

ДИНАМИКА МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В ПЛАЗМЕ И АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАЗВИТИИ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ IN VIVO

© М. М. Поцелуева,^{1, 2} * А. А. Наумов,^{1, 2} Е. С. Куприянова^{1, 2}

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино, 142290,

и ² Пуцинский естественно-научный институт, Пуццино, 142290;

* электронный адрес: mpotselueva@rambler.ru

Исследовали изменение концентрации внеклеточных метаболитов оксида азота, таких как пероксинитрит, нитриты и нитраты (NO_x), а также нитрозотиолы (RSNO), в плазме и асцитической жидкости в процессе роста в брюшной полости животного трансплантированной асцитной гепатомой Зайделя. Обнаружено повышение концентрации пероксинитрита по уровню нитротирозина (до 10—11 нМ) в плазме крови на начальном этапе роста опухолевых клеток и снижение до 3—4 нМ на заключительных этапах жизни опухоленосителя. Динамика нитротирозина в зоне роста опухоли практически аналогична таковой в плазме, в связи с тем что белки в процессе роста опухоли поступают из плазмы в зону патологии, где формируется асцитическая жидкость. Динамика нитрозилирования серосодержащих белковых групп свидетельствует о 4-кратном росте в плазме крови концентрации S-нитрозотиолов в течение 6 сут, после чего постепенно снижается. По-видимому, эти закономерности вызваны нарушением баланса между активными формами кислорода и азота, что приводит к начальному доминированию процессов, связанных с оксидом азота (NO) и с усилением окислительных процессов на заключительных фазах опухолевого роста. В асцитической жидкости средняя концентрация RSNO снижена по сравнению с плазмой. Конечными стабильными продуктами распада NO являются NO_x . Установлено, что в начале роста опухоли концентрация этих метаболитов в плазме незначительно колеблется и резко возрастает на последней фазе опухолевого процесса. В зоне роста опухоли отмечена аналогичная тенденция динамики концентрации NO_x , только с более высоким фоновым уровнем, который может быть обусловлен как работой иммунокомпетентных клеток, в частности макрофагов, так и отсутствием гемоглобина, который может связывать нитриты, а также сниженной скоростью утилизации веществ из асцита. Результаты позволяют заключить, что в организме с растущей асцитной гепатомой Зайделя в брюшной полости развивается нитрозивный стресс.

Ключевые слова: асцитные опухоли, асцитическая жидкость, активные формы кислорода, оксид азота, нитрозотиолы, нитриты и нитраты, пероксинитрит.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ПМЯЛ — полиморфноядерные лейкоциты, NO_x — нитраты и нитриты, RSNO — S-нитрозотиолы.

Появление опухолевых клеток в организме вызывает в системе естественной резистентности или врожденного иммунитета ответные процессы, направленные на уничтожение опухолевых клеток (Van Kessel, Verhoef, 1990). В цитотоксическую активность помимо натуральных киллерных клеток вовлекаются фагоцитирующие клетки, к которым в основном относятся полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) и макрофаги. Известно, что арсенал защитных средств, используемых иммунитетом, включает в себя в основном активные формы кислорода (АФК) и различные протеолитические ферменты. Однако оксид азота (NO) и его метаболиты наряду с АФК также являются сильным цитотоксическим оружием и регуляторным фактором иммунной системы. При этом NO влияет на активность Т-лимфоцитов (Mills, 1991), регулирует синтез интерлейкинов, адгезию нейтрофилов и тромбоцитов к эндотелию, способствует увеличению проницаемости сосудов (Furlong, 1987; Sneddon, Vane, 1988; Lefler, Lefler, 1991), способен индуцировать апоптоз (Брюне, 1998).

До настоящего времени не до конца понятно влияние опухолевого роста на динамику внеклеточных метаболитов NO. Как правило, в качестве объекта в таких исследованиях используют асцитные опухоли, трансплантированные в брюшную полость животного. Так, показано, что в плазме носителя опухоли асцитной гепатомой Зайделя развивается окислительный стресс (Поцелуева и др., 1999, 2013), который сопровождается увеличением АФК-генерирующей активности фагоцитов, ростом их численности и падением антиоксидантной емкости. Однако при разных патологиях в тканях, клетках и внеклеточных компартментах (Gow, 2002) наряду с окислительным стрессом были обнаружены нефизиологические концентрации NO, что свидетельствует о развитии нитрозивного стресса (Foster et al., 2009). Свое цитотоксическое действие на опухолевые клетки и клетки, пораженные вирусом, NO осуществляет, взаимодействуя с другими радикалами. В этой связи целесообразно исследовать совместно динамику метаболитов NO, образующихся в процессе

роста опухоли, и динамику АФК, в образовании которых принимают участие клетки врожденного иммунитета. В свою очередь NO обладает огромным регуляторным потенциалом и способен оказывать влияние на генерацию АФК клетками иммунной системы. В то же время уровень различных метаболитов NO, таких как пероксинитрит (ONOO^-) и нитрозотиолы (RSNO), определяется уровнем АФК. В связи с этим исследование динамики АФК-генерирующей активности нейтрофилов и макрофагов асцитической жидкости является важным критерием для описания состояния исследуемой модели опухолевого роста.

