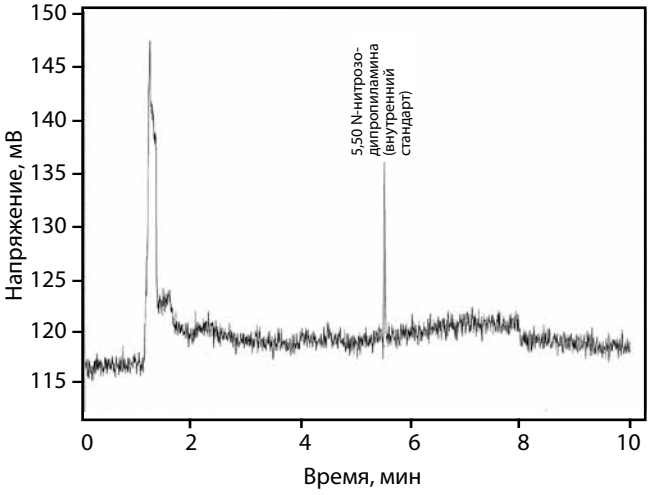

Рис. 2. *Результаты анализа на содержание N-нитрозаминов в мышечной ткани мышей линии F_1 (C57BL/6 × DBA/2 с карциномой Эрлиха (контроль)*

до 37,0 мкмоль (в эквиваленте NO), а в ткани карциномы Льюиса – от 3,3 до 17,0 мкмоль. С учетом неравномерной экспрессии iNOS в карциноме Льюиса можно полагать, что на отдельных участках локальная концентрация NO для этого типа опухоли может увеличиваться в 2–3 раза.

Как показали исследования на культуре опухолевых клеток молочной железы (MDA-MB-231 и MCF-7), низкие уровни концентрации NO (нмоль/л) увеличивают пролиферацию клеток через PI3K/pAkt и Raf/MEK/ERK 1/2 сигнальные каскады [14].

Активность ряда важных для канцерогенеза белков (HIF-1α, p53, ERK) находили в зависимости от уровня концентрации NO в микроокружении опухолевых клеток MCF-7. При низких уровнях концентраций NO (< 50 нмоль) фосфорилируются ERK посредством гуанилатциклазозависимого механизма. Аккумуляцию HIF-1α наблюдали при средних уровнях концентрации

