

УДК 615.032–081.79

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИДА АЗОТА В МЕХАНИЗМАХ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

© 2004 г. В. Н. Запорожан, А. И. Гоженко, Т. В. Корнеев, В. Г. Дубинина

Одесский государственный медицинский университет

В обзоре анализируются данные литературы и результаты собственных исследований о роли оксида азота (NO) в механизмах опухолевого роста и противоопухолевой резистентности организма. Обсуждаются также возможные механизмы неоднозначной биологической активности NO и приводятся данные литературы о роли этого соединения в реализации различных противоопухолевых эффектов. Обобщение и анализ этих данных позволили сформулировать некоторые принципы применения веществ, модулирующих синтез оксида азота, и NO-генерирующих соединений в лечении онкологических заболеваний.

Изучение медико-биологических аспектов оксида азота (NO) в последние годы стало одним из наиболее активно развивающихся направлений биомедицинских исследований [7, 8, 16, 17, 38, 39, 72, 120, 121]. Наши представления о роли этого эндогенного соединения в различных физиологических и патологических процессах [9–15, 18], и в частности при опухолевом росте [19], продолжают расширяться. Однако изучение биологического значения NO в процессах канцерогенеза порождает все новые и новые вопросы [8, 19, 20–26, 28, 29, 40–43, 127]. Большое количество противоречивых данных литературы [22, 29, 30, 43, 61] позволило говорить о дуалистической роли этого универсального эндогенного регулятора, как мощного фактора антибластомной защиты, с одной стороны, а также мутагена и стимулятора ангиогенеза – с другой [21, 24, 26, 46, 47, 50, 55, 57, 75].

В настоящей работе проанализированы противоречивые данные литературы об участии NO в противоопухолевой резистентности организма [50, 67, 69, 78–80, 82, 84, 87]. Кроме того, рассмотрены результаты исследований, свидетельствующих о возможности участия NO в процессах возникновения и прогрессирования опухоли [2, 21–24, 40–42], а также о посреднической роли оксида азота в реализации эффектов различных противоопухолевых воздействий [25, 29, 30, 109]. Обобщение и анализ этих данных позволяет наметить некоторые принципы применения веществ, модулирующих образование оксида азота в организме в ходе NO-синтазных реакций, а также NO-генерирующих соединений, высвобождающих оксид азота в результате метаболизма этих соединений в клетках тканей, в лечении онкологических заболеваний.

Различные виды активности NO обеспечиваются функционированием трех изоформ NO-син-

тазы (NOS) – фермента, катализирующего генерацию NO и L-цитрулина из L-аргинина, а также  $O_2^-$  с использованием донора электронов NADPH и ряда кофакторов [16, 20, 26–28, 39]. С конститутивными формами NO-синтаз – нейрональной (nNOS) и эндотелиальной (eNOS) связана функция NO как регулятора метаболизма в различных органах и тканях [16, 20, 39, 109, 110]. Эти изоформы NOS экспрессируются постоянно и их активность, как известно, регулируется изменением внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  [16, 25, 27, 39]. Постоянный уровень NO, который поддерживается nNOS и eNOS в тканях, составляет 10–100 нМ [60]. Продукция NO как эффектора системы клеточного иммунитета обеспечивается индуцибельной NOS (iNOS) [67]. Эта изоформа экспрессируется в клетках под влиянием цитокинов и не зависит от концентрации  $Ca^{2+}$ . Уровень NO в этих клетках достигает 1–10 мкМ [26, 28, 39, 60].

### NO, АПОПТОЗ И РАК

Роль NO в индукции апоптоза разных клеток показана в различных экспериментальных условиях [47, 49–51, 63]. Через экспрессию iNOS реализуется апоптоз, индуцированный фактором некроза опухолей (TNF)- $\alpha$  [49, 50, 103]. TNF- $\alpha$  активирует внутриклеточный рецептор (55 kD – TNF- $\alpha$ ), который содержит “участок гибели” (1), инициирующий сигнальный и эффекторный каскады с про- и антиапоптотической функцией и “участок iNOS” (2), связанный с индукцией iNOS и генерацией NO [49]. Экспрессия iNOS индуцируется не только TNF- $\alpha$ , но и другими провоспалительными цитокинами – интерлейкином (IL)-1 $\beta$ , интерфероном (IFN)- $\gamma$ , IL-10 [103, 115]. IL-10 повышает синтез NO резидентными перитонеальными макрофагами в присутствии и в отсутствие блокирующих антител к TNF- $\alpha$  [115]. С другой

стороны, повышение цитотоксичности мышечных макрофагов в отношении *YAC-1* опухолевых клеток под влиянием микробного агента *Mycoplasma arginini*, несмотря на одновременное увеличение продукции *TNF*, было связано с продукцией *NO*, но не *TNF*, так как она снижалась при использовании ингибиторов продукции *NO* и не изменялась при применении антител к *TNF* [119].

