

НАБЛЮДЕНИЕ В ДИНАМИКЕ МОДИФИКАЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕЙТРОФИЛОВ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ РОСТЕ ОПУХОЛИ *IN VIVO*

© В. Н. Мальцева, Н. В. Авхачева, Б. Ф. Санталов, В. Г. Сафронова¹

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.;
¹ *электронный адрес: safronova@icb.psn.ru*

Проведен анализ генерации активных форм кислорода (АФК) полиморфноядерными нейтрофильными гранулоцитами (нейтрофилами) из очага острого воспаления мышцей с солидной опухолью, развивающейся из инъецированных клеток карциномы Эрлиха. Показано, что развитие опухоли сопровождается значительными изменениями воспалительной реакции и функциональной активности нейтрофилов. Обнаружено динамическое повышение уровня спонтанной продукции АФК и зависимое от концентрации хемотаксического пептида N-формил-Мет-Лей-Фен (ФМЛФ) изменение интенсивности респираторного взрыва. По мере роста опухоли также трансформировалось действие ингибиторов киназ, участвующих в регуляции активности NADPH-оксидазы и проведении сигнала с рецептора ФМЛФ: тирозиновых киназ, протеинкиназы C, митогенактивируемой протеинкиназы p38 (p38 MAPK) и фосфатидилинозитид-3-киназы (PI3K). Наблюдалось противоположное по знаку влияния вортманнина (ингибитора PI3K) и SB 203580 (ингибитора p38 MAPK) на клетки животных с опухолью по сравнению с их влиянием на контрольные клетки. Это свидетельствует об изменении роли этих ферментов в регуляции респираторного взрыва периферических нейтрофилов при росте опухоли.

Ключевые слова: нейтрофил, респираторный взрыв, солидная опухоль.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ХЛ — хемилюминесценция, ФМЛФ — N-формил-Мет-Лей-Фен, ПКС — протеинкиназа C, СОД — супероксиддисмутаза, MAPK — митогенактивируемые протеинкиназы, PI3K — фосфатидилинозитид-3-киназа, TNF — фактор некроза опухоли, IL — интерлейкин, INF — интерферон.

Иммунная система играет важную роль в задержке роста и регрессии опухолей (Adam et al., 2003; O'Veirne, Harrison, 2004; Mocellin, 2005). Компоненты врожденного иммунитета (макрофаги, натуральные киллерные клетки, система комплемента и цитокины) активно участвуют в инактивации трансформированных клеток и новообразований (Rosen et al., 2000; Sfondrini et al., 2003; Hussein, 2005). Полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) также вовлечены в развитие противоопухолевого иммунного ответа (Di Carlo et al., 2001; Jablonska et al., 2005) и считаются важными при определенных видах противоопухолевой терапии (Chasseing et al., 1993). Нейтрофилы подавляют рост экспериментальных опухолей *in vivo* (Katano, Tosiru, 1982; Fujii et al., 1987; Wang et al., 1989). Прямое селективное цитостатическое и цитотоксическое действие нейтрофилов на опухолевые клетки подтверждено *in vitro* (Ueta et al., 1994; Pericle et al., 1996; Igney et al., 2004). Нейтрофилы первыми мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования (Stoppacciaro et al., 1993; Naka et al., 2005) и являются активными компонентами стромы (Muller, Fusenig, 2004). Они скапливаются в зонах наиболее интенсивного роста опухоли и ингибируют поверхностную диффузию опухолевых клеток (Bru et al., 2004). Нейтрофилы разрушают трансформированные и опухо-

левые клетки с помощью дефензинов, активных форм кислорода (АФК) и протеолитических ферментов (Lichtenstein, Kahle, 1985; Ottonelo et al., 1999; Di Cardo et al., 2001; Zivkovic et al., 2005). Однако роль нейтрофилов, как и других клеток врожденного иммунитета, в возникновении и развитии опухолей неоднозначна (de Visser et al., 2006). Показано, что на более поздних стадиях инфильтрация опухоли нейтрофилами способствует прогрессу опухоли усилением ангиогенеза и метастазирования с помощью L- и P-селектинов (Borsig et al., 2002), цитокинов и ферментов (Nielsen et al., 1996; Wu et al., 2001; Sun, Yang, 2004). Кроме того, на примере метастазирующих аденокарцином показано, что продуцируя перекись водорода, гранулоциты подавляют реакции адаптивного иммунитета (Schmielau, Finn, 2001).

Рост большинства злокачественных новообразований сопровождается изменениями основных звеньев иммунного ответа (Chen et al., 2003; Motta et al., 2003; Chang et al., 2004). Развивающаяся опухоль влияет на активность компонентов врожденного иммунитета, таких как естественные киллерные клетки (Funk et al., 2003), перитонеальные макрофаги (Valdez et al., 1990), дендритные клетки (Mushiake et al., 2005). Имеются сведения о модуляции функций нейтрофилов при развитии опухоли: уменьшение хемотаксической активности, стимули-

рованной формируемым пептидом (Ueta et al., 1994), возрастание либо понижение уровня продукции АФК (Чердынцева и др., 1992; Chasseing et al., 1993; Kasimir-Bauer et al., 1994; Aslan et al., 1998; Szuster-Ciesielska et al., 2004). Однако сведения о влиянии опухоли на функциональную активность нейтрофилов противоречивы. Изменения зависят от типа, локализации и стадии онкологического заболевания (Chasseing et al., 1993; Kasimir-Bauer et al., 1994; Мальцева и др., 2005).

В настоящее время остается малоизученным влияние опухоли и ее продуктов на активность NADPH-оксидазы, ответственной за продукцию АФК. Вопрос этот является важным из-за двойственной роли АФК в организме. Они не только обеспечивают защиту от патогенов и трансформированных клеток, но и участвуют в мутагенезе, повреждая белки и нуклеиновые кислоты, и содействуют пролиферации опухолевых клеток (Abelson, Stosel, 1978; Zhang et al., 1998; Sapone et al., 2003; Klaunig, Kamendulis, 2004; De Larco et al., 2004; Sun, Yang, 2004). Получены доказательства того, что сами опухолевые клетки экспрессируют mRNA компонентов NADPH-оксидазы, которая регулирует рост опухоли в аутокринной манере (Brag et al., 2002). Сложность ситуации состоит также в том, что аналоги NADPH-оксидазы фагоцитов являются важными для регуляции активности опухолевых клеток, например NOX4 в клетках почечных канальцев (Maranchie, Zhan, 2005), тогда как другие изоформы, например NOX1 в эпителии толстого кишечника, не связаны с генезом опухоли (Szanto et al., 2005).

Задачей настоящей работы — с использованием модели развивающейся в организме опухоли оценить в динамике способность периферических по отношению к опухоли нейтрофилов продуцировать АФК и определить особенности регуляции NADPH-оксидазы в зависимости от срока формирования опухоли.

Материал и методика

Объект. Исследование проведено на нейтрофилах мышей-самцов линии NMRI массой 25—30 г, полученных из Лаборатории биологического тестирования филиала Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и акад. Ю. А. Овчинникова РАН, функционирующей в соответствии с требованиями Международной системы GLP. Перед экспериментами животных адаптировали к конвенциональным условиям.

СOLIDНУЮ опухоль формировали внутримышечной трансплантацией $6 \cdot 10^5$ клеток карциномы Эрлиха в заднюю лапу мыши (Глушкова и др., 2002), контрольным животным инъецировали физиологический раствор. Всех животных содержали в одинаковых условиях со стандартным режимом кормления и подачи воды (Gabdoulkhakova et al., 2003).