В настоящее время изучение деталей регуляции внутри- и внеклеточных уровней метаболитов NO находится на стадии накопления данных (Hess et al., 2005). При взаимодействии NO с супероксидным анион-радикалом образуется реакционноактивный и высокотоксичный анион пероксинитрита ONOO^- . В связи с высокой реакционной способностью и малым временем жизни ONOO^- судят по его маркеру — нитротирозину. Повышение концентрации нитротирозина было показано при различных воспалительных процессах, включая ревматоидный артрит, образование атеросклеротических бляшек, хроническую почечную недостаточность и септический шок (Abramson, 2008; Yousefipour et al., 2010; Soriano et al., 2011; Yamagishi, Matsui, 2011). Однако мы не обнаружили в литературе исследований, посвященных динамике нитротирозина в асцитической жидкости при развитии модельной опухоли.

Некоторые исследователи (Маеда, Акаике, 1998; Albina, Reichner, 1998; Estévez et al., 1999) считают, что большинство цитотоксических эффектов NO опосредовано именно ONOO^- . В то же время активные метаболиты NO наряду с АФК способны повреждать различные клеточные структуры, изменяя их функциональную активность. Спектр активности ONOO^- включает нитрозилирование гуанина и разрывы цепочек ДНК, что может приводить к мутациям или запуску апоптоза (Маеда, Акаике, 1998; Estévez et al., 1999). Кроме того, могут происходить нитрозилирование белков по остаткам тирозина (Reiter et al., 2000) и образование нитрозотиолов (R-SNO), что может привести к серьезным функциональным последствиям, нарушающим определенные пути передачи сигнала в клетке. Следует отметить, что S-нитрозотиолы и сам NO при определенных условиях могут проявлять антиоксидантную активность (Hogg, 1993). Например, NO может связываться с ионами железа, которые катализируют реакции свободнорадикального окисления, разветвляя тем самым свободнорадикальную цепь. Конечными стабильными продуктами распада NO являются анионы нитритов (NO_2^-) и нитратов (NO_3^-). В совокупности они обозначаются как NO_x .

Таким образом, для понимания роли неспецифического иммунитета при росте в организме злокачественных опухолей актуальным является исследование активности АФК- и NO-генерирующих систем, а также их взаимовлияния в ходе роста опухоли. Активность этих систем определяет баланс антиоксидантных и прооксидантных реакций как в зоне патологии, так и в кровеносном русле.

Настоящая работа посвящена параллельному и одновременно исследованию изменений концентраций основных внеклеточных метаболитов NO в плазме и асцитической жидкости крысы с трансплантированной в ее брюшную полость асцитной гепатомой Зайделя. Измеряли концентрации NO_x , ONOO^- (по нитротирозину) и RSNO.

Материал и методика

Использовали следующие реагенты: глюкоза, люминол, N-1-нафтилэтилендиамин дигидрохлорид, H_3PO_4 и сульфаниламид (ДиаЭМ, Россия); CaCl_2 и гепарин (Спофа, Прага); NaCl (Реахим, Россия); краситель Романовского (Россия); Percoll (плотность 1.129 г/мл; Pharmacia, Швеция); среда RPMI (ПанЭко, Россия); стружки кадмия HgCl_2 и набор для иммуоферментного анализа нитротирозина НВТ (Нидерланды); L-глутамин (Sigma, США); HEPES (Serva, Германия).

Объектом исследования служила перевиваемая асцитная гепатома Зайделя (АГЗ). Асцитные опухоли особенно удобны в качестве модели для исследования взаимодействия клеток неспецифического иммунитета с развивающейся опухолью. Именно этот вид опухоли наряду с карциномой Эрлиха рекомендован Министерством здравоохранения РФ и фармакологическим государственным комитетом для изучения противоопухолевого действия фармакологических препаратов (Хабриев, 2005). В экспериментах использовали крыс-самцов породы Вистар массой 200—220 г. Крыс содержали в условиях вивария на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище при 16—20 °C в режиме естественной освещенности.

Для формирования экспериментальной опухоли использовали клетки асцитной гепатомы Зайделя, хранившиеся в криобанке. Клетки размораживали при 37 °C и трехкратно отмывали от криопротекторов в 0.15 М растворе NaCl. Далее 1 мл клеток с концентрацией 10^7 кл./мл трансплантировали в брюшную полость крысы. На 6-е сут после трансплантации образованная асцитическая жидкость отбирали, клетки осаждали при 400 g, трижды отмывали в 0.15 М растворе NaCl и трансплантировали в брюшную полость следующей крысы. Такие перевивки опухолевых клеток (пассажей) от одного животного к другому проводили 2—3 раза для разгона культуры и ее стандартизации. Для эксперимента клетки из контрольного опухоленосителя подготавливали так же, как при разгоне культуры: на 6-е сут после трансплантации из контрольного животного отбирали асцитическую жидкость, опухолевые клетки отмывали трижды в физиологическом растворе и трансплантировали в брюшную полость опытных крыс (0.8 мл, 10^7 кл./мл).