В опытах на культуре нервных и глиальных (астроциты) клеток показано, что *NO* в концентрации 100 мкМ обладает цитотоксическим действием [107]. Доноры *NO*, чувствительные к эстеразе, из семейства диазениумдиалатов индуцируют *in vitro* апоптоз *NO*-чувствительных клеток лейкоцитов человека (линии *HL-60* и *U937*), демонстрируя, таким образом, антилейкемическую роль *NO* [121]. Другой донор *NO* – нитропруссид натрия провоцирует апоптоз клеток нейробластомы человека (*CHP 100*) [96].

Апоптоз опухолевых клеток линии *MCF-7*, индуцированный *TNF- $\alpha$* , опосредуется двумя механизмами: индукцией *iNOS* и активацией каспаз 1- и 3-подобных протеаз. Ингибиторы каспаз эффективно подавляют активацию каспаз и предотвращают апоптоз. Такой же эффект (угнетение апоптоза) вызывается ингибитором *iNOS* *L*-нитро-аргинин-метил-эстером (*L-NAME*) [49].

Донор *NO* глицерол тринитрат (*GTN*) индуцировал апоптоз клеточной линии рака молочной железы, выделенной из первичной опухоли (*BT 20*) и из метастазов (*MCF-7*). При этом было обнаружено, что *NO* запускал активацию каспазы-1, каспазы-3 и каспазы-6 в этих клетках, вызывая высвобождение митохондриального белка цитохрома *c* в цитозоль, а также способствовал повышению числа клеток с низким митохондриальным трансмембранным потенциалом и высоким уровнем кислородных радикалов. Однако в этих условиях не происходила экспрессия мРНК лиганда *CD95* и не изменялась экспрессия проапоптотического белка *Bax* и антиапоптотического белка *Bcl-2*. На основании этих данных авторы предположили, что *NO*-медируемая активация каспаз и, следовательно, апоптоз клеток рака молочной железы зависят от повреждения митохондрий, и в частности высвобождения цитохрома *c*, нарушения митохондриального трансмембранного потенциала и продукции кислородных радикалов, но не от активации *CD95/CD95 L* путей [136].

В результате взаимодействия *NO* и супероксида образуются анионы пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), которые после протонирования переходят в  $\text{ONOOH}$ . Последний в дальнейшем распадается с высвобождением  $\text{NO}_2$  и  $\text{OH}$ -радикала, которые и активируют ген *p38* протеинкиназ, что служит началом апоптоза [117].

Обнаружено торможение вирусной репликации в клетках нейробластомы, которое авторы

связывают с воздействием *NO* на механизмы трансляции и посттрансляционные изменения вирусных компонентов, но не с окислительным стрессом [90].

Известно, что повреждение ДНК приводит к накоплению белка *p53*, индуцирующего апоптоз клетки и подавляющего рост опухолей. В экспериментах на макрофагах и клетках инсулиномы *RINm5F* выявлено накопление *p53* при гибели клеток, вызванной *NO*. Ингибитор *NOS*  $\text{N}^G$ -монометил-*L*-аргинин (*L-NMMA*) подавлял накопление *p53*, индуцированное цитокинами или липополисахаридами (*LPS*) [7]. Другими авторами показано, что *NO*-медируемый апоптоз в макрофагах линии *RAW 264.7* и накопление *p53*, по крайней мере, частично, связано с торможением протеасом [68].

Еще один механизм *NO*-индуцированного апоптоза продемонстрирован на примере клеток опухоли панкреатических  $\beta$ -клеток хомяка [131]. Авторы показали, что оксид азота вызывал гибель этих клеток путем увеличения уровня  $\text{H}_2\text{O}_2$  и липидных перекисей, по-видимому, в связи с угнетением активности или экспрессии глутатионпероксидазы.

