

**ВЛИЯНИЕ ДОНОРА НО, СУБСТРАТА И ИНГИБИТОРА НО-СИНТАЗЫ
НА АФК-ГЕНЕРИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ
В ПРОЦЕССЕ РОСТА АСЦИТНОЙ ОПУХОЛИ**

© A. A. Наумов, M. M. Потцелуева¹

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пущино, Московская обл., и Пущинский государственный университет;*

¹ электронный адрес: mpotselueva@rambler.ru

In vitro изучено влияние донора оксида азота (NO), субстрата (L-аргинина) и ингибитора (нитроаргинина) NO-синтазы на генерацию активных форм кислорода (АФК) полиморфноядерными лейкоцитами плазмы крови и макрофагами асцитной жидкости в процессе роста опухоли в организме животного. Показано, что донор NO (нитропрусид натрия, SNP) в концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ М в начальный период роста опухоли снижает потенциальную АФК-генерирующую активность макрофагов на 38.5, а полиморфноядерных лейкоцитов плазмы — на 27.6 %. Однако в ходе роста опухоли динамика этого процесса консервативна и отклонения в продукции АФК фагоцитами составляли 10 %. АФК-генерирующая активность гранулоцитов и мононуклеаров под действием аргинина монотонно снижалась на 25—30 %. Этот факт может свидетельствовать об индуцильном ингибирующем влиянии NO-синтазы на работу НАДФН-оксидазы в процессе опухолевого роста. Ингибитор NO-синтазы нитроаргинин вызывает монотонное увеличение АФК-генерирующей активности фагоцитов, выделенных в разные периоды роста опухоли. Использование ингибитора NO-синтазы для увеличения уровня АФК в зоне роста опухоли может создать благоприятные условия для подавления роста опухолевых клеток *in vivo*.

Ключевые слова: полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, НАДФН-оксидаза, NO-синтаза, активные формы кислорода, окислительный стресс, активные формы азота.

Принятые сокращения: АФА — активные формы азота, АФК — активные формы кислорода, ПМЯЛ — полиморфноядерные лейкоциты, ХЛ — хемилюминесценция, NO — оксид азота, РМА — форбол-1,2-миристат-1,3-ацетат), SNP — нитропрусид натрия.

Известно, что макрофаги и их предшественники, представляющие собой систему мононуклеарных фагоцитов, а также полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ), к которым относятся в основном нейтрофилы и моноциты, способны выполнять различные защитные функции в организме. Они являются первой линией защиты от бактериальной и вирусной инфекций, удаляют из организма поврежденные, стареющие и мутированные клетки. В настоящее время нет сомнения в том, что развитие опухоли также вызывает ответные процессы в иммунной системе, направленные на распознавание и элиминацию этих клеток. Причем в первоочередную реакцию на опухолевые клетки помимо натуральных киллерных клеток вовлекаются главным образом фагоцитирующие клетки, такие как макрофаги, моноциты и нейтрофилы, обладающие цитотоксической активностью (Ackermann et al., 1989; Kok et al., 1990; Pustovidko et al., 2000). В результате действия иммунных комплексов, низкомолекулярных активаторов рецепторов плазматической мембранны, микробиологических или микрочастиц происходит сборка и активация НАДФН-оксидазы фагоцитов. В результате функционирования этой трансмембранный электронно-транспортной цепи происходит одноэлектронное восстановление кислорода с образованием супероксидного ани-

он-радикала, из которого в результате молекулярных превращений образуется ряд активных форм кислорода (АФК) — перекись водорода, гидроксильный радикал и др.

Помимо НАДФН-оксидазы фагоцитирующие клетки содержат индуцильную NO-синтазу, которая катализирует образование оксида азота (NO) и его метаболитов — активных форм азота (АФА). NO может осуществлять как прямое, так и непрямое действие на биомолекулы. Прямое действие NO осуществляется при его непосредственном взаимодействии с биомолекулами. Мишеню служит гемовое железо гемоглобина, миоглобина, растворимой гуанилаткиназы, цитохрома Р-450 и других гемсодержащих белков. NO взаимодействует также с негемовым железом, входящим в состав железосерных белков, и со свободным железом. Прямые эффекты NO доминируют при физиологических состояниях, когда NO выполняет сигнальные и регуляторные функции.

Непрямое действие NO опосредуется через его активные формы, которые являются продуктами реакции NO с O_2 , O_2^- или с перекисью водорода. Непрямое действие NO реализуется через N-, S- и O-нитрозилирование, при котором катион нитрозования (NO^+) присоединяется к аминам, тиолам или гидроксильным группам ароматических

соединений. Так, при взаимодействии NO с супероксидным анионом образуется высокотоксичный радикал пероксинитрита, который осуществляет нитрование ароматического кольца биомолекул, в частности тирозина.