Выделение перитонеальных макрофагов. Здоровых животных декапитировали и помещали на препаратный столик. Брюшную зону обрабатывали этиловым спиртом и внутрибрюшинно вводили стерильный физиологический раствор из расчета 1 мл на 10 г массы животного. В течение 5—8 мин массировали брюшную полость. Далее делали надрез вдоль лапок, собирали экссудат пастеровскими пипетками и помещали в стерильные, охлажденные до 4 °C пробирки, которые центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Полученный осадок клеток дважды промывали физиологическим раствором. Выделенные клетки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ L-глутамин, 5 % эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицин, и хранили при 4 °C до начала эксперимента.

Выделение макрофагов из асцитической жидкости. Асцитическую жидкость для выделения макрофагов собирали из брюшной полости декапитированного животного, переносили в центрифужные стерильные пробирки и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Полученный осадок клеток дважды промывали

0.9%-ным раствором NaCl. Затем клетки наслаивали на градиент Percoll-NaCl с плотностями 1.04, 1.056, 1.078 и 1.116 и центрифугировали в течение 45 мин при 1600 g. Макрофаги распределялись на границе плотностей 1.056—1.078 в виде тонкого кольца. Клетки отбирали шприцем и трижды отмывали 0.9%-ным раствором NaCl. Осадок клеток ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 и хранили при 4 °C до начала эксперимента.

Выделение ПМЯЛ из циркулирующей крови. Кровь, полученную при декапитации животных, собирали в пробирку, содержащую 100 мкл раствора гепарина (5000 мке/мл). Фракцию лейкоцитов получали путем осаждения клеток методом дифференциального центрифугирования в течение 10 мин при 400 g после лизиса эритроцитов. Лизис эритроцитов вызывали добавлением раствора хлористого аммония (0.87 %). Затем клетки наслаивали на градиент плотности Percoll-NaCl, центрифугировали в течение 40 мин при 1600 g и затем в зоне плотности 1.112 отбирали фракцию ПМЯЛ. Осадок, содержащий лейкоциты, промывали солевым раствором и повторно центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. Фракцию лейкоцитов ресуспендировали в полной среде RPMI-1640, содержащей эмбриональную сыворотку, L-глутамин, антибиотик, и хранили при 4 °C до начала эксперимента. Выделенные клетки считали в камере Горяева. Для определения их жизнеспособности использовали 0.1%-ный спиртовой раствор трипанового синего в соотношении 1 : 20. Доля живых клеток составляла 90—95 %, примесь эритроцитов — не более 5 %.

Приготовление плазмы крови. В качестве антикоагулянта при выделении плазмы использовали гепарин из расчета 100 мкл раствора гепарина (5000 мке/мл) на 5—7 мл крови. Гепаринизированную кровь центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. После центрифугирования плазму осторожно собирали пипеткой или шприцем и переносили в стерильные пластиковые пробирки. До проведения измерений образцы плазмы хранили при -27 °C.

Приготовление бесклеточной асцитной жидкости. Отобранную жидкость центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. После центрифугирования жидкость осторожно переносили в пластиковые пробирки. До проведения измерений образцы асцитной жидкости хранили при -27 °C.

Концентрацию NO измеряли по концентрации нитритов, являющихся конечным продуктом метаболизма короткоживущего NO (Green et al., 1982; Ding, 1988). Так как в физиологических условиях часть нитритов окисляется до нитратов, перед измерением необходимо было перевести образовавшийся нитрат в нитрит. Для этого предварительно замороженные образцы размораживали, содержащиеся в асцитной жидкости белки осаждали раствором сульфата цинка и депротонировали 1 M раствором гидроксида натрия. Затем образовавшийся осадок, содержащий белки и гидроксид цинка, удаляли центрифугированием. К супернатанту добавляли небольшое количество стружек кадмия и помещали на мешалку на 3 ч для проведения реакции восстановления нитратов, затем кадмий удаляли центрифугированием. Количество нитритов в супернатантах измеряли с помощью реактива Грисса, содержащего смесь 0.1%-ного раствора дигидрохлорида N-1-нафтилэтилендиамина в 2.5%-ной фосфорной кислоте (H₃PO₄) и 1%-ного раствора сульфаниламида в 2.5 %-ной H₃PO₄, в соотношении 1 : 1.

К 150 мкл супернатанта, перенесенного в лунку 96-луночного плоскодонного планшета, добавляли 100 мкл свежеприготовленного реактива Грисса и следили за развитием цветной реакции в течение 40 мин при комнатной температуре. Затем измеряли оптическую плотность при длине волны 546 нм на спектрофотометре Tecan Infinite 200 (Австрия). Калибровочную кривую строили по стандартным растворам NaNO₂.