Макрофаги как элемент защитной противоопухолевой системы организма играют важную роль в регрессии различных видов опухолей [20, 23–26, 74, 76]. Активированные перитонеальные макрофаги способны угнетать развитие опухоли *AK-5* благодаря апоптозу опухолевых клеток, вызванному экспрессией *NOS* и увеличением продукции *NO* [51]. Однако авторы этой работы показали, что опухолевые клетки угнетают активацию макрофагов. Исследование противоопухолевой иммунокомпетентности альвеолярных макрофагов у пациентов с раком легких также показало, что экспрессия мРНК *iNOS* в этих клетках, а также активность *NO* в бронхоальвеолярном лаваже легких опухоленосителей значительно ниже, чем в контрольной группе. Таким образом, продемонстрировано снижение функции альвеолярных макрофагов и, следовательно, противоопухолевой иммунокомпетентности у больных раком легких [74]. Противоопухолевую активность альвеолярных макрофагов индуцирует молекулярный комплекс *CD40-CD40L*, играющий важную роль в развитии клеточного и гуморального иммунитета. Причем *NO* наряду с *TNF- $\alpha$*  и *IL-12* – один из посредников такого эффекта [76]. Цитотоксический потенциал мышечных макрофагов в отношении клеток карциномы толстого кишечника повышается под влиянием колониестимулирующего фактора (*rmGM-CSF*) через продукцию *NO*. При ингибировании *NOS* лизис опухолевых клеток снижается [86]. Недавно была обнаружена способность у вируса болезни Ньюкасла, обладающего интересными иммуностимулирующими и

противоопухолевыми свойствами, активировать противоопухолевую активность макрофагов мышей (перитонеальных и селезеночных), причем, по крайней мере, один из механизмов такого эффекта макрофагов связан с усилением экспрессии *iNOS* и увеличением продукции NO. В экспериментах *in vivo* на модели карциномы молочной железы и рака легких тоже выявлено угнетение метастазирования при повторных внутривенных введениях макрофагов, активированных вирусом болезни Ньюкасла [123].

Торможение продукции NO – это также одна из причин снижения противоопухолевой цитолитической активности мышинных перитонеальных макрофагов под влиянием мощного гепатокарциногена афлатоксина B1 [104]. Есть данные о том, что сAMP защищает сами макрофаги от апоптоза, медируемого NO. При этом в условиях, когда макрофаги активированы и экспрессируют *iNOS* и, следовательно, продуцируют NO, сAMP может выступать в роли защитного фактора, повышающего устойчивость самих макрофагов к апоптозу [88].

Структурным компонентом системы противоопухолевой защиты организма являются также естественные киллеры (NK-клетки). Торможение *iNOS* специфическими ингибиторами значительно снижает литическую активность NK-клеток, активированных *IL-2*, в отношении опухолевых клеток. Таким образом, опосредованная NK-клетками гибель опухолевых клеток-мишеней осуществляется через увеличение экспрессии *iNOS* и, следовательно, продукция интерферона- $\gamma$ , индуцированная *IL-2*, по крайней мере, частично определяется продукцией *iNOS* [59]. Цитолиз и апоптоз опухолевых клеток АК-5 NK-клетками также опосредуется продукцией NO с высокой экспрессией индуцибельной *NOS*. Причем в присутствии *L*-аргинина наблюдается значительное усиление лизиса клеток и, наоборот, ослабление клеточного лизиса, фрагментирования ДНК и апоптоза под влиянием *L-NAME* [82].

### ПРООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ ОКСИДА АЗОТА

Другая сторона чрезмерной продукции NO – это его участие в канцерогенезе и усилении роста опухолей [19, 25, 26, 28, 29]. Мутагенные свойства оксида азота показаны в различных экспериментальных условиях [57, 91, 122, 129]. В бронхиальных эпителиоцитах человека линии *BEAS-2B* донор NO-комплекс диэтиламин NO (*DEA/NO*) индуцирует точечную мутацию в кодоне 248 гена *p53* [129]. Другой донор оксида азота (+/-)-(E)-метил-2-[(E)-гидроксиимино]-5-нитро-6-метокси-3-гексенамид (*NOR-1*) использовали в качестве инициатора двухстадийного канцерогенеза, который совместно с промотером 12-O-тетрадеканол-