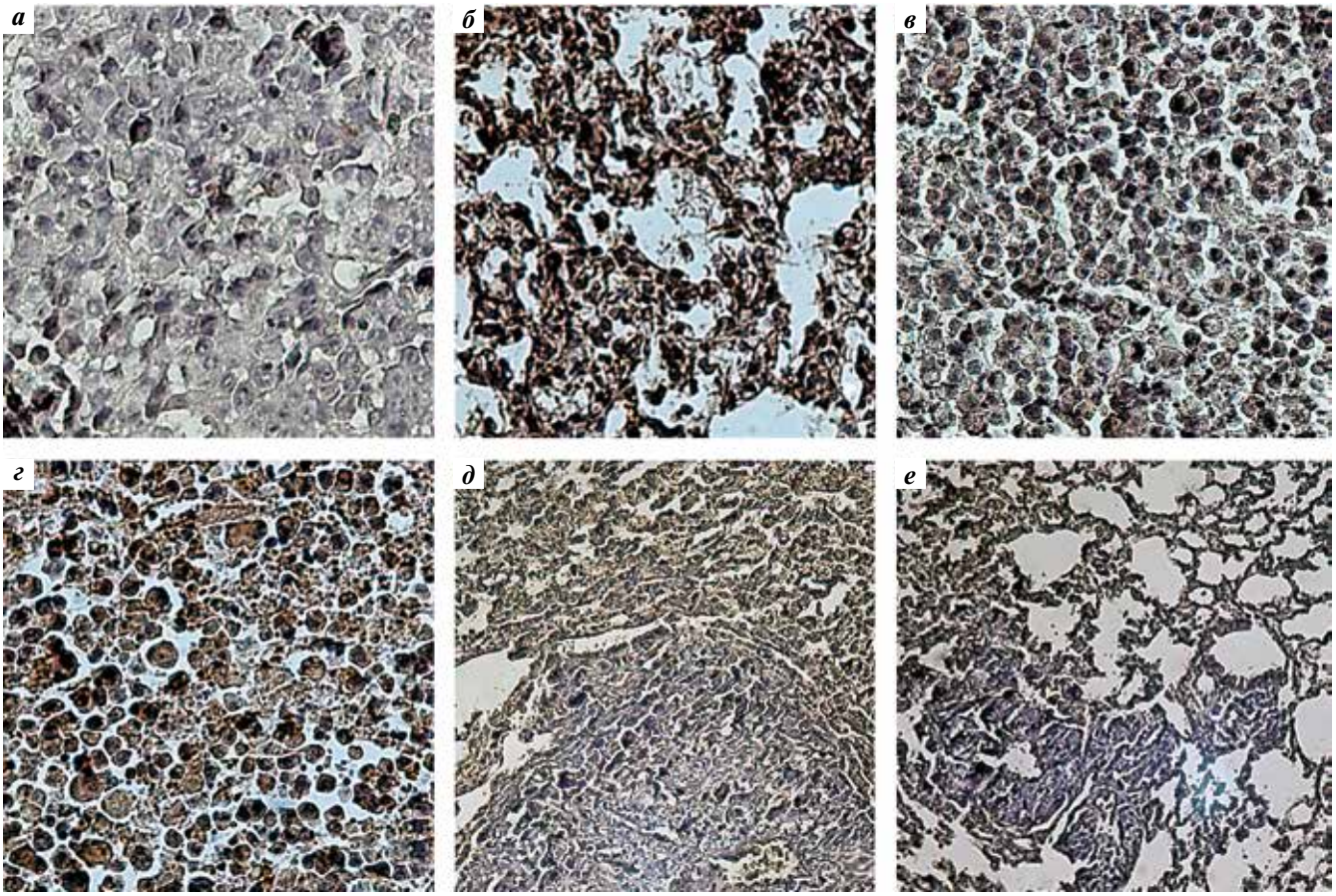

Рис. 3. *Иммуногистохимическое выявление iNOS в микросрезах легких и опухолевой ткани карциномы легких Льюиса в разные сроки ее роста (×400, докрашивание гематоксилином): а – иммуногистохимическое выявление iNOS в опухолевой ткани без обработки антителами к ферменту, реакция отсутствует (7-е сутки); б – коричневое окрашивание свидетельствует о наличии iNOS в опухолевой ткани на 7-е сутки ее роста; в – иммуногистохимическое определение iNOS без обработки антителами к ферменту, низкая интенсивность окрашивания; г – положительная реакция умеренной интенсивности в микросрезах опухолевой ткани (21-е сутки); д, е – низкая интенсивность окрашивания метастазов опухоли в легкие (21-е сутки)*

NO (> 1,0 × 10^{-7} моль), в то время как фосфорилирование серина p53-P-(ser-15) имело место при значительно более высоких уровнях (> 3,0 × 10^{-7} моль). Исследователи считают, что при достижении концентрации NO в тканях > 1 мкмоль создаются условия, классифицируемые как нитрозирующий стресс [12, 28]. При этом скорость реакций NO с O_2 увеличивается, что приводит к образованию более реакционных окислов азота с выраженными нитрозирующими свойствами. Показано, что при концентрациях NO > 1 мкмоль нитрозировались критические белки, такие как PARP и каспазы [13].