Измерение концентрации RSNO в асцитической жидкости и в плазме крови. Метод основан на спектрофотометрическом измерении н и т р и т а, образующегося при добавлении Hg²⁺, который, действуя как специфический разрушитель связи S—N, катализирует высвобождение из S-нитрозилированных тиолов NO. Последний, окисляясь до NO₂, определяется с помощью реактива Грисса по оптической плотности при 540 нм. Так, для определения RSNO к 150 мкл исследуемого образца, перенесенного в 96-луночный плоскодонный планшет, добавляли 50 мкл свежеприготовленного 0.2%-ного HgCl₂ в 1%-ном растворе сульфаниламида и 50 мкл 0.2%-ного раствора N-1-нафтилэтилендиамина. В течение 40 мин следили за развитием цветной реакции при комнатной температуре. В образцах плазмы и асцитической жидкости также определяли концентрацию нитритов. Затем в образцах плазмы и асцитической жидкости измеряли оптическую плотность при длине волны 546 нм. Для построения калибровочной кривой использовали стандартные растворы нитрита натрия. Концентрацию RSNO определяли как разность концентраций нитритов в образцах, обработанных и не обработанных HgCl₂.

Измерение концентрации нитротирозина (Tyr-NO₂) в асцитической жидкости и плазме крови. Использовали иммуноферментный метод и набор специальных реагентов (НВТ, Нидерланды).

Продукцию АФК (H₂O₂) оценивали по интенсивности хемиллюминесценции (ХЛ) фагоцитирующих клеток в присутствии индуктора люминола. Интенсивность люминолзависимой ХЛ регистрировали с помощью люминометра Биотокс-7а. В термостатированную (37 °C) ячейку хемиллюминометра помещали 500 мкл среды RPMI, pH 7.6, содержащей люминол (0.1 mM), суспензию клеток (макрофаги или ПМЯЛ в концентрации 10⁶ кл./мл). Клетки инкубировали в течение 10 мин, затем регистрировали ХЛ-ответ в течение 10 мин. Для построения калибровочной кривой и определения концентрации H₂O₂ к образцу асцитической жидкости (0.5 мл) добавляли 100 мкл 4%-ного глутарового альдегида для ингибирования АФК-генерирующей активности фагоцитов. Через 10 мин к образцу добавляли 250 мкМ люминола, регистрировали ХЛ, затем добавляли растворы H₂O₂ в концентрациях от 1 нМ до 1 мкМ и регистрировали ХЛ-ответ для сопоставления с экспериментальными значениями. Значения АФК-генерирующей активности представлены в эквимольных концентрациях H₂O₂, продуцируемого 1 млн клеток за 1 мин. Чувствительность детекции АФК этим методом составляет приблизительно 1—5 нМ.

Статистическую обработку данных проводили, используя программы MS Excel и Origin 8.0. Из совокупности данных рассчитывали среднее квадратичное отклонение (σ). Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента для малых выборок (n ≤ 30). На графиках представлены средние значения из не менее чем 5 экспериментов.

Результаты и обсуждение

Концентрация опухолевых клеток, объем асцитической жидкости и продолжительность жизни опухоленосителя. Первостепенным условием при исследовании влияния роста асцитной гепатомы Зайделя на динамику метаболитов оксида азота в плазме и асцитической жидкости является стандартизация параметров, которые характеризуют интенсивность опухолевого процесса. В таблице приведены величины продолжительности жизни опухоленосителя, объема асцитической жидкости в брюшной полости животного и концентрации опухолевых клеток. При постоянной концентрации трансплантированных клеток вышеперечисленные параметры зависят от исходной массы животного. Экспериментальные исследования проведены на крысах массой 200—220 г. Ранее на этой экспериментальной модели мы исследовали динамику накопления асцитической жидкости и динамику концентрации клеток асцитной гепатомы Зайделя в брюшной полости животного и показали, что обе зависимости имеют S-образный характер (Шаталин и др., 2010). Поступление жидкости и веществ в асцитическую жидкость связано с увеличением проницаемости капилляров за счет высвобождения гистамина тучными клетками. Другой причиной образования асцита является увеличение синтеза оксида азота эндотелием и макрофагами. Это создает условия для облегченного транспорта крупных молекул и белков, а также для миграции клеток иммунной системы (Maekawa, 2005).

Динамика АФК-генерирующей активности ПМЯЛ плазмы и макрофагов асцитической жидкости. Исследовали спонтанную активность ПМЯЛ кровеносного русла и перитонеальных макрофагов асцитической жидкости. Эти клетки являются одними из основных источников внеклеточных АФК в соответствующих зонах организма. С помощью люминолзависимой ХЛ показано, что АФК-генерирующая активность ПМЯЛ, циркулирующих в крови, в ходе роста опухоли увеличивалась в 2—2.2 раза (рис. 1, кривая 2). Причины, приводящие к активации ПМЯЛ, могут быть обусловлены ростом концентраций гематопоэтических факторов роста (G-CSF или GM-CSF) в организме опухоленосителя. Показано, что их концентрация коррелирует с численностью ПМЯЛ (Cetingul et al., 1997) и оказывает праймирующее влияние на активность лейкоцитов (Mur et al., 1997), т. е. после небольшого начального периода развития гепатомы Зайделя в крови значительно повышается окислительное напряжение. В то же время ранее обнаружено, что в плазме опухоленосителя снижается антиоксидантная емкость (Поцелуева и др., 2013). Наличие прооксидантной активности фагоцитов и снижение уровня антиоксидантов свидетельствуют о развитии окислительного стресса в плазме крови опухоленосителя. Напротив, в зоне роста опухоли мы обнаружили постепенное снижение АФК-генерирующей активности мононуклеаров (рис. 1, кривая 1). Таким образом, в двух пространственно разнесенных компартментах опухоленосителя (кровь и асцит) создаются противоположные условия: в крови развивается окислительный стресс, а в зоне роста опухоли создаются условия с большими восстановительными возможностями, по-видимому из-за снижения числа фагоцитов, гипоксии, ацидоза и понижения уровня АФК до значений, эквивалентных 2—4 нМ H_2O_2 .