Нейтрофилы изолировали из брюшной полости через 5 ч после инъекции 150 мкл суспензии зимозана (5 мг/мл), как это описано ранее (Сафронова и др., 2001). Фракцию нейтрофилов (98 % по окрашиванию акридиновым оранжевым) выделяли из суспензии перитонеальных клеток центрифугированием в растворе фиколл—урографин с плотностью 1.077 г/мл. Клетки сохраняли в номинально бескальциевой среде при 4 °С и использовали через 1 ч после изоляции. Измерения проводили в пластиковых ячейках с рабочим объемом 200 мкл при плотности 10^6 клеток/мл. Интактные клетки и клетки,

обработанные одним из ингибиторов, инкубировали в течение 20 мин при 37 °С. Использовали 1 мкМ GF 109203X — специфический ингибитор ПКС, 5 мкМ тирфостин 51 — ингибитор тирозиновых протеинкиназ, 1 мкМ SB 203580 — специфический ингибитор p38 MAPK (мол. масса) 38 кДа, 0.1 мкМ вортманнин — ингибитор фосфатидилинозит-3-киназы (PI3K), 1 ед./мл каталазы, 0.5 ед./мл супероксиддисмутазы (СОД), 1 мкМ дифенилиод — ингибитор NADPH-оксидазы, 1 мкМ ротенон — ингибитор дыхательной цепи митохондрий, 1 мкМ гистидин и 0.45%-ный этиловый спирт — перехватчики синглетного кислорода и радикала гидроксила соответственно.

Регистрация хемилюминесценции. Продукцию АФК оценивали по люминолзависимой хемилюминесценции. Измерения проводили с помощью хемилюминометра ХЕМИЛЮМ-12, разработанного в Институте биологии клетки РАН. Сигнал регистрировали последовательно от 12 ячеек с интервалом 2.5 с при 37 °С. Записывали базовый уровень, затем клетки активировали 0.1—50.0 мкМ ФМЛФ и продолжали запись. Параллельно регистрировали сигнал от проб с интактными и обработанными ингибитором клетками. Физиологический раствор для измерений имел состав (в мМ): NaCl — 138, KCl — 6, CaCl₂ — 1, MgSO₄ — 1, NaHCO₃ — 5, Na₂HPO₄ — 1, глюкоза — 5.5, HEPES — 10, люминол — 0.35, NaNO₃ — 0.1; 3 ед./мл пероксидазы, pH 7.4.

Реактивы. В работе были использованы: зимозан, среда Хенкса, HEPES, пероксидаза хрена (тип VI), супероксиддисмутазы (СОД), каталаза, хемотаксический пептид N-формил-Мет-Лей-Фен (ФМЛФ), SB 203580, тирфостин 51, вортманнин, GF 109203X, азид натрия, хлорид дифенилиода, ротенон, ионил, гистидин и фиколл (Sigma, США); урографин (Шеринг АО, Германия); этиловый спирт (Россия).

Обработка результатов. Эффект ингибиторов оценивали по отношению параметра, полученного от клеток, обработанных ингибитором, к параметру интактных клеток, принятому за 100 %. Различия между группами выявлены с помощью *t*-критерия Стьюдента по указанному в каждом случае числу независимых измерений, каждое из которых было проведено на клетках отдельного животного.

Результаты

Воспалительная реакция, одними из главных участников которой являются нейтрофилы, имела особенности у мышей с опухолью: через 5 ч после инъекции зимозана в брюшную полость привлекалось значительно большее количество нейтрофилов (рис. 1, а). В суспензии перитонеальных клеток контрольных мышей, кроме гранулоцитов присутствовали большие зернистые лимфоциты (около 3.6 %), тучные клетки (1.4 %) и небольшое количество дендритных клеток (0.2 %), тогда как у мышей с опухолью обнаруживались большие зернистые лимфоциты (около 0.7 %), тучные клетки (0.75 %) и дендритные клетки (примерно 3 %). У животных с опухолью нейтрофилы имели больший размер, увеличенное ядро с повышенной сегментацией и более выраженную зернистость цитоплазмы (рис. 1, б, в). Диаметр клеток возрастал от 8.6 ± 0.8 до 13.3 ± 0.9 мкм на 7-е сут после трансплантации опухоли ($n = 6$, $P < 0.001$).

Способность перитонеальных нейтрофилов генерировать АФК была оценена нами, чтобы установить влия-

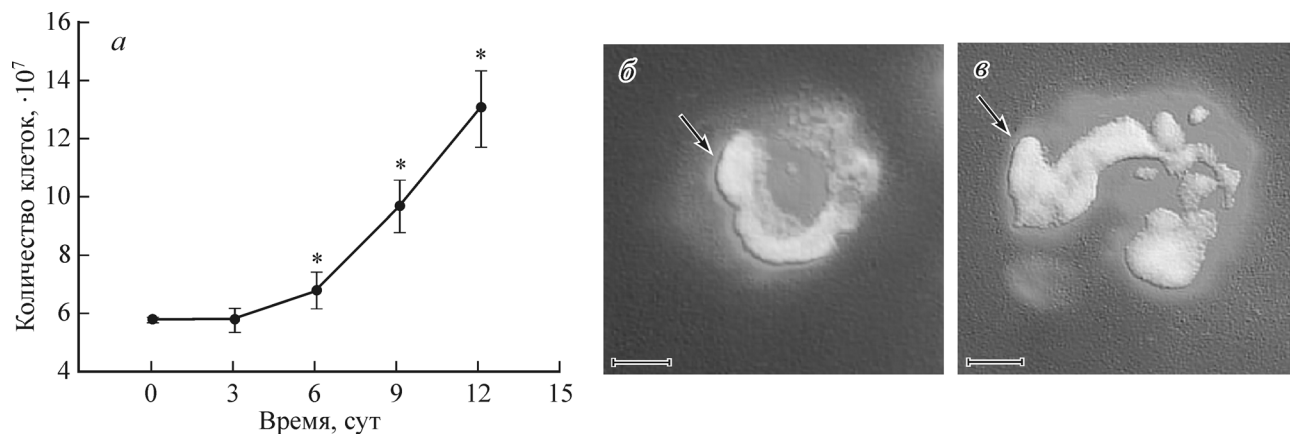


Рис. 1. Изменение количества нейтрофилов, полученных из очага острого воспаления контрольных животных (0 сут) и животных на 3—12-е сут после трансплантации клеток опухоли (а).

Здесь и далее показано среднее значение ± средняя квадратическая ошибка по указанному числу независимых измерений ($n = 20$), каждое из которых выполнено на клетках отдельного животного. Отличие от контрольного значения: * $P < 0.001$. Морфология ядра нейтрофилов контрольного животного (б) и животного на 7-е сут после трансплантации клеток карциномы Эрлиха (в). Масштабная линейка — 1.2 мкм. Краситель — Хёкст Н33342.

ние растущей опухоли на функции периферических клеток. Уровень спонтанной продукции АФК возрастал и достоверно отличался от контрольного значения на 6-е сут после трансплантации опухоли (табл. 1; рис. 2, а). Изменение ответа на N-формил-Мет-Лей-Фен (ФМЛФ) зависело от концентрации пептида и продолжительности роста опухоли. Наблюдались усиление ответа на ФМЛФ в концентрации 0.5 мкМ, близкой к пороговой, и уменьшение его при концентрациях выше 1 мкМ (рис. 2, б). Наблюдение в динамике показало, что амплитуда ответа на 10 мкМ ФМЛФ достоверно отличалась от контрольного уровня через 6 сут после прививки опухоли (табл. 1), при этом кинетика ответа характеризовалась более медленной скоростью нарастания и спада (рис. 2, а).

Таким образом, уровень продукции АФК покоящихся клетками у животных с растущей опухолью повышается, а активированными — понижается, что является признаком ослабления цитотоксичности и наличия окислительного стресса. Нейтрофилы при этом становятся источником повреждения клеток организма, не обеспечивают полноценной защиты от патогенов и способствуют прогрессу опухоли (Klaunig, Kamendulis, 2004; De Laro et al., 2004; Zivkovic et al., 2005). Кроме того, АФК включаются в аутокринную регуляцию жизнедея-

тельности и функций нейтрофилов (Spletstoeser, Schuff-Werner, 2002).