Таблица 4. *Экспрессия iNOS при росте карциномы легких Льюиса у мышей линии F_1 (CBA/Lac × C57BL/6)*

Сутки роста опухоли	Опухолевая ткань	Строма	Легкие	Метастазы в легких
7-е	++	++	++	–
14-е	+	+	+	0
21-е	+	+	+	0
28-е	+	+	0	+

Примечание. *«0» – отсутствие экспрессии; «+» – положительная экспрессия; «++» – умеренная экспрессия; « – » – экспрессию не определяли.*

Следовательно, в нашем случае при росте карциномы Льюиса на участках опухоли с выраженной экспрессией iNOS концентрация АФА иногда достигает уровней, характерных для нитрозирующего стресса. В этих условиях АФА могут инициировать апоптоз, повреждать ДНК, ингибировать митохондриальное дыхание, а также вызывать химическую модификацию белков, оказывая разнонаправленное действие на развитие опухоли.

NO проявляет себя как про-, так и антиметастатическое соединение, действие которого осуществляется через регуляцию сигнальных путей cGMP, COX-2, и оказывает влияние на активность матричных металлопротеиназ, интегринов в зависимости от экспозиции NO, типа клеток и т. д. [29]. Если принимать во внимание данные других авторов, можно прийти к заключению, что повышение уровня NO в первичной опухоли способствует ее прогрессии и метастазированию. Но в процессе диссеминации опухоли экспрессия iNOS в метастазирующих клетках большей частью по-

давлена [29]. Не противоречат этому выводу и данные исследования, выполненного ранее в Институте канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Авторы обнаружили, что низкотуморогенные и неметастазирующие клоны трансформированных эмбриональных клеток хомяка (STME) продуцировали значительное количество NO в ответ на индукцию макрофагами. Клетки со средней и высокой метастазирующей активностью, в отличие от неметастазирующих, демонстрировали низкую секрецию радикала [30]. Полученные в настоящей работе результаты отражают увеличение содержания iNOS в первичной опухоли и низкую экспрессию фермента в метастазах легких мышей с карциномой Льюиса и не расходятся с данными других исследователей [29].

Обнаружение в опухолевой ткани летучих нитрозаминов является еще одним непрямым индикатором образования реактивных форм азота: нитритов, N_2O_3, $ONOO^-$ и других форм, которые в реакции нитрозирования при взаимодействии со вторичными аминами могут образовать канцерогенные нитрозамины. Известно, что N-нитрозамины – сильные мутагены, которые алкилируют ДНК и проявляют высокую бластомогенную активность, причем установлено, что ни один вид подопытных животных не оказался резистентным к их действию [17, 26].

Образовавшийся в клетках NO имеет короткий полупериод жизни (6–10 с) и действует паракринно, в то время как более стабильные его метаболиты – нитриты и нитраты – в виде ионов циркулируют по всему организму с током крови и могут оказывать модулирующее влияние на многочисленные молекулы-мишени, в том числе на иммунные клетки и эритроциты. Так, в ранее проведенных нами исследованиях *in vitro* обнаружено снижение на 45,8–65,4 % ($p < 0,05$) образования активных форм кислорода стимулированными резидентными перитонеальными макрофагами и подавление на 11,2–76,4 % ($p < 0,05$) способности продуцировать активные формы кислорода аккумулированными перитонеальными нейтрофилами при концентрациях нитритов в среде от 17,3 мкмоль до 2,73 ммоль. В условиях *in vivo* продолжительное поступление в организм мышей линии Balb/c нитрита натрия с водой в концентрации 500 мг/л оказывало иммуносупрессивное действие, проявляющееся в угнетении на 49 % лейкопоэза и снижении на 35 % фагоцитарной активности стимулированных нейтрофилов крови у мышей [31].

Повышенная продукция нитритов в опухоли может способствовать образованию продуктов радикальной природы. Известно, что нитриты способны окислять оксигемоглобин до метгемоглобина с образованием супероксид анион-, нитрозильного и феррилгемоглобин-радикалов, а в условиях гипоксии взаимодействие дезоксигемоглобина (II) с нитритами приводит к образованию NO [32]. Способность нитритов индуцировать *in vitro* и *in vivo* образование радикальных соединений была подтверждена в выполненных нами ранее работах [33].