Динамика Tug-NO₂ в плазме крови и асцитической жидкости при развитии опухоли

Характеристические показатели экспериментальной модели роста опухоли (асцитной гепатомы Зайделя) в организме крысы

Показатель	Значение
Продолжительность жизни опухоленосителя	9—11 сут
Конечный объем асцитической жидкости	60—70 мл
Конечная концентрация опухолевых клеток	$2.5 \cdot 10^7$ в 1 мл

представлена на рис. 2, а. При развитии гепатомы Зайделя наблюдается резкое увеличение концентрации Tug-NO₂ (до 10—11 нМ) в плазме крови на 1—2 сут после трансплантации. При дальнейшем развитии опухоли уровень Tug-NO₂ снижается до 3—6 нМ. Повышение концентрации Tug-NO₂ на начальном этапе опухолевого роста, а следовательно, и пероксинитрита, возможно обусловлено формированием воспалительной реакции в ответ на трансплантацию гепатомы Зайделя. Повышение концентрации Tug-NO₂ показано при различных воспалительных процессах, включая ревматоидный артрит, образование атеросклеротических бляшек, хроническую почечную недостаточность и септический шок (Abramson, 2008; Yousefipour et al., 2010; Soriano et al., 2011; Tanner et al., 2011; Yamagishi, Matsuit, 2011). Однако рост Tug-NO₂ может происходить даже без увеличения уровня NO, который всегда находится в кровяном русле в физиологических концентрациях. В процессе дальнейшего роста модельной асцитной опухоли (гепатома Зайделя) в плазме развивается окислительный стресс (Поцелуева и др., 1999; Шаталин и др., 2010), что может приводить к окислению белков, в том числе и тирозина. Совокупность данных процессов может приводить к снижению доступного количества тирозина для нитрования и к дальнейшему падению Tug-NO₂ в анализируемых объектах, что и наблюдается в эксперименте. Для подтверждения этого положения необходимы исследования динамики окисления белков плазмы крови и асцитической жидкости.

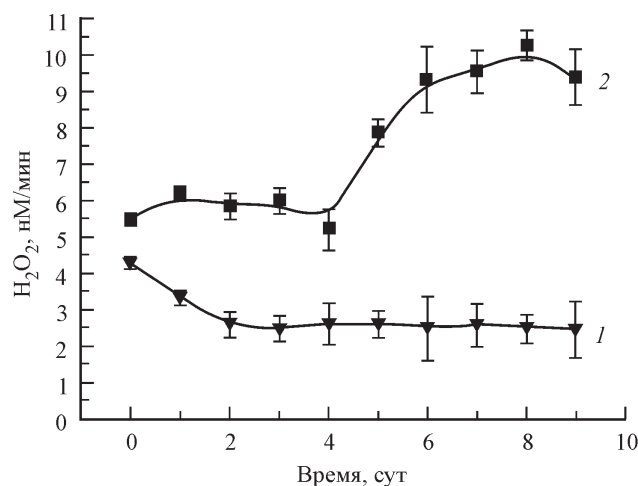


Рис. 1. Динамика АФК-генерирующей активности макрофагов асцитической жидкости (кривая 1) и ПМЯЛ в плазме крови (кривая 2) в ходе роста асцитной гепатомы Зайделя.

Значения АФК представлены в эквивалентных концентрациях пероксида водорода, продуцируемого 1 млн клеток за 1 мин.