Интенсивность генерации АФК нейтрофилами определяется в основном активностью NADPH-оксидазы — мембранного фермента, осуществляющего перенос электронов от внутриклеточного NADPH на молекулу экзогенного кислорода (Babior et al., 2002). Помимо NADPH-оксидазы вклад в продукцию АФК вносят перекисное окисление липидов, миелопероксидаза (МПО) и дыхательная цепь митохондрий (Rosen et al., 1982; Ichikawa et al., 2004). Считается, что респираторный взрыв имеет немитохондриальную природу. Мы исключили вклад МПО добавлением 0.1 мМ NaNO₃ в реакционную среду. Ингибитор NADPH-оксидазы 1 мкМ дифенилиод полностью подавлял продукцию АФК в нейтрофилах. Ионол (10 мкМ), ингибитор перекисного окисления липидов, практически не влиял на генерацию АФК: ингибирующее составляло $3.7 \pm 1.8\%$ в покоящихся и $2 \pm 1\%$ ($n = 5$) в активированных клетках. Также слабо подавлял оба процесса (10.7 ± 3.8 и $8 \pm 2\%$ соответственно; $n = 5$) 1 мкМ ротенон, ингибитор дыхательной цепи митохондрий (Буфетов и др., 2004).

Следовательно, NADPH-оксидаза играет главную роль в наблюдаемой нами продукции АФК, оцениваемой

Таблица 1

Изменение уровня спонтанной и вызванной 10 мкМ ФМЛФ продукции АФК в нейтрофилах контрольных животных (0 сут) и животных на 3—12-е сут после трансплантации клеток опухоли, усл. ед.

Параметр	Время, сут				
	0	3	6	9	12
Спонтанная продукция	5.8 ± 0.5 (32) ^б	5.8 ± 0.1 (13)	$7.4 \pm 0.1^{а,б}$ (9)	8.6 ± 0.2^а (8)	8.7 ± 0.2^а (11)
Максимальная амплитуда	95.6 ± 7.2 (19)	90.7 ± 4.3 (5)	68.9 ± 9.4^а (6)	54.1 ± 3.1^а (6)	48.2 ± 4.7^а (5)

^аОтличие средней величины параметра от таковой контрольных животных (0 сут) статистически значимо ($P < 0.001$). ^бСреднее значение ± средняя квадратическая ошибка по результатам указанного в скобках числа независимых измерений.

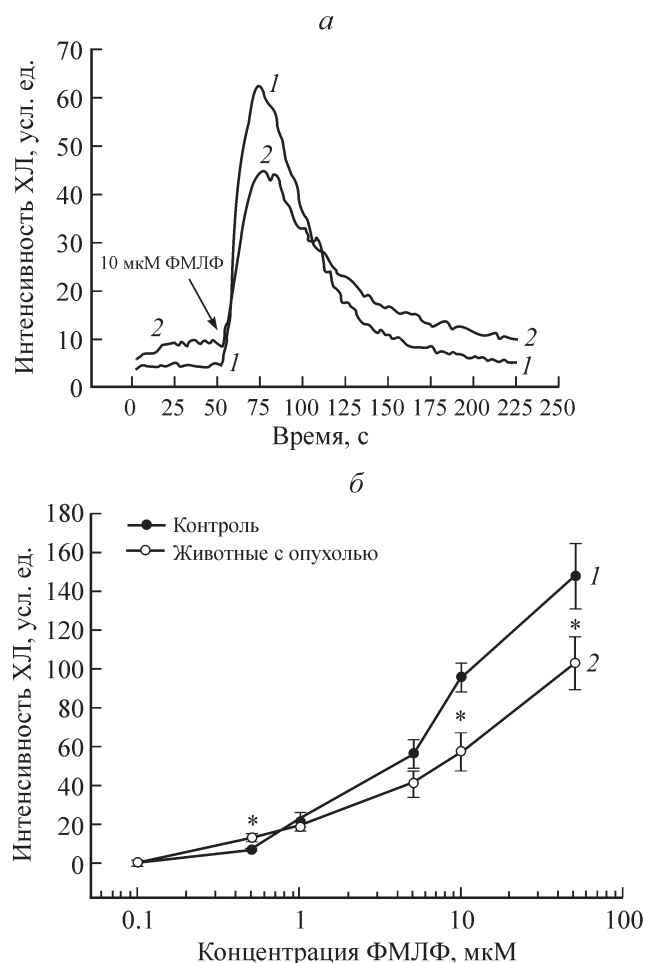


Рис. 2. Продукция АФК нейтрофилами контрольных животных (1) и животных на 7-е сут после трансплантации клеток опухоли (2), оцененная по хемилюминесценции (ХЛ).

а — записи спонтанной продукции АФК и ответа на 10 мкМ ФМЛФ (стрелка указывает момент добавления); б — зависимость максимальной амплитуды ответа от концентрации ФМЛФ. Приведены средние значения \pm средняя квадратическая ошибка по 5—19 независимым измерениям, каждое из которых сделано на клетках отдельного животного. Звездочка — отличие от контрольного значения (0 сут) статистически значимо, $P < 0.001$.

по люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ). Вклад в индукцию ХЛ в этом случае вносят супероксид-анион-радикал, перекись водорода, радикал гидроксила и синглетный кислород (Токмаков, Васильев, 1991). С помощью специфических «ловушек» мы оценили вклад разных АФК в суммарную продукцию (табл. 2). Эффект СОД и этилового спирта усиливался в покоящихся клетках мышей с опухолью по сравнению с контрольными, эффект гистидина многократно ослаблялся, действие каталазы не изменялось. В активированных клетках действие СОД и гистидина усиливалось, каталазы — значительно ослаблялось, эффект этилового спирта не изменялся. Таким образом, при росте опухоли уровень спонтанной продукции АФК нейтрофилами изменяется за счет супероксида, гидроксила и синглетного кислорода, вызванной продукции — за счет супероксида, синглетного кислорода и перекиси водорода.

Дисбаланс в генерации АФК в клетках животных с опухолью может быть следствием изменения активности компонентов, участвующих в регуляции активности NADPH-

оксидазы и передаче сигнала с рецептора ФМЛФ. Далее мы исследовали роль протеинкиназ и PI3K, участвующих в регуляции оксидазной активности в нейтрофилах. Все использованные нами ингибиторы (5 мкМ тирфостин 51, 1 мкМ GF109203X, 1 мкМ SB 203580 и 0.1 мкМ вортманнин) понижали уровень спонтанной продукции АФК (рис. 3, а). Действие тирфостина 51, GF109203X и вортманнина было значительно слабее в клетках мышей с опухолью, а действие SB 203580 — сильнее. Рост опухоли сопровождался постепенным ослаблением эффекта вортманнина (рис. 4, в) и усилением эффекта SB 203580 (рис. 5, в). Значительное различие действия GF109203X и вортманнина на спонтанную продукцию АФК в нейтрофилах контрольных животных и животных с опухолью наблюдалось уже на 3-и сут после трансплантации опухолевых клеток и на 6-е сут — в случае SB 203580. Это говорит об изменении роли ПКС, PI3K и p38 MAPK в регуляции спонтанного уровня продукции АФК нейтрофилами при развитии опухоли.

Влияние ингибиторов на респираторный взрыв, активированный 10 мкМ ФМЛФ, в клетках контрольных животных и животных с опухолью также различалось (рис. 3—5). Тирфостин 51, GF109203X и вортманнин значительно подавляли ответ контрольных клеток, тогда как SB 203580 его усиливал. В клетках животных с опухолью эффект тирфостина 51 был сильнее, тогда как эффект GF109203X ослаблялся (рис. 3, б). Вортманнин подавлял ответ в контроле, тогда как в нейтрофилах мышей с опухолью вортманнин усиливал ответ (рис. 3, б). Обратное наблюдалось для SB 203580: усиление ответа контрольных клеток и подавление клеток мышей с опухолью (рис. 3, б). Далее мы проанализировали действие вортманнина и SB 203580.

Ингибирование 0.1 мкМ вортманнином респираторного взрыва постепенно ослаблялось по мере развития опухоли (рис. 4, в). Достоверное изменение его действия наблюдалось на 3-и сут после трансплантации опухоли.