Необходимо отметить, что АФК и АФА участвуют в различных биологических процессах. Можно упомянуть роль АФК и АФА в индукции апоптоза (Скулачев, 1999; Borutaite et al., 2001; Hildeman et al., 2004), регуляции пролиферации клеток (Boonstra et al., 2004) и тонуса сосудов (Rubanyi, 1988; Gregg et al., 2004). Особую роль данные метаболиты играют в реализации реакций неспецифического иммунитета в ответ на развитие различных новообразований (van Kessel, Verhoeef, 1990). На модели развития асцитной опухоли нами было показано (Поцелуева и др., 2005), что в плазме крови опухоленосителя развивается мощнейший окислительный стресс, характеризующийся высоким уровнем АФК. Это оказывает токсическое действие на здоровые клетки организма и приводит к ряду осложнений, способствующих гибели опухоленосителя. Остается открытым вопрос о влиянии активности NO-синтазы на функциональную активность НАДФН-оксидазы фагоцитов в ходе роста опухоли.

В настоящей работе основное внимание уделено регуляторному влиянию АФА на АФК-генерирующую активность фагоцитирующих клеток. В частности, работа посвящена изучению влияния донора NO, субстрата и ингибитора NO-синтазы на АФК-генерирующую активность макрофагов и нейтрофилов, выделенных из зоны роста опухоли и из плазмы крови в различные периоды патологического процесса. Следует отметить, что в условиях проводимых исследований вклад радикала пероксинитрита в интенсивность люминолзависимой хемилиюминесценции (ХЛ) фагоцитов не был обнаружен. Хотя в экспериментах на альвеолярных нейтрофилах человека, которые имеют максимальную продукцию NO, было показано, что вклад его метаболитов в ХЛ-ответ фагоцитов в случае их высокой праймированности и времени эксперимента не менее 1 ч может составить 10—12 % (Kudoh et al., 1999; Wada et al., 2010).

Материал и методика

Реактивы: глюкоза и люминол (Dia-M, Россия); ФМА (форбол-1,2-миристат-1,3-ацетат), HEPES, зимозан, нитропрусид натрия (SNP); люминол (Sigma, США); гепарин (Спофа, Прага); NaCl и CaCl₂ (Реахим, Россия); PER-COL (плотность 1.129 г/мл; Pharmacia, Швеция); верографин (Агат-Мед, Россия); L-аргинин (Reanal, Венгрия); N-нитро-L-аргинин (Fluka, Швейцария); среда RPMI (ПанЭко, Россия).

В экспериментах использовали крыс - самцов линии Вистар массой 200—220 г. Крысы содержали в условиях вивария на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище, при 16—20 °C в режиме естественной освещенности.

Для формирования опухоли использовали клетки асцитной гепатомы Зайделя, отбираемой у крыс опухоленосителей на 5-е сут развития опухоли. Трансплантацию клеток асцитной гепатомы Зайделя проводили в брюшную полость животного в объеме 0.8 мл ($1 \cdot 10^7$ кл./мл). Среднее время жизни особей с трансплантированной опухолью составляет 12—14 сут.

Выделение макрофагов. Использовали асцитную жидкость из брюшной полости декапитированного

животного, которую переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Полученный осадок клеток дважды промывали раствором Рингера. Затем клетки насыщали на градиент Percoll—NaCl с плотностями 60, 50, 40 и 30 % и центрифугировали в течение 45 мин при 1600 g. Макрофаги в виде тонкого кольца распределялись на границе плотностей 40—50 %, что соответствовало плотности 1.077 г/мл. Клетки отбирали шприцем, трижды отмывали солевым раствором. Осадок клеток ресусPENDИРОвали в среде RPMI и хранили при 4 °C до начала эксперимента. Содержание макрофагов во фракции составляло 90—95 %. Выделение макрофагов производили ежесуточно на протяжении всего жизненного цикла опухоленосителей.

Выделение ПМЯЛ. Использовали кровь, полученную при декапитации животных, собирали ее в пробирку, содержащую 2 мл раствора гепарина (2 мг/мл). Фракцию лейкоцитов получали путем осаждения клеток методом дифференциального центрифугирования в течение 10 мин при 400 g после лизиса эритроцитов. Лизис вызывали добавлением раствора хлористого аммония (0.87 %). После центрифугирования осадок, содержащий лейкоциты, промывали солевым раствором и повторно центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. Затем суспензию клеток наносили на градиент плотности Percoll—NaCl и на границе плотности 1.12 отбирали фракцию гранулоцитов. После отмывания солевым раствором фракцию лейкоцитов ресусPENDИРОвали в среде RPMI и хранили при 4 °C до начала эксперимента. Выделение ПМЯЛ производили ежесуточно на протяжении всего жизненного цикла опухоленосителей.