форболом-13-ацетатом (ТРА) индуцировал развитие опухолей кожи у мышей [91]. Избыточная продукция NO в воспалительной ткани приводит к нитрованию тирозиновых остатков *p53* белка, нарушая его функции и играя, таким образом, важную роль в канцерогенезе [57]. Гистологическое изучение растущей подкожно опухоли мышей (*mutatect MN-11*), характеризующейся высокой частотой спонтанных мутаций, показало, что нейтрофилы – доминирующий тип клеток, инфильтрирующих опухоль. Количественная оценка числа нейтрофилов и частоты мутаций, а также *iNOS* нейтрофильного происхождения и частоты мутаций показало статистически значимую корреляцию. Увеличение числа инфильтрирующих нейтрофилов с помощью *IL-8* и простагландинов ( $\text{PGE}_2$ ) привело к увеличению числа мутаций. Учитывая то, что нейтрофилы – мощный источник генотоксически реактивного кислорода и/или NO, авторы сделали вывод, что нейтрофилы, инфильтрирующие опухоль, являются мутагенными и содействуют генетическим повреждениям, связанным с опухолевой прогрессией [122]. В другом исследовании продемонстрировано, что ингибитор *NOS L-NAME* оказывает эффективное защитное действие от индукции опухоли ободочной кишки химическим канцерогеном – азокси-метаном благодаря угнетению пролиферации клеток [83].

В настоящее время накоплено достаточно много данных о связи между воспалением и развитием опухоли [25–29, 46, 69, 80]. Так, представлены данные о том, что оксид азота, супероксид и продукт их реакции – пероксинитрит, образующиеся при инфекционных заболеваниях, играя важную роль в их патогенезе, модифицируют белки и повреждают нуклеиновые кислоты. В условиях хронического воспаления, длящегося годами, эти эффекты способствуют мутагенезу и могут инициировать, таким образом, канцерогенез [25]. В работе [80] показано, что активация *iNOS* и избыточная продукция NO, индуцированная воспалительными цитокинами (*IL-1 $\beta$* , *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* ) в клеточных линиях холангиокарциномы, вызывали повреждение ДНК и ингибировали белки репарации ДНК. Это позволило авторам говорить о связи между воспалением и инициацией, промоцией и прогрессией опухоли. Представляют также интерес данные о роли хронического воспаления, связанного с вирусным гепатитом *C* и *B*, в развитии рака печени у человека. Предполагают, что пролонгированное повреждение клетки при хроническом воспалении – критический фактор в развитии рака. В свою очередь, гиперпродукция NO и его дериватов, в частности пероксинитрита, является причиной такого повреждения ткани при хроническом воспалении, что способствует развитию опухоли. Было обнаружено, что *iNOS* и 3-нитротирозин, маркер перокси-

нитрита, экспрессируются в пренеопластических и неопластических тканях печени крыс, индуцированных химическим канцерогеном N-нитрозодиамином. При этом пренеопластические ткани характеризовались пролиферацией фенотипически измененных печеночных фокусов (ФИПФ), наличием диспластических гепатоцитов и овальных клеток. Гистологически все опухоли являлись гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) трабекулярного, (псевдо)железистого и солидного типов с или без холангиоциточного вовлечения. *iNOS* локализовалась в основном в овальных клетках, эпителиальных и мышечных клетках капилляров, эпителия холангиом и железистых ГЦК. 3-Нитротирозин локализовался в цитоплазме ФИПФ и в диспластических гепатоцитах пренеопластических тканей и в цитоплазме некоторых живущих и апоптотических ГЦК клеток, в синусоидном эндотелии опухолевых гепатоцитов. На основании этих данных авторы сделали вывод: 1) хроническое повреждение тканей химическими канцерогенами может опосредоваться индукцией *iNOS* и синтезом пероксинитрита; 2) овальные клетки играют ключевую роль в развитии и росте опухоли, продуцируя NO через *iNOS*; 3) *iNOS* можно считать фенотипическим маркером клеток овальной линии и неоваскуляризованных капилляров опухоли [46]. Дендритные клетки гепатоцеллюлярной карциномы также продуцируют значительно более высокий уровень NO и *TNF- $\alpha$*  и сниженное количество *IL-12* по сравнению с дендритными клетками цирроза печени и нормального контроля. Кроме того, обнаружен специфический дефект созревания дендритных клеток во время гепатоканцерогенеза [116].