Интерес вызывают исследования, в которых показано, что нитриты оказывают потенцирующее действие на рост перевиваемых опухолей и канцерогенез, индуцированный химическими и биологическими факторами [34].

Приведенные данные указывают на то, что при действии на организм повышенных доз нитритов возможно снижение функциональной активности эффекторных клеток врожденного иммунитета и дополнительное образование высокореакционных радикальных продуктов, что может неоднозначно влиять на рост опухолей.

Выводы

Рост опухолей различного гистогенеза сопровождается повышением образования в опухолях метаболитов NO – нитратов и нитритов, концентрация которых на отдельных участках опухоли достигает уровней, характерных для нитрозирующего стресса, что может вызвать разнонаправленное действие АФА на рост опухолей.

На стадии интенсивного роста перевиваемой карциномы Льюиса способность перитонеальных макрофагов + моноцитов генерировать нитриты подавляется, что может указывать на снижение их цитотоксических свойств.

Показана возможность образования в опухолях карциномы Эрлиха канцерогенных НДМА и НДЭА, способных повышать частоту мутаций в клетках.

В опухолевых клетках карциномы Льюиса на всех контролируемых сроках ее роста выявлена положительная экспрессия iNOS, в то время как в метастазах в легкие иммуноокрашивание отсутствовало, что может свидетельствовать о селекционном отборе мигрирующих в легкие клеток с низкой активностью iNOS.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ignarro L.J. Nitric oxide, second edition: biology and pathobiology. 2nd edn. Academic Press, 2009.
2. Wink D.A., Vodovotz Y., Laval J. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. Carcinogenesis 1998;19(5): 711–21.
3. Cheng H., Wang L., Mollica M. et al. Nitric oxide in cancer metastasis. Cancer Lett 2014;353(1):1–7.
4. Hibbs J.B. Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. Res Immunol 1991;142(7):565–9.

5. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота. М.: Вузовская книга, 2004. 360 с. [Granik V.G., Grigor'ev N.B. Nitrogen oxide. Moscow: Vuzovskaya kniga, 2004. 360 p. (In Russ.)].
6. Nathan C., Xie Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994;269(19):13725–8.
7. Melillo G., Musso T., Sica A. et al. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. J Exp Med 1995;182(6):1683–93.
8. Mocellin S., Bronte V., Nitti D. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. Med Res Rev 2006;27(3):317–52.
9. Xu W., Liu L.Z., Loizidou M. et al. The role of nitric oxide in cancer. Cell Research 2002;12(5–6):311–20.
10. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. Cancer Metastasis Rev 1998;17(1):25–37.
11. Jones L.E. Jr., Ying J.L., Hofseth A.B. et al. Differential effects of reactive nitrogen species on DNA base excision repair initiated by the alkyladenine DNA glycosilase. Carcinogenesis 2009;30(12):2123–9.
12. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S. et al. The chemical biology of nitric oxide. implication in cellular signaling. Free Radic Biol Med 2008;45(1):18–31.
13. Ridnour L.A., Thomas D.D., Mancardi D. et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. Biol Chem 2004;385(1):1–10.
14. Pervin S., Singh R., Hernandez E. et al. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. Cancer Res 2007;67(1):289–99.
15. Недоспасов А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях. Биохимия 1998;63(7б):881–904. [Nedospasov A.A. Biogenous NO in competitive relations. Biokhimiya = Biochemistry 1998;63 (7b):881–904. (In Russ.)].
16. Choudhari Sh.K., Chaudhary M., Bagde S. et al. Nitric oxide and cancer: a review. Word J Oncol 2013;11:118.
17. Preussmann R. Carcirogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. Naturwissenschaften 1984;71(1):25–30.
18. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assay based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007;851(1–2):51–70.
19. Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах. Методические указания по методам контроля. МУК 4.4.1.011–93. [Determination of volatile N-nitrosamines in the food stock and foodstuffs. Methodology guidelines on control methods. МУК 4.4.1.011–93. (In Russ.)].
20. Vakkala M., Kahlos K., Lakari E. et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in *in situ* and invasive breast carcinomas. Clin Cancer Res 2000;6(6):2408–16.
21. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. Вестник РАМН 2000;(4):3–5. [Vanin A.F. Nitrogen oxide in biomedical studies. Vestnik RAMN = RAMS Herald 2000;(4):3–5. (In Russ.)].
22. Gaston B., Reilly J., Drazen J.M. et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90(23):10957–61.
23. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов. Успехи биологической химии 2007;47: 259–92. [Osipov A.N., Borisenko G.G., Vladimirov Yu.A. Biological role of nitrosel hemoproteins' complexes. Uspekhi biologicheskoy khimii = Successes of Biological Chemistry 2007;47:259–92. (In Russ.)].
24. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с. [Reutov V.P., Sorokina E.G., Okhotin V.E., Kositsyn N.S. Cyclic nitrogen oxide transformations in the organism of mammals. Moscow: Nauka, 1997. 156 p. (In Russ.)].
25. Hibbs J.B. Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. Res Immunol 1991;142(7):565–9.
26. Bartsch H. N-nitroso compounds and human cancer: where do stand? IARC Sci Publ 1991;(105):1–10.
27. Muntane J., la Mata M.D. Nitric oxide and cancer. World J Hepatol 2010;2(9): 337–44.
28. Thomas D.D., Espey M.G., Ridnour L.A. et al. Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p-53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. Proc Natl Acad Sci 2004;101(24):8894–9.
29. Cheng H., Wang L., Mollica M. et al. Nitric oxide in cancer metastasis. Cancer Lett 2014;353(1):1–7.
30. Burdelya L.G., Grosheva I.A., Dyakova N.A., Deichman G.I. Nonactivated macrophage-induced nitric oxide production by tumor cells differing in tumorogenic and spontaneous metastatic activities. Tumor Biol 1998;19:346–55.
31. Дерягина В.П., Машковцев Ю.В., Ильницкий А.П. Экспериментальное изучение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов в условиях воздействия нитрита натрия. Биомедицинская химия 2003;49(1):19–26. [Deryagina V.P., Mashkovtsev Yu.V., Il'nitskiy A.P. Experimental studies of the functional activity of neutrophils and macrophages, influenced by thes sodium nitrite. Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry 2003;49 (1):19–26. (In Russ.)].
32. Степуро И.И., Чайковская Н.А., Солодунов А.А., Арцукевич А.Н. Образование NO в процессе окисления ферроформ гемоглобина нитритом. Биохимия 1997;62(9):1122–9. [Stepuro I.I., Chaykovskaya N.A., Solodunov A.A., Artsukevich A.N. NO formation in the process of nitrite oxidation of hemoglobin ferroforms. Biokhimiya = Biochemistry 1997;62 (9):1122–9. (In Russ.)].
33. Дерягина В.П. Образование свободнорадикальных соединений при действии нитрита натрия на организм животных и в условиях *in vitro*. Токсикологический вестник 2003;(6):20–5. [Deryagina V.P. Formation of free radical compounds under the influence of the sodium nitrite on animals' organism and in in vitro conditions. Toksikologicheskiy vestnik = Toxicologic Herald 2003;(6):20–5. (In Russ.)].
34. Ильницкий А.П., Реутов В.П., Рыжова Н.И. и др. Модифицирующее действие нитритов на легочный бластомогенез и вирусный лейкозогенез у мышей: возможная роль окиси и двуокиси азота. Вестник РАМН 2000;(7):11–6. [Il'nitskiy A. P., Reutov V.P., Ryzhova N.I. et al. Modifying nitrites' influence on the pulmonary blastomogenesis and viral leucogenesis at mice: possible role of the nitrogen oxide and nitrogen dioxide. Vestnik RAMN = Herald RAMS 2000; (7):11–6. (In Russ.)].