Схема эксперимента. Были использованы 72 животных с трансплантированной опухолью. Животных разбивали на 2 группы. Первая — контрольные животные, у которых исследовали интенсивность АФК-генерирующей активности фагоцитов в ходе роста опухоли. Вторая — экспериментальные животные. Из каждой группы ежесуточно брали в эксперимент по 3 животных, из которых выделяли фагоциты, причем как из плазмы, так и из асцитной жидкости. ПМЯЛ и макрофаги второй группы использовали в модельной клеточной системе, в которой с помощью донора NO (SNP), ингибитора (нитроаргинина) и субстрата (L-аргинина) NO-синтазы модулировали ее активность. При этом оценивали изменения АФК-генерирующей активности фагоцитов (по сравнению с контрольной группой), выделенных в различные периоды опухолевого роста.

Продукцию АФК оценивали по уровню ХЛ фагоцитирующих клеток, активированных PMA в присутствии люминола в качестве люминесцентного зонда. Уровень ХЛ-ответа регистрировали с помощью люминометра Биотокс-7а. Солевая среда для измерения ХЛ содержала: NaCl — 154 mM, HEPES — 5 mM, глюкозу — 5 mM, CaCl₂ — 1 mM, pH 7.4. В терmostатированную ячейку хемилиюминометра (при 37 °C) помещали 500 мкл солевой среды (pH 7.4), содержащей люминол (0.1 mM), исследуемое вещество и суспензию клеток (10^6 кл./мл). Клетки инкубировали в течение 10 мин, затем добавляли стимулирующий агент — PMA ($2.8 \cdot 10^{-4}$ mM). ХЛ-ответ клеток регистрировали в течение 10 мин. Следует отметить, что мы не обнаружили вклада радикала пероксинитрита, определяемого с помощью тестового набора для идентификации нитротирозина (nitrotirosine ELISA kit — Hycult biotech), в интенсивность люминолзависимой ХЛ фагоцитов. Однако в экспериментах на альвеолярных нейтрофи-

лах человека было показано, что в ХЛ-ответе фагоцитов в случае их праймированности при увеличении концентрации люминола до 2 мМ и времени эксперимента до 1 ч обнаруживается вклад метаболитов NO, который максимально может составить 10—12 % (Kudoh et al., 1999; Wada et al., 2010).

Результаты и обсуждение

АФК-генерирующая активность ПМЯЛ и перitoneальных макрофагов при развитии асцитной опухоли. Исследовали ПМЯЛ плазмы крови и макрофагов из зоны патологии методом люминолзависимой ХЛ при развитии асцитной гепатомы Зайделя. На рис. 1 показаны значения светосуммы ХЛ-ответа ПМЯЛ (кривая 1) и макрофагов (кривая 2), характеризующих потенциальную АФК-генерирующую активность фагоцитов, выделенных на разных этапах развития опухоли. Показано постепенное снижение АФК-генерирующей активности мононуклеаров в зоне развития опухоли. В литературе нет однозначного ответа относительно клеточного состава и функциональной активности фагоцитов в зоне роста опухоли. Так, при развитии солидных опухолей описано усиление миграции макрофагов (Knowles, Harris, 2007), лимфоцитов (Yamaki et al., 1990) и тучных клеток (Ch'ng et al., 2006) в зону патологии. Действительно, процесс увеличения данных популяций клеток наблюдается и при развитии асцитных опухолей. Однако начиная со второй фазы роста опухоли их численность монотонно снижается (Шаталин и др., 2010). Напротив, потенциальная активность ПМЯЛ плазмы крови в ходе роста опухоли увеличивалась в 2.5—3 раза. Увеличение общей АФК-генерирующей активности ПМЯЛ, как показали наши исследования (Пощелуева и др., 1999), обусловлено как увеличением числа лейкоцитов в циркулирующей крови, так и увеличением их удельной активности. Причины, приводящие к активации ПМЯЛ, могут быть обусловлены ростом концентраций гематопоэтических факторов роста G-CSF или GM-CSF в организме опухоленосителя. Установлено, что их концентрация коррелирует с численностью ПМЯЛ (Chen et al., 2009) и оказывает праймирующее влияние на активность лейкоцитов (Meu-

er, Nielson, 1996). Таким образом, в двух пространственно разнесенных компартментах опухоленосителя (кровь, асцит) создаются противоположные условия: в плазме крови развивается окислительный стресс, а в зоне роста опухоли создаются условия восстановления, по-видимому, из-за снижения числа фагоцитов, гипоксии, ацидоза и понижения уровня АФК до значений, эквимолярных 3—5 нм H₂O₂ (Шаталин и др., 2010).