Таблица 2

Влияние специфических перехватчиков АФК на уровень спонтанной и вызванной 10 мкМ ФМЛФ продукции АФК периферическими нейтрофилами контрольных животных (0 сут) и животных на 7-е сут после трансплантации клеток опухоли (7 сут)

Агент	Ингибирование, %	
	базовый уровень	амплитуда
СОД, 0.5 ед./мл, сут	0	43.0 \pm 1.7 ^{а,б}
	7	48.0 \pm 2.5 ^б
Каталаза, 1 ед./мл, сут	0	19.2 \pm 1.7
	7	18.7 \pm 1.2
Этиловый спирт, 0.45 %, сут	0	24.4 \pm 3.6
	7	31.0 \pm 3.5 ^г
Гистидин, 1 мкМ, сут	0	12.7 \pm 1.5
	7	1.7 \pm 0.7 ^б

^аСреднее значение \pm средняя квадратическая ошибка по результатам 7 независимых измерений. ^бРазличие средних величин статистически значимо (^б $P < 0.001$; ^г $P < 0.01$).

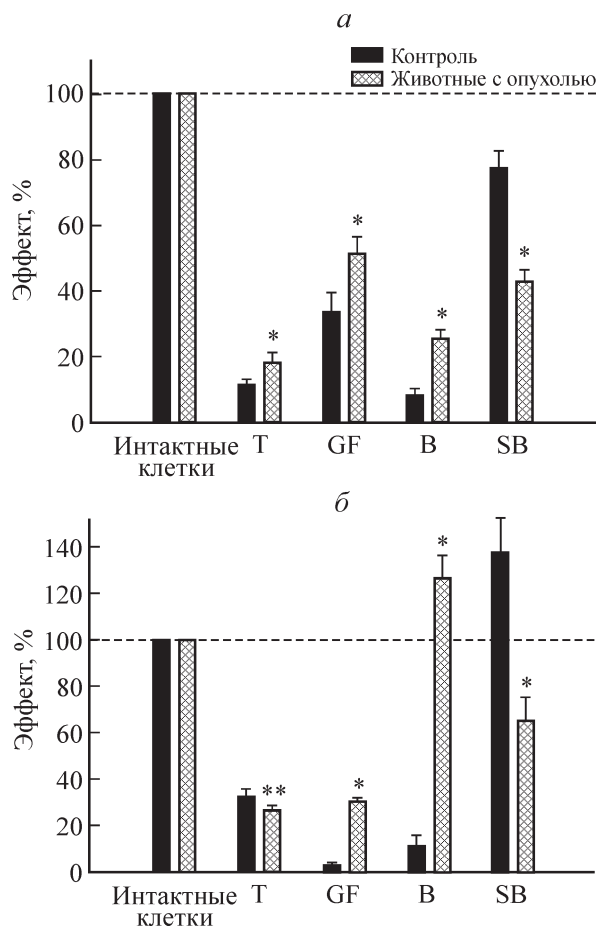


Рис. 3. Влияние ингибиторов на спонтанный уровень продукции АФК (а) и максимальную амплитуду ответа клеток на 10 мкМ ФМЛФ (б) нейтрофилов контрольных животных (черные столбцы) и животных с солидной опухолью на 7-сут после трансплантации опухолевых клеток (серые столбцы).

Приведены средние значения эффектов, рассчитанных как отношение параметра клеток, обработанных ингибитором, к параметру интактных клеток животных соответствующей группы, принятому за 100%. Показаны средние значения эффектов и средняя квадратическая ошибка по результатам 7—12 независимых измерений. Различие эффектов ингибиторов на клетки контрольных животных и животных с опухолью статистически значимо: * $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. Т — 5 мкМ тирфостин 51, GF — 1 мкМ GF109203X, В — 0.1 мкМ вортманнин, SB — 1 мкМ SB 203580.

На 9-е сут вортманнин даже усиливал ответ нейтрофилов на 10 мкМ ФМЛФ. Экспериментальные записи наглядно демонстрируют влияние вортманнина с разным знаком на респираторный взрыв, вызванный 10 мкМ ФМЛФ, в нейтрофилах контрольных животных и животных с опухолью (рис. 4, а, б). Таким образом, Р1ЗК участвует в передаче сигнала с рецептора ФМЛФ на NADPH-оксидазу с усилением ее активности в контрольных клетках и с подавлением активности — в клетках животных с опухолью.

Действие ингибитора р38МАРК также изменялось по мере роста опухоли (рис. 5, в): в контрольных клетках 1 мкМ SB 203580 усиливал респираторный взрыв, вызванный 10 мкМ ФМЛФ, на 3-и сут он практически не влиял и на более поздних сроках значительно подавлял ответ. Обращение эффекта 1 мкМ SB 203580 на продукцию АФК при развитии опухоли наглядно демонстрируют экспериментальные записи (рис. 5, а, б). В обра-

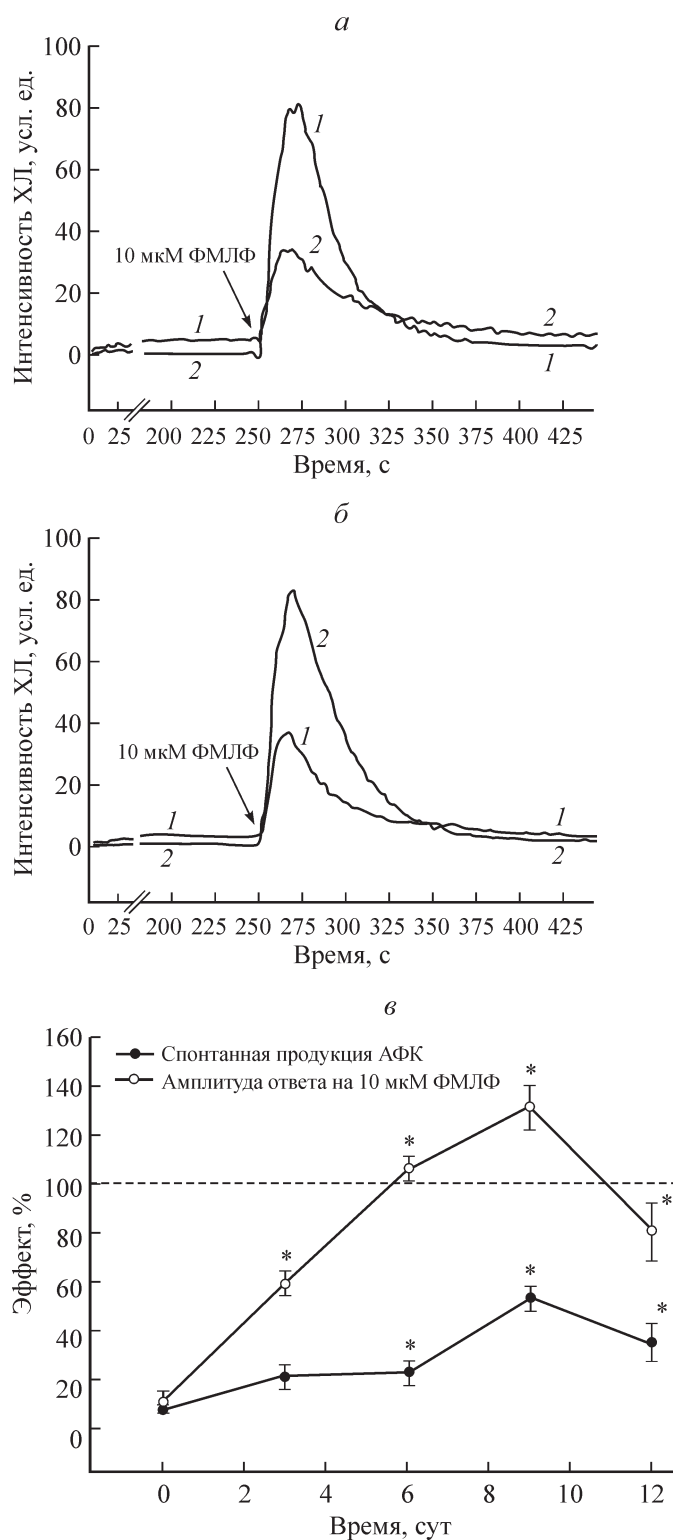


Рис. 4. Влияние 0.1 мкМ вортманнина на продукцию АФК в нейтрофилах.