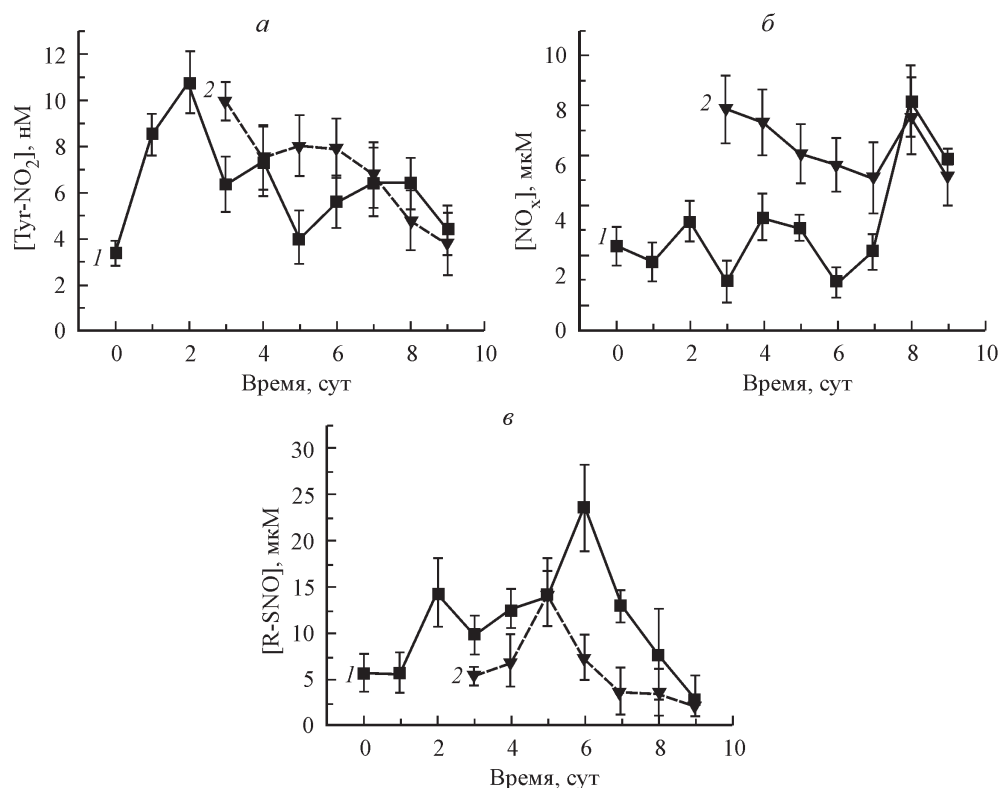


Рис. 2. Изменение концентрации нитротирозина (Tyr-NO₂) (а), нитритов и нитратов (NO_x) (б), а также нитрозотиолов (R-SNO) (в) в ходе развития асцитной гепатомы Зайделя в организме крысы.

Кривая 1 — в плазме крови, кривая 2 — в асцитной жидкости; точка «0 сут» — здоровое животное. Представлены средние значения и их ошибка (n ≥ 5).

В зоне же роста опухоли корректно оценить концентрацию метаболитов NO возможно начиная лишь с 3-х сут из-за малого объема асцитической жидкости в начале роста опухоли. Однако на основании того, что белки в зону опухоли поступают из плазмы крови, можно предположить, что концентрация Tyr-NO₂ в асците в начальный период, так же как и в плазме, возрастает. Затем, начиная с 3-х сут после трансплантации опухоли, концентрация Tyr-NO₂ в асците постепенно снижается. На основании полученных данных можно заключить, что обнаруженное повышение концентрации пероксинитрита по уровню Tyr-NO₂ в плазме крови опухоленосителя на начальном этапе развития гепатомы Зайделя является лишь маркером начала патологического процесса, сопровождаемого воспалением.

Динамику NO_x в плазме крови и асцитической жидкости проводили в пробах, отобранных у декапитированных животных, на разных фазах опухолевого роста (ежесуточно). На рис. 2, б представлены изменения концентрации низкомолекулярных NO_x в плазме и асцитической жидкости в ходе развития опухоли. Показано, что при прогрессии опухоли у животных концентрация NO_x в плазме незначительно колеблется в некотором диапазоне и резко возрастает в терминальной фазе опухолевого процесса. В асцитической жидкости наблюдается более высокий фоновый уровень NO_x (рис. 2, б, кривая 2), который может быть обусловлен как работой иммунной системы, в частности макрофагов, так и отсутствием гемоглобина, который может связывать нитриты, а также сниженной скоростью утилизации веществ из зоны опухоли. При этом концентрация NO_x, начиная с 3-х по 7-е сут, постепенно снижается. На заключительной фазе

также заметен скачок концентрации NO_x как в асците, так и в плазме. Следует отметить, что метаболиты NO в сыворотке крови представлены в основном нитратами, поскольку нитриты очень легко окисляются до нитратов. Период полураспада нитритов в крови человека составляет около 110 с (Kelm, 1999), а нитратов — 5–8 ч (Kelm et al., 1996). Механизмы окисления NO и NO₂ в NO₃⁻ в условиях организма не совсем ясны.

По динамике концентрации NO_x невозможно сделать однозначные выводы относительно активности NO-генерирующей системы в организме и роли NO_x в патологическом состоянии организма, вызванном развитием опухоли, так как данные соединения быстро утилизируются выделительной системой. Однако на завершающей стадии развития модельной опухоли наблюдается увеличение уровня NO_x, особенно в кровяном русле. Этот показатель, возможно, является индикаторным для характеристики терминальной стадии аналогичных патологических состояний. Но наряду с этим необходимо рассматривать и другие метаболиты NO, в частности различные модификации белков под действием активных форм азота, так как динамика NO_x не полностью отражает картину, связанную с активностью систем генерации NO.

Динамика RSNO. Нитрозилированные SH-группы белков являются важнейшими производными оксида азота. На рис. 2, в представлена динамика белковых RSNO в плазме и асцитической жидкости при развитии гепатомы Зайделя. Видно, что в плазме крови (рис. 2, в, кривая 1) концентрации RSNO растет (в 4–4.5 раза) вплоть до 6-х сут эксперимента, а затем снижается. В асцитической жидкости (рис. 2, в, кривая 2), куда, по-видимому, поступают нитрозилированные белки, динамика

RSNO имеет аналогичную тенденцию, но средняя концентрация RSNO снижена по сравнению с плазмой. По-видимому, данные закономерности вызваны нарушением баланса между АФК и метаболитами NO, что приводит к начальному доминированию процессов, связанных с NO и усилением окислительных процессов на заключительных фазах опухолевого роста.