Интенсивность ХЛ-ответа фагоцитирующими клетками здорового животного при действии SNP. В связи со сложностями непосредственного введения NO в образцы используют различные вещества, способные выделять NO непосредственно в суспензии клеток. Мы использовали SNP, который в биологическом объекте разлагается с выделением NO. Исследовали влияние SNP в различных концентрациях на активированную ХЛ выделенных перitoneальных макрофагов и ПМЯЛ здоровых животных. Для этого в среду регистрации, содержащую клетки, добавляли различные дозы SNP. Клетки инкубировали в течение 10 мин в при 37 °C, после чего их активировали РМА. На рис. 2 показано влияние SNP на уровень ХЛ-ответа фагоцитов. Видно, что увеличение концентрации SNP угнетало продукцию АФК как перitoneальными макрофагами (рис. 2, а), так и ПМЯЛ (рис. 2, б). Из полученных результатов можно заключить, что при повышении концентрации экзогенного NO наблюдается замедление работы важного ферментного комплекса НАДФН-оксидазы. При этом ингибирование работы НАДФН-оксидазы, выраженное в снижении интенсивности ХЛ-ответа, у гранулоцитов было менее выраженным, чем у макрофагов (см. таблицу). Так, при концентрации SNP 8 · 10⁻⁵ моль/л светосумма ПМЯЛ снижается на 27.6 ± 0.7 %, а светосумма макрофагов — на 38.5 ± 9 %. Даные различия, возможно, связаны с меньшим количеством активной НАДФН-оксидазы в перitoneальных макрофагах, чем в ПМЯЛ, что и приводит к большему эффекту при тех же значениях действующего агента.

Интенсивность ХЛ-ответа макрофагов в асцитной жидкости и ПМЯЛ крови при действии SNP. Известно, что *in vivo* при развитии опухоли под действием патогенных генов, цитокинов и гипоксии (Wizemann et al., 1994) происходит активация индуциальной NO-синтазы (iNOS), в результате функционирования которой образуется NO. Наличие неспаренного электрона в молекуле NO делает ее очень реакционноспособной. NO легко окисляется и восстанавливается, образуя различные биологически активные соединения. Так, NO вступает в реакции S-нитрозилирования с глутатионом, а также с SH-содержащими белками с образованием S-нитрозотиолов (Stamler et al., 1997). Огромное значение имеет S-нитрозилирование в регулировании активности некоторых ферментов, в частности НАДФН-оксидазы. Для оценки регуляторного влияния экзогенных АФА на продукцию АФК фагоцитами была смоделирована ситуация *in vitro*, в которой в присутствии постоянного донора NO (4 · 10⁻⁵ М SNP) исследовали изменение АФК-генерирующей активности макрофагов, выделенных из асцитной жидкости и ПМЯЛ плазмы крови в различные периоды роста опухоли (рис. 3). Установлено, что NO снижает продукцию АФК лейкоцитами на 27.6 ± 5.0 % (рис. 3, кривая 1) и мононуклеарами на 38.5 % (рис. 3, кривая 2). При этом динамика АФК-генерирующей активности в присутствии SNP консервативна — в ходе роста опухоли незначительно снижается АФК-генерирующая активность (на 10 ± 3 %) фагоцитов от начального падения

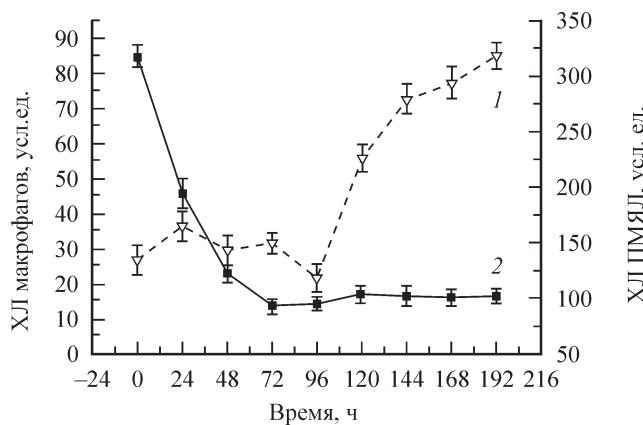


Рис. 1. Динамика АФК-генерирующей активности полиморфноядерных лейкоцитов плазмы крови (кривая 1) и макрофагов асцитной жидкости (кривая 2) в ходе роста асцитной гепатомы Зайделя.

По вертикали — суммарная интенсивность хемилюминесцентного (ХЛ) ответа.