Записи ответов на 10 мкМ ФМЛФ нейтрофилов контрольных мышей (а) и мышей с солидной опухолью на 7-сут после трансплантации (б): интактные клетки (1) и клетки, обработанные вортманнином (2). в — влияние 1 мкМ SB вортманнина на спонтанную продукцию АФК (черные кружки) и респираторный взрыв, вызванный 10 мкМ ФМЛФ (белые кружки), при развитии опухоли в течение 12 сут. За 100% в обоих случаях принят соответствующий параметр клеток без обработки вортманнином. Звездочка — достоверное отличие от контрольного значения (0 сут), $P < 0.001$.

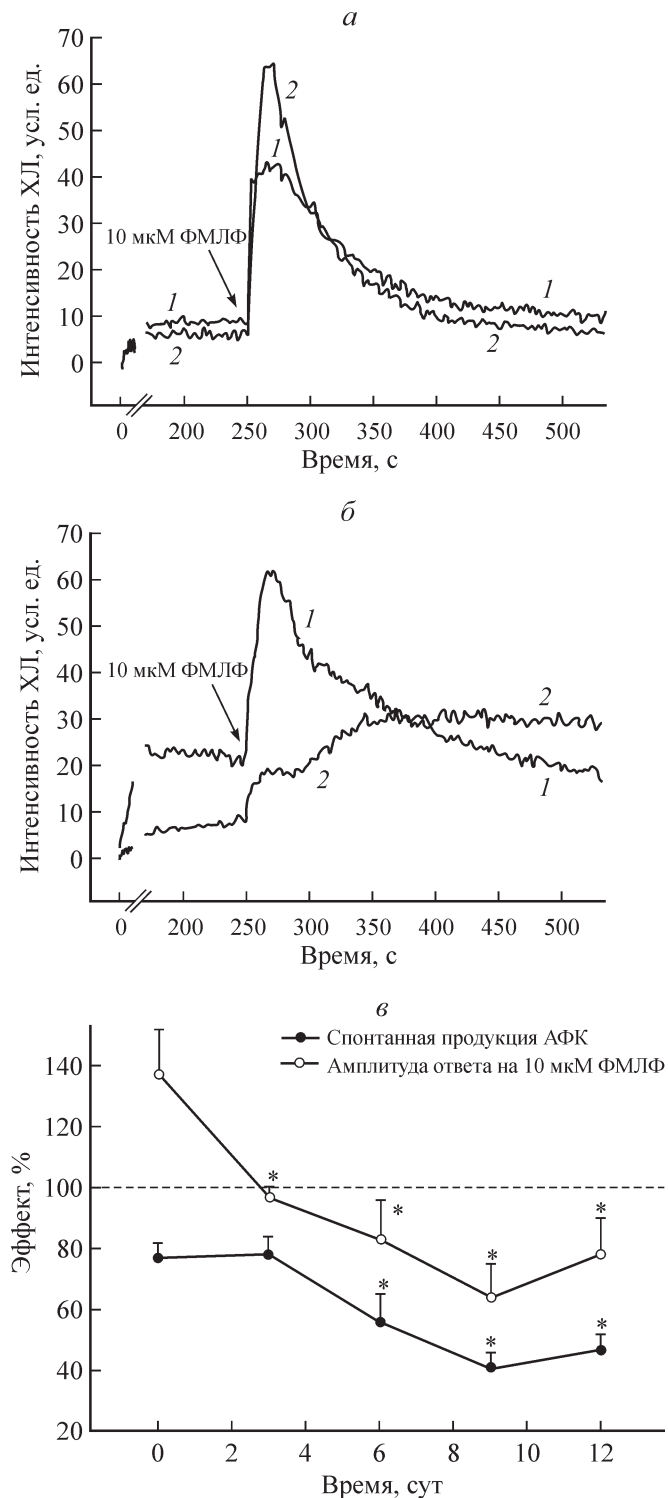


Рис. 5. Влияние 1 мкМ SB 203580 на продукцию АФК в нейтрофилах.

Записи ответов на 10 мкМ ФМЛФ нейтрофилов контрольных мышей (а) и мышей с опухолью на 7-е сут после трансплантации (б): интактные клетки (1) и клетки, обработанные ингибитором (2). в — влияние 1 мкМ SB 203580 на спонтанный уровень продукции АФК (черные кружки) и на продукцию АФК, инициированную 10 мкМ ФМЛФ (белые кружки), при развитии опухоли в течение 12 сут. За 100% в обоих случаях принят соответствующий параметр клеток без обработки ингибитором. Звездочка — достоверное отличие от контрольного значения (0 сут), $P < 0.001$.

ботанных ингибитором клеток животных с опухолью изменена кинетика ответа (рис. 5, б, кривая 2). Ответ продолжает нарастать примерно через 30 с после добавления ФМЛФ, тогда как в других случаях в это время виден спад (рис. 5, а, б, кривые 1). Добавление 1 мкМ GF109203X подавляло развитие этой фазы, тогда как 0.1 мкМ вортманнин и 5 мкМ тирфостин 51 не влияли на этот процесс. Это показывает, что ингибирование p38MAPK приводит к медленной активации ПКС при формировании ответа.

Изменение эффекта 1 мкМ GF109203X на продукцию АФК нейтрофилами животных с опухолью (рис. 3) также имело динамический характер. Уже на 3-и сут оно было значительным; на 12-е сут после трансплантации опухоли ингибирование составляло $64 \pm 1\%$ ($n = 5$, $P < 0.001$), что отличалось от влияния на респираторный взрыв нейтрофилов контрольных животных ($96.4 \pm 0.7\%$, $n = 8$).

Обсуждение

Наблюдение в динамике при росте опухоли в организме свойств периферических нейтрофилов выявило изменение их функционирования, что проявлялось в воспалительной реакции, способности продуцировать АФК и особенностях регуляции NADPH-оксидазы. Мы не наблюдали никаких из описываемых нами изменений при введении животным физиологического раствора или апоптотических клеток опухоли после предварительной инкубации с митомицином С. По мере роста опухоли в очаге острого воспаления привлекалось большее количество нейтрофилов (рис. 1). Это может быть вызвано несколькими причинами: возрастанием общего числа нейтрофилов в крови (Aslan et al., 1998), модификацией способности клеток к адгезии и миграции (Chuluyuan et al., 2000), увеличением продолжительности их жизни (Ishikawa, Miyazaki, 2005). Нейтрофилез при опухолях считается следствием увеличения количества клеток-предшественников гранулоцит-макрофагального ряда в костном мозге (Watari et al., 2000). В последнее время активно обсуждается концепция, согласно которой развитию опухоли способствует хроническое воспаление, сопровождающееся увеличением уровня провоспалительных и регуляторных цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-1, -2, -4) (Di Carlo et al., 2001; de Visser et al., 2006). При постоянном воздействии цитокинов и факторов роста, секретруемых опухолью и ассоциированными с ней нейтрофилами и макрофагами, подавляется входение нейтрофилов в апоптоз, что удлиняет время их жизни (Ishikawa, Miyazaki, 2005). Повышенную способность к миграции в очаг воспаления нейтрофилы приобретают вследствие праймирования цитокинами за счет усиленной экспрессии на плазматической мембране адгезивных молекул, участвующих во взаимодействии с эндотелием сосудов и межтканевым матриксом (Chuluyuan et al., 2000). Активация миграции опухолевых клеток происходит с участием тех же интегринов, что в нейтрофилах (Chuluyuan et al., 2000). Клетки опухоли выделяют хемокин СХС, который активирует миграцию нейтрофилов и самих клеток опухоли и стимулирует экспрессию интегрина β_1 , необходимого для метастазирования (Reiland et al., 1999; Adam et al., 2003). Остается неясным, за счет чего увеличивается размер клеток (рис. 1). Сообщений об изменении морфологии нейтрофилов при развитии опухоли в организме

мы не обнаружили. Однако показано репрограммирование нейтрофилов в макрофаги под действием факторов роста (Araki et al., 2004). О необратимой модификации нейтрофилов говорит также то, что у мышей с опухолью они были способны относительно стабильно генерировать АФК в течение почти 3 сут после изоляции. Это является удивительным фактом, так как клетки контрольных животных функционируют не более 2.5—3.0 ч.