Другая хроническая инфекция, вызванная *Helicobacter pilory*, является важным этиологическим фактором развития рака желудка. Показано, что инфицирование *Helicobacter pilory* приводит к повышению продукции NO, что вызывает повреждение ДНК и, таким образом, способствует канцерогенезу. Так, обнаружено, что экспрессия *iNOS* и образование нитротирозина в слизистой желудка были значительно выше у пациентов, инфицированных *Helicobacter pilory* по сравнению с неинфицированными. Среди них активность *iNOS* и уровень нитротирозина были выше у больных, у которых в течение 2 лет развился рак желудка по сравнению с теми, кто не заболел этим заболеванием в течение длительного периода [69].

Усиление экспрессии *NOS* и, следовательно, повышение содержания NO в различных опухолях человека продемонстрированы и в других работах. Так, высвобождение NO, опосредованное опиатными *mu3* рецепторами, в карциноме легких значительно выше и длительнее по сравнению с нормальными легкими, следовательно, эн-

догенные опиаты могут играть роль в прогрессии опухоли через высвобождение NO [65]. NO и нитрозамины вовлекаются в канцерогенез мочевого пузыря. Показано, что цитозольные нитраты и цитруллин как индикаторы NO были значительно повышены у пациентов с опухолью мочевого пузыря [84]. В биоптате карциномы мочевого пузыря злокачественные эпителиальные клетки были высоко *iNOS* положительны в отличие от клеток слизистой мочевого пузыря вне злокачественных регионов. Эндотелиоциты прекапиллярных сосудов стромы опухоли мочевого пузыря гиперэкспрессировали *eNOS* по сравнению с незлокачественной тканью [87].

Анализ экспрессии изоформ *NOS* в различных формах опухолей репродуктивных органов (рак шейки матки, эндометрия яичников) показал, что *iNOS* экспрессируется в 90% опухолей, некоторые виды опухолей экспрессируют в ряде случаев также *eNOS* и *nNOS*. Корреляция между частотой экспрессии *NOS* и возрастом пациентов, а также стадиями течения болезни не обнаружена. На основании этих данных, а также способности NO повышать проницаемость сосудов и усиливать кровоток, авторами сделано заключение, что высокая экспрессия *NOS* в опухолях репродуктивных органов стимулирует опухолевый рост [70].

В сквамозноклеточной карциноме пищевода также экспрессируется *iNOS*, причем уровень экспрессии не зависит от глубины опухолевой инвазии, гистохимической дифференциации и состояния лимфатических узлов. На основании этих данных авторы делают вывод, что усиленная экспрессия NO ассоциируется с канцерогенезом пищевода человека в связи с мутагенными свойствами NO (повреждение ДНК) [133]. Показано, что эндотелиальная конститутивная *eNOS* экспрессируется лишь в незначительном количестве в гистологически нормальной сквамозной слизистой, тогда как реактивное повреждение слизистой, сквамозная дисплазия и сквамозно-клеточная карцинома головы и шеи демонстрируют значительно больше *eNOS* [48].

У пациентов с карциномой ободочной или прямой кишки значительно повышен уровень плазменных нитратов/нитритов и понижена активность антиоксидантных систем. Этот факт объясняется вовлечением эндогенно образованного NO и свободных радикалов в этиологию опухолевого роста [132].

Однако выводы о вовлечении NO в канцерогенез, сформулированные на основании усиленной экспрессии *NOS* и продукции NO в различных опухолях, на наш взгляд, не всегда в полной мере обоснованы. Учитывая то, что состояние организма опухоленосителя характеризуется развитием стресс-реакции, увеличение продукции NO может соответствовать стадии мобилизации при

адекватной стресс-реакции [39]. Кроме того, повышенное высвобождение NO может быть проявлением активации противоопухолевой системы организма, структурными компонентами которой являются макрофаги и NK-клетки [21].

Тем не менее некоторые механизмы канцерогенного действия оксида азота установлены. NO, вызывая расслабление гладкомышечных элементов сосудов, может улучшать питание опухоли. При этом пероксинитрит инактивирует ингибитор  $\alpha$ 1-протеазы, активируя металлопротеиназы матрикса [94]. В другом исследовании обнаружено, что NO содействует регуляции ангиогенеза посредством ангиогенных пептидов, а также фактора роста фибробластов (ФРФ). Повышение количества индикаторов NO (цитозольных нитратов и цитруллина) у пациентов с опухолью мочевого пузыря коррелировало с повышением уровня фактора роста фибробластов. Следовательно, ангиогенные пептиды, модулируемые NO, могут быть мишенью для антиангиогенной терапии рака мочевого пузыря [84]. Определение уровня фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) и NO (опосредованно через нитриты) в сыворотке крови больных раком желудка показало, что эти показатели зависят от стадии развития опухоли. Для поздних стадий рака желудка характерны более высокие показатели ФРЭС и NO [64]. Известно, что ФРЭС играет важную роль в процессах роста и прогрессии злокачественных опухолей. В свою очередь NO участвует в реализации митогенетических эффектов ФРЭС на ангиогенез.