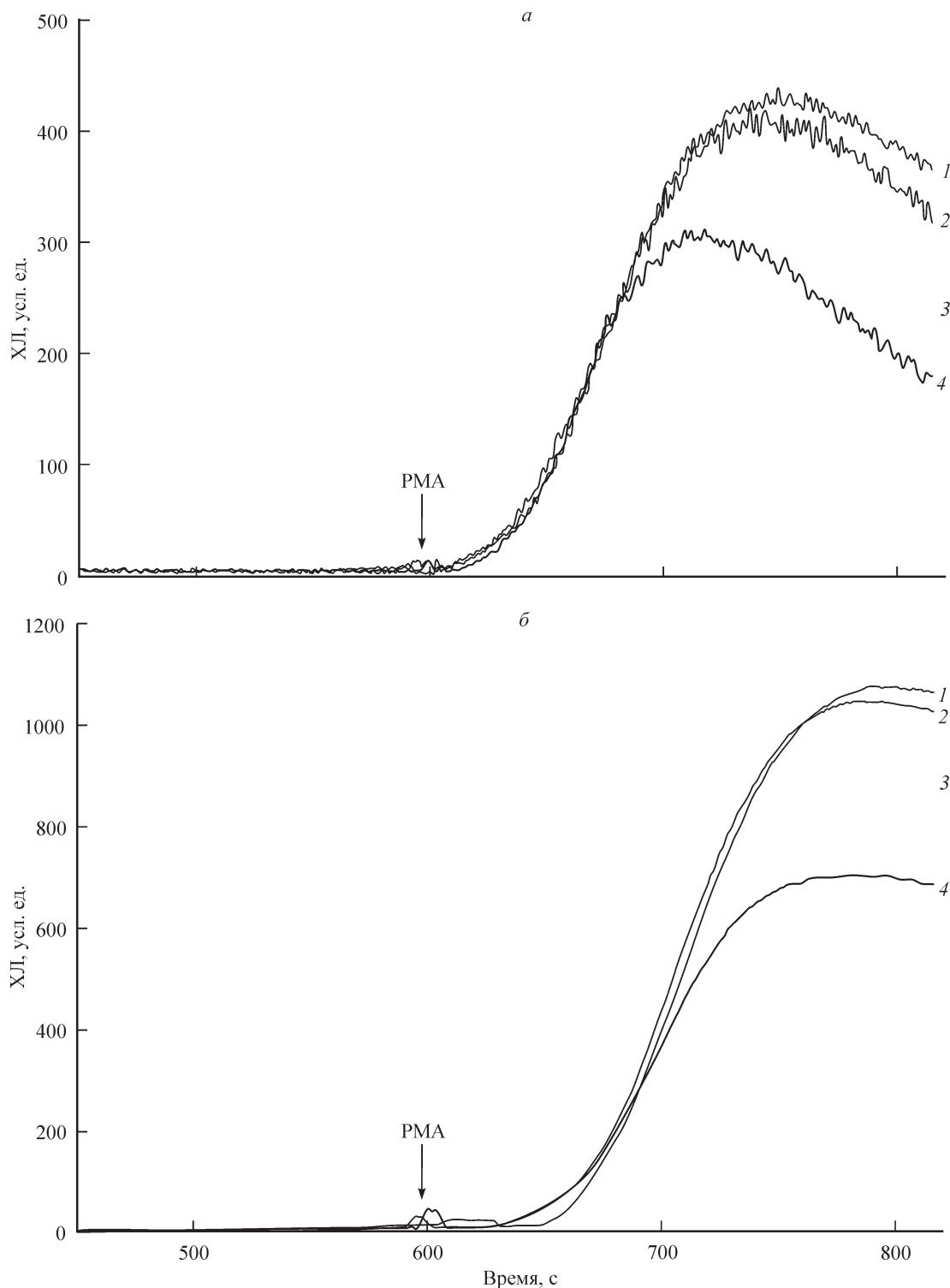


Рис. 2. Влияние донора NO в различных концентрациях на интенсивность хемилюминесцентного (ХЛ) ответа фагоцитирующих клеток здорового животного.

a, б — типичные кривые ХЛ-ответа соответственно макрофагов и ПМЯЛ, активированных PMA, при воздействии нитропрусида натрия (SNP) в различных концентрациях (кривые 2—4): $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3) и $8 \cdot 10^{-5}$ М (4). Кривая 1 — в отсутствие SNP (контрольный уровень ХЛ-ответа).

уровня АФК. Таким образом, АФК-генерирующая активность фагоцитов в присутствии SNP падает, но чувствительность фагоцитов к донору NO в процессе роста опухоли претерпевает незначительные изменения, которые, возможно, связаны с малым изменением количества фермента НАДФН-оксидазы в ходе роста опухоли.