Изменение популяционного состава клеток в очаге воспаления (см. раздел «Результаты») может быть связано с жизнедеятельностью опухоли. Так, при раковых заболеваниях выявлены вариации в соотношении субпопуляций клеток в крови, например иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (Shiku, 2003). Общее число нейтрофилов и количественная пропорция между гранулоцитами и лимфоцитами в крови используются как важные диагностические и прогностические показатели (Fetterly et al., 2001; Walsh et al., 2005). Увеличение пропорции дендритных клеток может быть объяснено тем, что при наличии в организме мощного иммунологического стимула, чем является опухоль, ускоряется их созревание и усиливается миграция (Mushiake et al., 2005).

В литературе имеются довольно многочисленные данные об изменении функциональной активности нейтрофилов при развитии опухоли, в том числе способности продуцировать АФК (см., например: Чердынцева и др., 1992; Chasseing et al., 1993; Kasimir-Bauer et al., 1994; Aslan et al., 1998; Szuster-Ciesielska et al., 2004). Однако сведения эти противоречивы; вероятно, влияние опухоли зависит от комплекса причин, включающего в себя локализацию исследуемых клеток (клеток стромы, периферических или ассоциированных с опухолью клеток), тип и локализацию опухоли, продолжительность ее роста. Наши результаты показывают, что генерация АФК в периферических нейтрофилах характеризуется повышением спонтанного уровня и понижением ответа на активацию в клетках животных с опухолью по мере ее развития (табл. 1; рис. 2). Судя по действию специфических перехватчиков, уровень продукции АФК клетками мышей с опухолью изменялся за счет супероксидного анион-радикала, гидроксила, синглетного кислорода и перекиси водорода (табл. 2). Оценка спектра АФК является важной, так как продукты дисмутации супероксида, исходно образующегося при активации NADPH-оксидазы, обладают разными физико-химическими свойствами и модифицирующей активностью. Сам супероксид не считается токсичным, но является исходной формой для образования перекиси водорода (Bazilaj et al., 2002). Радикал гидроксила, один из сильнейших окислителей, повреждает генетический материал, вызывает окисление липидов, углеводов и белков. Мишенями синглетного кислорода являются многие биологические молекулы, включая мембранные липиды (Hampton et al., 1998). Перекись водорода является относительно стабильной формой и в низких концентрациях действует как внутриклеточная сигнальная молекула (Sauer et al., 2001), в высоких концентрациях вызывает необратимую окислительную модификацию белков (Finkel, 2000). Показано, что H_2O_2 выступает в качестве хемоаттрактанта для нейтрофилов (Klyubin et al., 1996), что может являться одной из причин усиления миграции клеток в брюшную полость (рис. 1).

Между параметрами, характеризующими динамику роста опухоли, и уровнем спонтанной и активированной продукции АФК нами установлен высокий уровень кор-

реляции ($r = 95$ и $r = -98$ соответственно). Как сказано ранее (см. раздел «Результаты»), NADPH-оксидаза играет основную роль в наблюдаемой нами генерации АФК. Поэтому изменения, возникающие при развитии опухоли, могут быть отнесены именно к изменению регуляции активности NADPH-оксидазы. Каким образом опухоль может влиять на такую регуляцию? Возможно, усилением потребления ресурсов организма или выделением факторов регуляции. Клетки опухоли конкурируют с нормальными клетками организма за метаболические ресурсы (Emmendoerffer et al., 2000). Существует взаимосвязь между уровнем цитокинов и хемотаксических факторов, выделяемых раковыми клетками, и степенью вовлеченности нейтрофилов в иммунный ответ (Di Carlo et al., 2001). Раковые клетки секретируют широкий спектр цитокинов: TNF- α , IL-1, -2, -4, -7, -8, гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор, которые создают и поддерживают определенное микроокружение развивающейся опухоли (Graf et al., 2001; Mueller, Fusenig, 2004). Возможно, что цитокины, праймируя или активируя нейтрофилы, запускают процессы, модифицирующие основные внутриклеточные регуляторные системы (Condliffe et al., 1998). В экспериментах *in vitro* показано, что TNF- α и IL-8 модулируют активность NADPH-оксидазы нейтрофилов за счет праймирования (Cougerot-Pocidal et al., 2002). В наших экспериментах обнаружены изменения регуляции со стороны PKC, PI3K, тирозинных протеинкиназ и p38MAPK (рис. 3—5). Ранее было установлено участие этих ферментов в действии цитокинов на NADPH-оксидазу в нейтрофилах (Ohira et al., 2003; Brown et al., 2004; Condliffe et al., 2005; Guichard et al., 2005). Полученные нами результаты (рис. 4, 5) показывают, что при наличии опухоли в организме происходит переключение регуляции NADPH-оксидазы со стороны p38MAPK (положительное влияние сменяется на отрицательное) и PI3K (отрицательное влияние сменяется на положительное). Мы не обнаружили в доступной нам литературе подобных фактов. Скорее всего, это следствие комплекса причин, которые могут быть выявлены в дальнейших исследованиях.

Таким образом, динамика роста опухоли, изменение спектра и уровня АФК и эффектов ингибиторов специфических ферментов, участвующих как в регуляции активности NADPH-оксидазы, так и в развитии рака, подтверждают, что растущая в организме опухоль модифицирует функционирование нейтрофилов. В настоящее время применение ингибиторов протеинкиназ и PI3K рассматривается как новый метод противоопухолевой терапии (Davies et al., 2000; Sebolt-Leopold, Herrera, 2004; Cheng et al., 2005; Wymann, Marone, 2005). Сведения об изменении роли сигнальных молекул в периферических нейтрофилах важны для оценки совместности терапевтических процедур на разных стадиях развития опухоли. Представляется перспективным получать новые данные о роли нейтрофилов в защите организма от раковой агрессии. Тем не менее с осторожностью надо относиться к предложению стимуляции нейтрофилов при противораковой терапии (Александровский, 2002). Эффективность противоопухолевого действия нейтрофилов будет определяться этиологией опухоли (de Visser et al., 2006).

Авторы выражают глубокую признательность В. Н. Качаченко за разностороннюю помощь, Л. М. Кротовой за помощь в работе с животными, А. А. Гриневицу за про-

граммное обеспечение экспериментов, Е. В. Мельниковой и В. М. Вершинину за помощь в фотосъемке.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НШ-1842.2003.4.