На модели спонтанно метастазирующей клеточной линии C3L5 аденокарциномы молочной железы мышей также показано, что NO – ключевой медиатор ангиогенеза в опухоли, а противоопухолевые эффекты *L-NAME* опосредованы, во всяком случае частично, угнетением опухолевого ангиогенеза [79]. Клетки этой линии экспрессируют высокий уровень *eNOS* *in vivo* и *in vitro*, как в первичных, так и в метастатических опухолях. Под влиянием *INF- $\gamma$*  и *LPS* ими экспрессируется также *iNOS*. *eNOS* активирует инвазию опухолевых клеток, угнетая мРНК экспрессию опухолевых ингибиторов металлопротеиназ (*TIMP2* и *TIMP3*) и усиливая экспрессию мРНК для металлопротеиназы матрикса (MMP-2), т.е. нарушая баланс между металлопротеиназами и их ингибиторами [118].

Экспрессия *iNOS* в различных линиях T-клеток, индуцированных вирусом HTLV-I (вирус T-клеточной лейкемии человека тип I), связана с вирусным трансактиватором Tax, что позволяет судить о вовлечении экспрессии *iNOS* в патогенез HTLV-I-ассоциированных болезней [107]. Ингибитор *NOS* (*L-NMMA*) тормозит рост и индуцирует апоптоз T-клеток, инфицированных вирусом HTLV-I, а также опухолевых клеток больных T-

клеточной лейкемией взрослых [127]. В другой работе показано, что NO угнетает *TNF- $\alpha$* -медируемый апоптоз посредством нарушения активации каспаз, торможения активных каспаз и вызывая дисфункцию митохондрий в гепатоцитах [93].

Заслуживает внимания вопрос о зависимости экспрессии изоформ *NOS* от стадии развития опухоли и степени дифференциации ее клеток. Иммуногистохимическое исследование *NOS* в астроцитарных опухолях мозга свидетельствует о прямой корреляции интенсивности реакции во многих клетках опухоли со степенью анаплазии [128]. Если, в целом, в опухолевой ткани желудка человека обнаруживается усиление активности *NOS* на 70% по сравнению с нормальной тканью, то плохо дифференцированные аденокарциномы экспрессируют больше *NOS*, чем хорошо и умеренно дифференцированные опухоли. Кроме того, установлен высокий уровень экспрессии *iNOS* в клетках железистого эпителия, где *eNOS* была снижена. Экспрессия *eNOS* была высокой только в местах скопления пролиферирующих капилляров [89]. В другом исследовании не обнаружено количественных различий между экспрессией *eNOS* в нормальной слизистой желудка и в слизистой желудка при раке, причем при инвазивных формах рака экспрессия *eNOS* была ниже. *iNOS*, не индуцируемая ни *TNF- $\alpha$* , ни *IL-6*, экспрессировалась только в метастатических формах рака желудка, следовательно, можно заключить, что *iNOS* (но не *eNOS*) принимает участие в метастазировании рака желудка [62]. Иммуногистохимическое изучение взаимоотношений между экспрессией *eNOS* в опухолевых сосудах и степенью малигнизации супратенториальных астроцитарных опухолей показало повышенную экспрессию *eNOS* в сосудах опухолей с более высоким потенциалом пролиферации и малигнизации [78].  $Ca^{2+}$ -зависимая нейрональная изоформа *NOS* – *nNOS* экспрессируется не только нейронами, но и культивируемыми нормальными меланоцитами и клетками злокачественной меланомы, причем на ранних стадиях злокачественной меланомы *nNOS* экспрессировалась гораздо чаще, чем на стадиях метастатической меланомы [45]. Еще один возможный механизм канцерогенного действия оксида азота связан с его влиянием на дифференцировку клеток. Выявлено, что NO ингибирует дифференцировку человеческих K562 лейкемических клеток (донор NO – нитропруссид натрия), вызванную противоопухолевыми препаратами (акларубидин, доксорубидин, масляная кислота) [58].