Интенсивность ХЛ-ответа макрофагов в асцитной жидкости и ПМЯЛ крови при действии субстрата NO-синтазы. АФК и АФА имеют множество мишней воздействия. В зависимости от концентрации они могут оказывать разное действие на организм — от цитотоксического до регуляции актив-

Величина снижения светосуммы (%) хемилюминесцентного ответа макрофагов и ПМЯЛ при действии нитропрусида натрия (SNP) в различных концентрациях

SNP, моль/л	Макрофаги	ПМЯЛ
$2 \cdot 10^{-5}$	7.0 ± 2.0	1.3 ± 2.0
$4 \cdot 10^{-5}$	33.3 ± 8.0	13.7 ± 4.0
$8 \cdot 10^{-5}$	38.5 ± 9.0	27.6 ± 7.0

ности отдельных сигнальных систем. Для выяснения влияния метаболитов NO-синтазы на АФК-генерирующую активность НАДФН-оксидазы в ходе роста опухоли изучали АФК-генерирующую активность фагоцитов, выделенных в различные периоды опухолевого процесса в присутствии аргинина — субстрата NO-синтазы, продуцирующей NO. На рис. 4, *a* представлена динамика активности ПМЯЛ, выделенных из плазмы крови (*кривая 1*), и макрофагов из зоны роста опухоли (рис. 4, *a*, *кривая 2*) в присутствии субстрата NO-синтазы — аргинина в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М. Видно, что потенциальная активность ПМЯЛ (рис. 4, *a*, *кривая 1*) практически не изменяется в течение 1-х сут. Это происходит, по-видимому, из-за того, что NO-синтаза является индуциальным ферментом и для ее сборки необходим определенный интервал времени. Затем наблюдается снижение потенциальной активности нейтрофилов на 25—30 %, а через 5 сут чувствительность к аргинину падает, что приводит к возрастанию интенсивности ХЛ-ответа. Однако уровень ХЛ не достигает контрольного значения. При влиянии аргинина на АФК-генерирующую активность макрофагов (рис. 4, *a*, *кривая 2*) обнаружено, что субстрат для синтеза NO также ингибирует АФК-генерирующую активность мононуклеаров опухоленосителя. Данный факт свидетельствует, по-видимому, об индуциальном ингибирующем влиянии метаболитов NO-синтазы на активность НАДФН-оксидазы при развитии опухолевого процесса в организме. Таким образом, при усилении продукции NO-синтазой в присутствии аргинина уменьшается продукция АФК, по-видимому в результате снижения активности НАДФН-оксидазы.

Интенсивность ХЛ-ответа макрофагов в асцитной жидкости и ПМЯЛ крови при действии ингибитора NO-синтазы. У фагоцитирующих клеток (макрофагов и ПМЯЛ) в ответ на развитие опухоли (Поцелуева и др., 2005), инфекции (Satriano, 2004) или какого-либо стимула происходит активация НАДФН-оксидазы, что приводит к развитию окислительного стресса в плазме крови, суть которого сводится к быстрому образованию и выбросу в окружающую среду повышенного количества АФК. При исследовании уровня АФК нами было показано, что к середине второй фазы роста опухоли уровень АФК в плазме повышается более чем в 2.5 раза (Шаталин и др., 2010). Этот результат согласуется с увеличением удельной АФК-генерирующей активности ПМЯЛ в 4—5 раз (Поцелуева и др., 1999) и увеличением концентрации лейкоцитов в 6—7 раз. В зоне развития опухоли складывается иная картина: в начале роста опухоли возрастает уровень АФК, а далее экспоненциально снижается до значений, эквимолярных соответственно 400 и 3—5 нМ H_2O_2 (Поцелуева и др., 1999). Динамика падения уровня АФК совпадает со снижением АФК-генерирующей активности макрофагов и с ростом

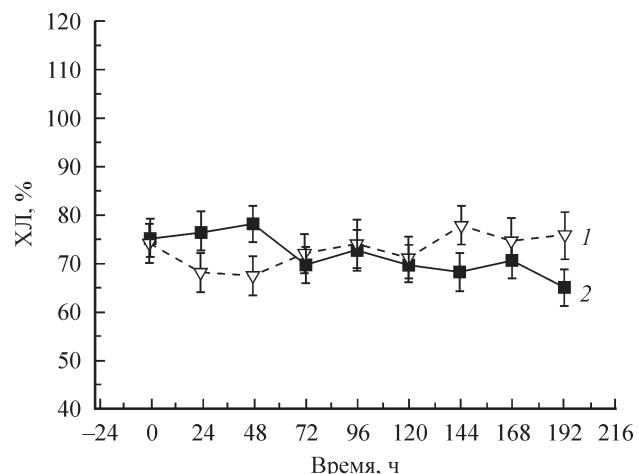


Рис. 3. Изменение интенсивности ХЛ-ответа ПМЯЛ крови (*кривая 1*) и перитонеальных макрофагов (*кривая 2*) в различные периоды роста опухоли при воздействии донора оксида азота ($4 \cdot 10^{-5}$ М SNP).