Список литературы

- Александровский Я. А. 2002. Молекулярные механизмы взаимовлияния патологических процессов при совместном протекании сахарного диабета и рака. Научные и клинические аспекты. Биохимия. 67 (12) : 1611—1631.
- Буфетов Е. Н., Полягалова О. О., Пономарева А. А. 2004. Ультраструктурные особенности митохондрий в процессе адаптации клеток к действию ротенона. Цитология. 46 (11) : 985—992.
- Глушкова О. В., Новоселова Е. Г., Синотова О. А., Врублевская В. В., Фесенко Е. Е. 2002. Иммуномодулирующее действие низкоинтенсивных электромагнитных волн на продукцию фактора некроза опухолей у мышей с различной скоростью опухолевого роста. Биофизика. 47 (2) : 376—381.
- Мальцева В. Н., Сафронова В. Г., Арапов Н. А. 2005. Сравнение продукции активных форм кислорода клетками крови и ее регуляции в группах пациентов с онкологическими заболеваниями. Мед. иммунол. 7 (2—3) : 204.
- Сафронова В. Г., Габдулхакова А. Г., Миллер А. В., Косарев И. В., Василенко Р. Н. 2001. Вариабельность действия инсулина на респираторный взрыв в нейтрофилах. Роль тирозинных киназ и фосфатаз. Биохимия. 66 (8) : 1036—1047.
- Токмаков А. А., Васильев В. Ю. 1991. Исследование роли активных форм кислорода в индукции люминолзависимой хемилюминесценции макрофагов. Биохимия. 56 (2) : 250—257.
- Чердынцева Н. В., Наумов С. А., Удут В. В., Пешкова О. А., Шенеткин И. А. 1992. Окислительный метаболизм нейтрофильных гранулоцитов крови при предраке и раке желудка. Биохимия. 7 (1) : 182—187.
- Abelson H. T., Stossel T. P. 1978. Neutrophil/tumour-cell rosettes in ascitic fluid of patient with lymphoma. Lancet. 1 : 1217.
- Adam J. K., Odhav B., Bhoola K. D. 2003. Immune responses in cancer. Pharmacol. Ther. 99 : 113—132.
- Araki H., Katayama N., Yamashita Y., Mano H., Fujieda A., Usui E., Mitani H., Ohishi K., Nishii K., Masuya M., Minami N., Nobori T., Shiku H. 2004. Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. Blood. 103 : 2973—2980.
- Aslan M., Yucel G., Bozcuk H., Savas B. 1998. The effect of recombinant human granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (rHu GM-CSF) and rHu G-CSF administration on neutrophil chemiluminescence assay in patients following cyclic chemotherapy. Cancer Immunol. Immunother. 47 : 176—181.
- Babior B., Lambeth J., Nausseff W. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. Arch. Biochem. 2 : 342—344.
- Barzilai A., Rotman G., Shiloh Y. 2002. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. DNA Repair. 1 : 3—25.
- Borsig L., Wong R., Hynes R. O., Varki N. M., Varki A. 2002. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 2193—2198.
- Brar S. S., Kennedy T. P., Sturrock A. B., Huecksteadt T. P., Quinn M. T., Whorton A. R., Hoidal J. R. 2002. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 282 : C1212—C1224.
- Brown G. E., Stewart M. Q., Bissonnette S. A., Elia A. E. H., Wilker E., Yaffe M. B. 2004. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. J. Biol. Chem. 279 : 27 059—27 068.
- Bru A., Albertos S., Lopez Garcia-Asenjo J. A., Bru I. 2004. Pinning of tumoral growth by enhancement of the immune response. Phys. Rev. Lett. 92 : 23 8101—1—4.
- Chang W. C., Sheu B. C., Chen R. C., Chow S. N., Huang S. C. 2004. Depressed host immunity in a case of metachronous primary uterine papillary serous carcinoma and non-Hodgkin's lymphoma. Int. J. Gynecol. Cancer. 14 : 1030—1032.
- Chasseing N. A., Baranao R. I., Fernandez O., Bordenave H., Rumi L. S. 1993. Chemiluminescence production by neutrophils and immune complex levels in cancer patients. Cancer Invest. 11 : 517—522.
- Chen Y. L., Chen S. H., Wang J. Y., Yang B. C. 2003. Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. J. Immunol. 171 : 1183—1191.
- Cheng J. Q., Lindsley C. W., Cheng G. Z., Yang H., Nicotia S. V. 2005. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. Oncogene. 24 : 7482—7492.
- Chuluyan H. E., Lang B. J., Issekutz A. C. 2000. Differential mechanisms of neutrophil and monocyte adhesion on neuroblastoma cells: CD18 and VLA-4 integrins mediate adhesion to SK-N-SH, but not to SK-N-MC cell line. J. Neurosci. Res. 60 : 649—655.
- Condliffe A. M., Davidson K., Anderson K. E., Ellson C. D., Crabbe T., Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B., Turner M., Webb L., Wymann M. P., Hirsch E., Ruckle T., Camps M., Rommel C., Jackson S. P., Chilvers E. R., Stephens L. R., Hawkins P. T. 2005. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. Blood. 106 : 1432—1440.
- Condliffe A. M., Kitchen E., Chilvers E. R. 1998. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. Clin. Sci. (London). 94 : 461—471.
- Davies S. P., Raddy H., Caivano M. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. J. Biochem. 351 : 95—105.
- De Larco J. E., Wuertz B. R. K., Furcht L. T. 2004. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. Clin. Cancer Res. 10 : 4895—4900.
- Di Carlo E., Forni G., Lollini P. L., Colomoto M. P., Modesti A., Musiani P. 2001. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. Blood. 97 : 339—345.
- Emmendoerffer A., Hecht M., Boeker T., Mueller M., Heinrich U. 2000. Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. Toxicol. Lett. 112—113 : 185—191.
- Fetterly G. J., Tamburlin J. M., Straubinger R. M. 2001. Paclitaxel pharmacodynamics: application of a mechanism-based neutropenia model. Biopharm. Drug Dispos. 22 : 251—261.
- Finkel T. 2000. Redox-dependent signal transduction. FEBS Lett. 476 : 52—54.
- Fujii Y., Kimura A., Arai S., Sando F. 1987. In vivo antitumor effect of lymphokine-activated rodent polymorphonuclear leukocytes. Cancer Res. 47 : 6000—6005.
- Funk J., Bach U., Failing K., Burkhardt E. 2003. Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours. Res. Vet. Sci. 74 : 129—135.
- Gabdoukhakova A. G., Safronova V. G., Miller A. V., Sadovnikov V. B. 2003. Expression of genotypic and phenotypic features in animals during activation and priming of the neutrophil respiratory burst. Baltic J. Lab. Animal Sci. 13 : 78—85.
- Gougerot-Pocidallo M. A., el Benna J., Elbim C., Chollet-Martin S., Dang M. C. 2002. Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. Soc. Biol. 196 : 37—46.
- Graf M., Prins R., Merchant R. 2001. IL-6 secretion by a rat T9 glioma clone induces a neutrophil-dependent antitumor response with resultant cellular, antiangioma immunity. J. Immunol. 166 : 121—129.
- Guichard C., Pedruzzi E., Dewas C., Fay M., Pouzet C., Bens M., Vandewalle A., Ogier-Denis E., Gougerot-Pocidallo M. A., Elbim C. 2005. Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. J. Biol. Chem. 280 : 37 021—37 032.
- Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C. 1998. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood. 92 : 3007—3017.