В нашей лаборатории показано увеличение концентрации нитритов в плазме крови у женщин с опухолями шейки и тела матки. Причем оперативное лечение и лучевая терапия вызывали снижение концентрации этих соединений в крови. Это позволило предположить, что повышение

концентрации нитритов в плазме крови является следствием гиперпродукции NO опухолевыми клетками, а также их микроокружением, в особенности активированными макрофагами и нейтрофилами. В связи с этими нашими данными, свидетельствующими о повышении нитритов в плазме крови у женщин с опухолями шейки и тела матки, мы обратили внимание на концепцию цикла оксида азота [34–39], в которой особое внимание уделяется механизмам превращения нитритов в NO и особенно следствиям, вытекающим из этой концепции. Кроме того, представляли особый интерес данные, полученные А.П. Ильницким и соавторами, в которых было обнаружено модифицирующее действие нитритов на легочный бластомогенез и вирусный лейкозогенез [21, 75]. В этой же связи нас также заинтересовали результаты исследований, полученные И.В. Кондаковой и соавторами, в которых было изучено сочетанное влияние пероксидных радикалов и оксида азота, образующегося из нитритных ионов, на пролиферативную активность опухолевых клеток [23], а также влияние NO-генерирующих соединений, в том числе и нитритов, на гидролиз фосфолипидов опухолевых клеток [24]. Более детально эти данные будут обсуждены в следующем разделе, посвященном циклу NO и некоторым механизмам опухолевого роста.

### ЦИКЛ NO И НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Процессы, связанные с активацией образования оксида азота и комплексов NO с гемовым и негемовым железом (нитрозильных комплексов железа), были предметом интенсивного изучения исследователей еще в 60–80-х гг. XX в. [1–6, 33, 40–42, 44, 52, 53, 97, 100, 106, 138]. Интерес к этим комплексам особенно возрос после того, как было установлено, что образование их резко увеличивается при канцерогенезе [40–42, 52, 53]. Именно благодаря вниманию ученых к этой проблеме Я.И. Ажица, Л.П. Каюшин и Е.И. Никишкин смогли зарегистрировать в Госкомитете по делам открытий и изобретений СССР обнаруженное ими явление возникновения парамагнитных комплексов железа в клетках живых организмов при гипоксии как научное открытие за № 148 с приоритетом от 25 сентября 1965 г. [1–6]. Формула открытия: “Экспериментально установлено неизвестное ранее явление возникновения в клетках живых организмов при гипоксии парамагнитных нитрозильных комплексов железа со средним значением фактора спектроскопического расщепления электронного парамагнитного резонанса, равного 2.03, связанное с образованием комплексов железа (гемового и негемового), азотистых соединений и различных групп белка, свидетельствующее, в частности, о том, что гипоксия

тканей при метгемоглобинемии обуславливается не только блокадой гемоглобина, но и блокадой дыхательных железосодержащих ферментов ткани”. Эти парамагнитные нитрозильные комплексы железа (комплексы NO с гемовым и негемовым железом) авторы открытия обнаружили после введения крысам нитрита натрия. Однако многие вопросы, относящиеся к механизмам образования NO и комплексов NO с гемовым и негемовым железом, как в норме, так и в условиях патологии оставались на протяжении длительного времени без ответа [1, 2, 6, 40–42, 44]. Тогда неясно было, как нитриты превращаются в NO, какие ферментные или низкомолекулярные неферментные системы участвуют в этом процессе и какую роль могут играть процессы образования NO из нитритов. Однако было ясно, что нитриты могут превращаться в NO в живых организмах и такие же реакции активно протекают при опухолевом росте, гипоксии и патологических процессах, характеризующихся дефицитом кислорода в тканях живых организмов. Между тем исследователи давно обратили внимание, что кроме гипоксии и анаэробно-важным фактором для образования нитрозильных комплексов железа является присутствие в клетках и тканях достаточного количества самих нитратов и нитритов [1–5, 40]. Это указывало на необходимость более глубокого исследования механизмов, связанных с превращением нитросоединений (нитратов или нитритов) в NO. Многочисленные данные литературы, появившиеся после открытия механизмов синтеза NO из L-аргинина, не сняли вопросы, стоящие перед исследователями еще с 60–80-х гг., поскольку синтез NO при участии NO-синтаз является зависимым от *наличия кислорода*, а активация образования NO при опухолевом росте, как правило, осуществляется в условиях *дефицита кислорода* [36, 39, 40]. Поэтому совершенно было непонятно, каким образом может усиливаться образование NO при участии NO-синтаз из L-аргинина при опухолевом росте в условиях недостатка кислорода. В связи с тем, что наш обзор посвящен анализу биологической активности NO в механизмах опухолевого роста, который, как указывалось выше, как правило, протекает на фоне недостатка кислорода, представляется целесообразным более подробно рассмотреть некоторые механизмы, способные включаться в клетки опухолей. Эти механизмы представляют, с нашей точки зрения, особый интерес, поскольку именно в них просматриваются некоторые закономерности, которые до сих пор не учтены специалистами, изучающими проблему опухолевого роста.