гипоксии в зоне опухоли. Таким образом, в зоне опухоли наблюдается уменьшение концентрации макрофагов, кислорода и уровня АФК. Однако для подавления роста опухолевых клеток необходимы противоположные условия, характеризующиеся высоким уровнем АФК. При введе-

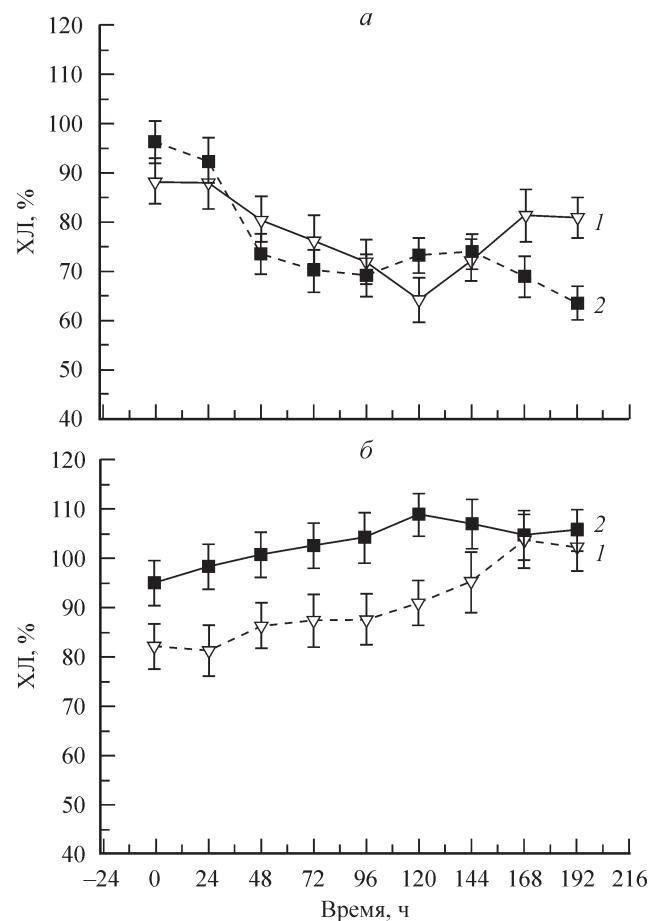


Рис. 4. Изменение ХЛ-ответа ПМЯЛ (*кривая 1*) и макрофагов (*кривая 2*) в различные периоды роста опухоли в присутствии субстрата (а) или ингибитора (б) NO-синтазы.

Субстрат: L-аргинин, $1 \cdot 10^{-3}$ М; ингибитор: нитроаргинин, $1 \cdot 10^{-4}$ М.

ния ингибитора NO-синтазы, которая индуцибельно ингибирует НАДФН-оксидазу, мы предполагали обнаружить повышение АФК-генерирующей активности фагоцитов или как минимум сохранение уровня активности на прежнем уровне, что могло бы служить отрицательным контролем. На рис. 4, б представлено изменение АФК-генерирующей активности лейкоцитов (*кривая 1*) и макрофагов (*кривая 2*), выделенных в различные периоды роста опухоли при воздействии нитроаргинина. Действительно, нитроаргинин в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М в условиях эксперимента вызывал монотонное увеличение АФК-генерирующей активности лейкоцитов (рис. 4, б, *кривая 1*) и макрофагов (рис. 4, б, *кривая 2*), что свидетельствует об усилении активности НАДФН-оксидазы в условиях ингибирования работы NO-синтазы. Увеличение уровня АФК в зоне опухоли в присутствии нитроаргинина может создать благоприятные условия для торможения роста опухолевых клеток *in vivo*.

Работа поддержана проектами Министерства образования и науки РФ согласно тематическому плану ЕЗН № 1.4.10 и программой РНП (проект 6663).