- Hussein M. R. 2005. Tumor-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight. *Br. J. Dermatol.* 153 : 18—21.
- Ichikawa H., Kokura S., Aw T. Y. 2004. Role of endothelial mitochondria in oxidant production and modulation of neutrophil adherence. *J. Vasc. Res.* 41 : 432—444.
- Igney F. H., Behrens C. K., Krammer P. H. 2004. CD95L mediates tumor counterattack *in vitro* but induces neutrophil-independent tumor rejection *in vivo*. *Int. J. Cancer.* 113 : 78—87.
- Ishikawa F., Miyazaki S. 2005. New biodefense strategies by neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 53 : 226—233.
- Jablonska E., Puzewska W., Marcinczyk M., Grabowska Z., Jablonski J. 2005. iNOS expression and NO production by neutrophils in cancer patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 53 : 175—170—179.
- Kasimir-Bauer S., Ottinger H., Brittinger G., Konig W. 1994. Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: functional defects in circulating mature neutrophils of untreated and interferon-alpha-treated patients. *Exp. Hematol.* 22 : 426—431.
- Katano M., Tosiru M. 1982. Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. *Cancer.* 50 : 62—68.
- Klaunig J. E., Kamendulis L. M. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 : 239—267.
- Klyubin I. V., Kirpichnikova K. M., Gamaley I. A. 1996. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur. J. Cell Biol.* 70 : 347—351.
- Knight S. C., Hunt R., Dore C., Medawar P. B. 1985. Influence of dendritic cells on tumor growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82 : 4495—4497.
- Lichtenstein A., Kahle J. 1985. Anti-tumor effect of inflammatory neutrophils: characteristics of *in vivo* generation and *in vitro* tumor cell lysis. *Int. J. Cancer.* 35 : 121—127.
- Maranchie J. K., Zhan Y. 2005. Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 65 : 9190—9193.
- Mocellin S. 2005. Cancer vaccines: the challenge of developing an ideal tumor killing system. *Front Biosci.* 10 : 2285—2305.
- Motta M., Ferlito L., Malaguarnera L., Vinci E., Bosco S., Mautner D., Malaguarnera M. 2003. Alterations of the lymphocytic set-up elderly patients with cancer. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 36 : 7—14.
- Mueller M. M., Fusenig N. F. 2004. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Rev. Cancer.* 4 : 839—849.
- Mushiake H., Tsunoda T., Nukatsuka M., Shimao K., Fukushima M., Tahara H. 2005. Dendritic cells might be one of key factors for eliciting antitumor effect by chemoimmunotherapy *in vivo*. *Cancer Immunol. Immunother.* 54 : 120—128.
- Nakao S., Kuwano T., Tsutsumi-Miyahara C., Ueda S. I., Kimura Y. N., Hamano S., Sonoda K. H., Saijo U. Y., Nukiwa T., Strieter R. M., Ishibashi T., Kuwano M., Ono M. 2005. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J. Clin. Invest.* 115 : 2979—2991.
- Nielsen B. S., Timshe S. L., Kjeldsen L., Sehested M. L., Pyke C., Borregaard N., Danø K. 1996. 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int. J. Cancer.* 65 : 57—62.
- O'Beirne J. P., Harrison P. M. 2004. The role of the immune system in the control of hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 16 : 1257—1260.
- Ohira T., Zhan Q., Ge Q., VanDyke T., Badwey J. A. 2003. Protein phosphorylation in neutrophils monitored with phosphospecific antibodies. *J. Immunol. Methods.* 281 : 79—94.
- Otonello L., Morone P., Amelotti M., Dapino P., Dallegrì F. 1999. FMLP- and TNF-stimulated monoclonal Lym-1 antibody-dependent lysis of B lymphoblastoid tumour targets by neutrophils. *J. Cancer.* 80 : 331—337.
- Pericle F., Kirken R. A., Epling-Burnette P. K., Blanchard D. K., Djeu J. Y. 1996. Direct killing of interleukin-2-transfected tumor cells by human neutrophils. *Int. J. Cancer.* 66 : 367—373.
- Reiland J., Furcht L. T., McCarthy J. B. 1999. CXC-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor. *Prostate.* 41 : 78—88.
- Rosen D., Li J.-H., Keidar S., Markon I., Orda R., Berke G. 2000. Tumor immunity in perforin-deficient mice: a role for CD95 (Fas/APO-1). *J. Immunol.* 164 : 3229—3235.
- Rosen G. M., Finkelstein E., Rauckman E. J. 1982. A method for the detection of superoxide in biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 215 : 367—378.
- Sapone A., Affatato A., Canistro D., Broccoli M., Trespidi S., Pozzetti L., Biagi G. L., Cantelli-Forti G., Paolini M. 2003. Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. *Mutat. Res.* 527 : 67—80.
- Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 11 : 173—186.
- Schmielau J., Finn O. J. 2001. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 61 : 4756—4760.
- Sebolt-Leopold J. S., Herrera R. 2004. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade of treat cancer. *Nature Rev. Cancer.* 4 : 937—947.
- Sfondrini L., Balsari A., Menard S. 2003. Innate immunity in breast carcinoma. *Endocrin. Relat. Cancer.* 10 : 301—308.
- Shiku H. 2003. Importance of CD4+ helper T-cells in antitumor immunity. *Int. J. Hematol.* 77 : 435—438.
- Spletstoesser W. D., Schuff-Werner P. 2002. Oxidative stress in phagocytes — «the enemy within». *Micr. Res. Tech.* 57 : 441—455.
- Stoppacciaro A., Melani C., Parenza M., Mastracchio A., Bassi C., Baroni C., Parmiani G., Colombo M. P. 1993. Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon gamma. *J. Exp. Med.* 178 : 151—161.
- Sun Z., Yang P. 2004. Role in imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol.* 5 : 182—190.
- Szanto I., Rubbia-Brandt L., Kiss P., Steger K., Banfi B., Kovari E., Herrmann F., Hadengue A., Krause K. H. 2005. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* 207 : 164—176.
- Szuster-Ciesielska A., Hryciuk-Umer E., Stepulak A., Kupisz K., Kandefer-Szerszen M. 2004. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta oncol.* 43 : 252—258.
- Ueta E., Osaki T., Yoneda K., Yamamoto T., Umazume M. 1994. Influence of inductive chemoradiotherapy on salivary polymorphonuclear leukocyte (SPMN) functions in oral cancer. *J. Oral. Pathol. Med.* 23 : 418—422.
- Valdez J., Alderete N., Meson O., Sirena A., Perdigon G. 1990. Comparative activation states of tumor-associated and peritoneal macrophages from mice bearing an induced fibrosarcoma. *Immunology.* 181 : 276—287.
- Visser K. E., de, Eichten A., Coussens L. M. 2006. Paradoxical role of the immune system during cancer development. *Nature Rev. Cancer.* 6 : 24—37.
- Walsh S. R., Cook E. J., Goulder F., Justin T. A., Keeling N. J. 2005. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 91 : 181—184.
- Wang Y. L., Kaplan S., Whiteside T., Herberman R. B. 1989. *In vitro* effects of an acyltripeptide, FK565, on antitumor effector activities and on metabolic activities of human monocytes and granulocytes. *Immunopharmacology.* 18 : 213—222.
- Watari K., Tojo A., Nagamura-Inoue T., Matsuoka M., Irie S., Tani K., Yamada Y., Asano S. 2000. Hyperfunction of neutrophils

in a patient with BCR/ABL negative chronic myeloid leukemia: a case report with *in vitro* studies. *Cancer*. 89 : 551—560.

Wu Q. D., Wang J. H., Condron C., Bouchier-Hayes D., Redmond H. P. 2001. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280 : C814—C822.

Wymann M. P., Marone R. 2005. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 : 1—9.

Zhang H., Garlich C. D., Mugge A., Daniel W. G. 1998. Involvement of tyrosine kinases, Ca²⁺ and PKC in activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Physiol.* 513 : 359—367.

Zivkovic M., Poljak-Blazi M., Egger G., Sunjic S. B., Schaur R. J., Zarkovic N. 2005. Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. *Biofactors*. 24 : 305—312.

Поступила 22 III 2006

DYNAMIC ANALYSIS OF MODIFICATION OF PERIPHERAL NEUTROPHILS
FUNCTIONAL ACTIVITY AND ITS REGULATION DURING TUMOR GROWTH *IN VIVO*

V. N. Maltseva, N. V. Avkhacheva, B. F. Santalov, V. G. Safronova¹

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region;

¹ e-mail: safronova@icb.psn.ru

Polymorphonuclear granulocytes (neutrophils) release the reactive oxygen species (ROS) for destruction of pathogens, providing quicker of an organism from infections and own defective of transformed cells. Reactive oxygen species are also potential carcinogens because they facilitate mutagenesis, tumor promotion and progression. Balance between these opposite influences is supported by coordinated interrelations in intracellular signaling systems. Tumor growth influence on the NADPH oxidase in peripheral innate immune cells is unclear. A solid cancer model was developed after an intramuscular injection of Ehrlich carcinoma cells into hind leg of NMRI strain mice. Intensity of the respiratory burst was estimated by luminol-dependent chemiluminescence technique. Transformation of inflammatory reaction was revealed during tumor growth: greater amounts of neutrophils were recruited into peritoneal cavity; sizes of the cells, their nuclei and granules were enlarged; the ratio of different cell types in peritoneal exudation was changed. The study revealed that tumor progression was accompanied by significant changes in functional activity of neutrophils. Dynamic increase in spontaneous level of ROS production and concentration-dependent change of intensity of the respiratory burst induced with chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) was revealed in peripheral neutrophils under tumor growth conditions. It was found that effects of inhibitors of tyrosine protein kinases, protein kinase C, mitogen-activated protein kinase p38MAPK (p38MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) were altered in neutrophils from tumor-bearing mice in comparison with the cells of control mice. This indicates a change in the role of the enzymes in regulation of the neutrophil respiratory burst. Data obtained show that p38MAPK and PI3K entangle up- and down-regulation of NADPH oxidase in peripheral neutrophils during tumor growth.

Key words: neutrophils, respiratory burst, tumor growth.