RSNO являются одними из важнейших производных NO в организме. В образовании нитрозильных комплексов участвуют тиоловые группы белков и низкомолекулярные тиолы (цистеин, цистин или глутатион). Эти соединения являются достаточно стабильными, но при этом под действием ряда факторов способны высвобождать NO[•] и тем самым обеспечивать действие NO на некотором расстоянии от места его освобождения. Нитрозилирование ключевых тиоловых групп в ферментах может быть токсичным для них. Денитрозилирование происходит под действием восстановителей, ионов металлов с переменной валентностью, pH, сдвига парциального давления кислорода (Stamler et al., 1994; Silkoff et al., 1998; Андреева, 2000; Li et al., 2000). Обратимость процесса нитрозилирования позволяет регулировать функции белков по механизму включения и выключения. Физиологическое значение нитрозилирования выражается в том, что с нарушением нормального соотношения процессов нитрозилирования и денитрозилирования связан патогенез многих заболеваний, таких как астма и кистозный фиброз легких (Grasemann, Ratjen, 1999; Hunt et al., 2000).

Наблюдаемые закономерности поведения метаболитов NO свидетельствуют о формировании нитрозивного стресса в организме опухоленосителя, а динамика RSNO может являться важнейшим маркером интенсивности опухолевого процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (№ 214/281).

Список литературы

- Андреева Н. А., Шуматова Т. А., Мотавкин П. А. 2000. Нитрооксидергические нейроны органов дыхания. Бюл. экс. биол. мед. 129 (2) : 222—224. (Andreeva N. A., Shumatova T. A., Motavkin P. A. 2000. Nitroergic neurons in respiratory organs. Bull. Exp. Biol. Med. 129 (2) : 190—192.)
- Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А. 1998. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути. Биохимия. 63 (7) : 966—975. (Brüne B., Sandau K., von Knethen A. 1998. Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. Biochemistry (Moscow). 63 (7) : 817—825.)
- Маеда Х., Акаике Г. А. 1998. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке. Биохимия. 63 (7) : 1007—1009. (Maeda H., Akaike G. A. 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. Biochemistry (Moscow). 63 (7) : 854—865.)
- Манухина Н. М. 2000. Системная семейная психотерапия соматических больных в период их госпитализации. Семейная психология и семейная терапия. 2 : 15—20. (Manukhina N. M. 2000. Systemic family therapy somatic patients during their hospitalization. Family Psychol. Family Therapy. 2 : 15—20.)
- Поцелуева М. М., Наумов А. А., Сухомлин Т. К., Зинатуллина Г. Г., Шаталин Ю. В. 2013. Влияние роста асцитной гепатомы Зайделя на состояние внеклеточной антиоксидантной системы опухоленосителя. Цитология. 55 (5) : 307—312. (Potselueva M. M., Naumov A. A., Sukhomlin T. K., Zinatullina G. G., Shatalin Yu. V. 2013. Effect of Zajdela ascite hepatoma growth on

the extracellular antioxidant system of tumor bearer. Tsitologiya. 55 (5) : 307—312.)

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. (Potselueva M. M., Pustovidko A. V., Alabin V. S., Evtodienko Yu. V. 1999. Generation of reactive forms of oxygen by polymorphonuclear leucocytes during hepatoma in the rat peritoneal cavity. Tsitologiya. 41 (2) : 162—166.)

Хабриев Р. У. (Ред.). 2005. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина. 832 с. (Habrieu R. U. (Ed.). 2005. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. M.: Medicine. 832 p.)

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 опухоленосителя. Цитология. 52 (2) : 131—135. (Shatalin Yu. V., Naumov A. A., Potselueva M. M. 2010. Variations in cell population size and reactive oxygen species level in the blood and the ascites liquid of tumor carrier. Tsitologiya. 52 (2) : 131—135.)

Abramson S. B. 2008. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. Arthritis Res. Ther. 10 : S2.

Albina J. E., Reichner J. S. 1998. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. Cancer Metastasis Rev. 17 : 39—53.

Cetingül N., Oztop S., Kavakli K., Ozunan I., Nisli G., Hekimgil M. 1997. Histiocytic syndromes in children. Turk. J. Pediatr. 39 : 287—294.

Ding L. 1988. The microcomputer in aiding morphometry and analysis of lesions in experimental liver cell carcinoma. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 68 : 704—705.

Estévez A. G., Crow J. P., Sampson J. B., Reiter C., Zhuang Y., Richardson G. J., Tarpey M. M., Barbeito L., Beckman J. S. 1999. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. Science. 286 : 2498—500.

Foster M. W., Liu L., Zeng M., Hess D. T., Stamler J. S. 2009. A genetic analysis of nitrosative stress. Biochemistry. 48 : 792—799.

Furlong B., Henderson A. H., Lewis M. J., Smith J. A. 1987. Endothelium-derived relaxing factor inhibits *in vitro* platelet aggregation. Br. J. Pharmacol. 90 : 687—692.