Список литературы

- Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Алабин В. С., Евтодиенко Ю. В. 1999. Генерация реактивных форм кислорода полиморфноядерными лейкоцитами в процессе развития гепатомы в брюшной полости животных. Цитология. 41 (2) : 162—166.
- Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Шаталин Ю. В., Евтодиенко Ю. В. 2005. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки *in vitro* и *in vivo*. Цитология. 47 (1) : 1032—1038.
- Скулачев В. П. 1999. Феноптоз: запрограммированная смерть организма. Биохимия. 64 (12) : 1418—1426.
- Шаталин Ю. В., Наумов А. А., Поцелуева М. М. 2010. Изменение состава клеточных популяций и уровня активных форм кислорода в крови и в асцитной жидкости опухоленосятеля. Цитология. 52 (2) : 131—134.
- Ackermann M. F., Lamm K. R., Wiengand G. W., Lister M. I. 1989. Antitumor activity of murine neutrophils demonstrated by cytometric analysis. Cancer Res. 49 : 528—532.
- Boonstra J. G., von't Veer M. B., Gratama J. W. 2004. The use of cd38 expression by monoclonal B lymphocytes as a prognostic factor in b-cell chronic lymphocytic leukemia. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 18 : 340—346.
- Borutaite V., Budriunaite A., Morkuniene R., Brown G. C. 2001. Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia. Biochim. biophys. acta. 1537 : 101—109.
- Chen Z., Shen S., Peng B., Tao J. 2009. Intratumoural GM-CSF microspheres and CTLA-4 blockade enhance the antitumor immunity induced by thermal ablation in a subcutaneous murine hepatoma model. Int. Hyperthermia. 25 (5) : 374—382.
- Ch'ng S., Wallis R. A., Yuan L., Davis P. F., Tan S. T. 2006. Mast cells and cutaneous malignancies. Mod. Pathol. Jan. 19(1) : 149—159.
- Gregg R. K., Jain R., Schoenleber S. J., Divekar R., Bell J. J., Lee H. H., Yu. P., Zaghouani H. 2004. A sudden decline in active membrane-bound TGF-beta impairs both T regulatory cell function and protection against autoimmune diabetes. J. Immunol. 173 : 7308—7316.
- Kessel K. P. M., van, Verhoef J. 1990. A view to a kill: cytotoxic mechanisms of human polymorphonuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells. Pathobiology. 58 : 249—264.
- Knowles H. J., Harris A. L. 2007. Macrophages and the hypoxic tumour microenvironment. Bioscience. 12 : 4298—4314.
- Kudoh S., Suzuki K., Yamada M., Liu Q., Nakaji S., Sugawara K. 1999. Contribution of nitric oxide synthase to human neutrophil chemiluminescence. Luminescence. 14 : 335—339.
- Meyer C. N., Nielsen H. 1996. Priming of neutrophil and monocyte activation in human immunodeficiency virus infection. Comparison of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma. APMIS. 104 (9) : 640—646.
- Pustovidko A., Potselueva M., Evtodienko Yu. 2000. Generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and its modulation by calcium ions during tumor growth. IUBMB Life. 50 : 69—73.
- Rubanyi G. M. 1988. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. Free Rad. Biol. Med. 4 : 107—120.
- Satriano J. 2004. Arginine pathways and the inflammatory interregulation of nitric oxide and polyamines. Amino Acids. 26 : 321—329.
- Stamler J. S., Jia L., Eu J. P., McMahon T. J., Demchenko I. T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C. A. 1997. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. Science. 276 : 2034—2037.
- Wada M., Kira M., Kido H., Ikeda R., Kuroda N., Nishidaki T., Nakashima K. 2010. Semi-micro flow injection analysis method for evaluation of quenching effect of health foods or food additive antioxidants on peroxy nitrite. Luminescence (www.Interscience.wiley.com) DOI 10.1002/1206.
- Wizemann T. M., Gardner C. R., Laskin J. D., Quinones S., Durham S. K., Golter N. L., Ohnishi S. T., Laskin D. L. 1994. Production of nitric oxide and peroxy nitrite in the lung during acute endotoxemia. J. Leukoc. Biol. 56 : 759—768.
- Yamaki T., Uede T., Kikuchi K. 1990. Cellular mechanisms of tumor rejection in rats. Nat. Immun. Cell Growth Regul. 9 : 1—25.

Поступила 28 VI 2010

EFFECTS OF A NITRIC OXIDE DONOR, THE SUBSTRATUM OF NO-SYNTHASE, AND AN INHIBITOR OF NO-SYNTHASE ON THE ROS-GENERATION ACTIVITY OF PHAGOCYTES IN THE COURSE OF ASCITES TUMOR GROWTH

A. A. Naumov, M. M. Potselueva

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,
Pushchino, Moscow Region, and Pushchino State University;
¹ e-mail: mpotselueva@rambler.ru

Experiments *in vitro* were performed to investigate the effects of the nitric oxide donor (SNP), the substratum of NO-synthase (L-arginine), and the inhibitor of NO-synthase (nitroarginine) on the ROS-generating activity of blood plasma polymorphonuclear leucocytes and ascitic fluid macrophages isolated at different times of

tumor (Zaidel hepatoma) growth in animal organism. It was found that in the initial period of tumor growth the nitric oxide donor at a concentration of $8 \cdot 10^{-5}$ M reduced the potential ROS-generating activity of macrophages by 38.5 ± 9.0 % and that of polymorphic-nuclear leucocytes of plasma by 27.6 ± 7.0 %. However, the dynamics of this process during tumor growth was conservative: variations in the production of ROS by phagocytes were 10 ± 3.0 %. L-arginine induced a decrease in the ROS-generating activity of granulocytes and mononucleares by 25—30 %. This fact points to an inducible inhibiting effect of NO-synthase on the ROS-generating activity of NADPH-oxidase in the course of tumor growth. The inhibitor of NO-synthase, nitroarginine, produced a monotonous increase in the ROS-generating activity of phagocytes isolated from the tumor at different periods of its growth. The use NO-synthase inhibitors for increasing ROS levels in the region of tumor growth may favor the suppression of tumor cell growth *in vivo*.

Key words: luminescence, ROS-generating activity, NO-synthase, polymorphonuclear leucocytes, tumor growth.