Gow A. J. 2006. The biological chemistry of nitric oxide as it pertains to the extrapulmonary effects of inhaled nitric oxide. Proc. Amer. Thorac. Soc. 3 : 150—152.

Grasemann H., Ratjen F. 1999. Cystic fibrosis lung disease: the role of nitric oxide. Pediatr. Pulmonol. 28 : 442—448.

Green L. C., Tannenbaum S. R., Fox J. G. 1982. Nitrate in human and canine milk. N. Engl. J. Med. 306 : 1367—1368.

Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6 : 150—166.

Hogg N., Kalyanaraman B., Joseph J., Struck A., Parthasarathy S. 1993. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. FEBS Lett. 334 : 170—174.

Hunt J. A., Moissidis E., Haertsch P. 2000. Initial experience of Integra in the treatment of post-burn anterior cervical neck contracture. Br. J. Plast. Surg. 53 : 652—658.

Lefer A. M., Lefer D. J. 1991. Endothelial dysfunction in myocardial ischemia and reperfusion: role of oxygen-derived free radicals. Basic. Res. Cardiol. 86 (Suppl. 2) : 109—116.

Li D., Shirakami G., Zhan X., Johns R. A. 2000. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 23 : 175—181.

Mills C. D. 1991. Molecular basis of «suppressor» macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. J. Immunol. 146 : 2719—2723.

Mur E., Zabernigg A., Hilbe W., Eisterer W., Halder W., Thaler J. 1997. Oxidative burst of neutrophils in patients with rheuma-

toid arthritis: influence of various cytokines and medication. *Clin. Exp. Rheumatol.* 15 : 233—237.

Reiter C. D., Teng R. J., Beckman J. S. 2000. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275 : 32 460—32 466.

Silkoff P. E., McClean P. A., Caramori M., Slutsky A. S., Zamel N. 1998. A significant proportion of exhaled nitric oxide arises in large airways in normal subjects. *Respir. Physiol.* 113 : 33—38.

Sneddon J. M., Vane J. R. 1988. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85 : 2800—2804.

Soriano F. G., Lorigados C. B., Pacher P., Szabo C. 2011. Effects of a potent peroxynitrite decomposition catalyst in murine models of endotoxemia and sepsis. *Shock.* 35 : 560—566.

Stamler J. S., Loh E., Roddy M. A., Currie K. E., Creager M. A. 1994. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation.* 89 : 2035—2040.

Van Kessel K. P., 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.

Yamagishi S., Matsui T. 2011. Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy — friend or foe? *Pharmacol. Res.* 64 : 187—194.

Yousefipour Z., Oyekan A., Newaz M. 2010. Interaction of oxidative stress, nitric oxide and peroxisome proliferator activated receptor gamma in acute renal failure. *Pharmacol. Ther.* 125 : 436—445.

Поступила 11 VI 2014

DYNAMICS OF NITROGEN OXIDE METABOLITES IN THE PLASMA AND ASCITES DURING ZAJDEL HEPATOMA GROWTH *IN VIVO*

M. M. Potselueva,^{1,2,*} A. A. Naumov,^{1,2} E. S. Kupriyanova^{1,2}

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, 142290, and

² Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, 142290;

* e-mail: mpotselueva@rambler.ru

The dynamics of extracellular nitrogen oxide metabolites localized in the plasma and ascites during Zajdel ascites hepatoma growth in the abdominal cavity has been investigated. An increase in peroxynitrite concentration was found by the levels of nitrotyrosine (up to 10—11 nM) in blood plasma at the initial stage of tumor cell development. In the course of further tumor development, an oxidative stress developed, which might cause oxidation of protein components including tyrosine. All these processes may cause a decrease in the accessible amount of tyrosine for nitration and lead to a fall in nitrotyrosine level (to 3—6 nM) at the final stages of tumor growth. Nitrotyrosine dynamics in the region of tumor growth is essentially analogous to that in the plasma because proteins during tumor growth comes from the blood plasma of tumor bearer. In studying the dynamics of nitrosylation of sulfur-bearing protein groups, an increase in the concentration of S-nitrosothiols was found to occur in the blood plasma for up to 6 days of the experiment, subsequently their concentration decreased. In the ascites, where protein R-SNO arrives, the mean concentration of nitrosothiols upon tumor growth is lower compared to that of the plasma. In studying the dynamics of final stable nitrogen oxide decay products — nitrites/nitrates, it has been found that during tumor development the concentration of these metabolites in the plasma varies only moderately within some range and sharply increases at the final stage of the experiment. In the area of tumor growth, an analogous trend in the behavior of nitrites/nitriaes has been registered (noted, marked), but with a higher background level, which might be due to both the functioning of immunocompetent cells, microphages in particular, and a decreased rate of utilization of substances from the ascites. Based on the aforesaid, it has been concluded that the nitrosylating stress in the organism of the bearer of a tumor is being developed along with the oxidative stress.

Key words: ascites hepatoma, ascites, reactive oxygen species, nitrogen oxide, S-nitrosothiols, nitrites, nitrates, peroxynitrite.