Направление исследований, начало которых было положено в работах Я.И. Ажицы, Л.П. Каюшина и Е.И. Никишкина, было продолжено в работах [34–39]. Анализируя данные литературы и результаты собственных исследований, В.П. Ре-

утов предложил и обосновал концепцию цикла оксида азота, которая может быть успешно применена для понимания ряда механизмов участия NO и продуктов его превращения (нитритов и нитратов) в модуляции опухолевого роста. Эта концепция предполагает, что образование NO в организме млекопитающих поддерживается не только при участии NO-синтаз, которые синтезируют оксид азота из *L*-аргинина, но также осуществляется при участии нитритредуктазных систем, восстанавливающих ионы  $\text{NO}_2^-$  в NO [34–38]. Установлено, что нитритредуктазные системы включают гемсодержащие белки, которые в обычных физиологических условиях либо связывают и переносят сам кислород (миоглобин, гемоглобин), либо на кислород переносят электроны (цитохромоксидаза, цитохром *P-450*) [2, 5, 6, 34–38, 54, 113, 114, 124–126]. Было также показано, что активность нитритредуктазных систем особенно возрастает при гипоксических состояниях [2, 5, 6, 34–38], которые, как известно, характерны для опухолевого роста. Естественно возникает вопрос: почему при гипоксии повышается активность систем, способных восстанавливать ионы  $\text{NO}_2^-$  в NO?

Как уже указывалось выше, при гипоксических условиях гемсодержащие белки (гемоглобин, миоглобин, цитохромоксидаза и цитохром *P-450*) находятся преимущественно в дезокси-состояниях. В этих состояниях, железо гема не взаимодействует с кислородом и поэтому может легко переносить электроны на другие акцепторы. Наиболее близкими по своим физико-химическим свойствам к кислороду акцепторами электронов являются ионы  $\text{NO}_2^-$  [34–38]. Таким образом, при патологических состояниях, сопровождающихся гипоксиями различного генеза, появляются новые возможности для синтеза NO из ионов  $\text{NO}_2^-$  [5, 6, 34–36, 54, 113, 114, 124–126]. Активность нитритредуктазных систем, связанных с системами восстановления гемсодержащих белков (гемоглобина и миоглобина), а также с электронно-транспортными цепями митохондрий и эндоплазматического ретикула на 2–3 порядка выше, чем активность NO-синтазных систем [39]. И это не удивительно, поскольку митохондрии и эндоплазматический ретикулум присутствуют в каждой клетке, а количество клеток, обладающих *NADPH*-диафоразной/NO-синтазной активностью, составляет единицы процентов от общего количества клеток. Поэтому в условиях гипоксии образование NO осуществляется преимущественно не из *L*-аргинина, а при участии гемсодержащих белков, которые начинают восстанавливать нитриты в NO.

Концепция цикла оксида азота и следствия, вытекающие из этой концепции, проверялись на различных моделях, в том числе и на моделях легочного бластомогенеза и вирусного лейкозогенеза [21–24]. А.П. Ильницкий и соавторы исследовали модифицирующее действие нитритов как NO-генерирующих соединений на легочный бластомогенез и вирусный лейкозогенез у мышей [21, 75]. Показано, что эти NO-генерирующие соединения обладают потенцирующим действием на бластомогенез. Под влиянием антиоксиданта эмоксипина, обладающего высокой антирадикальной активностью, наблюдалось статистически значимое снижение модифицирующего эффекта NO-генерирующих соединений. В связи с тем что эмоксипин благодаря своей высокой антирадикальной активности может участвовать в ингибировании свободнорадикальных процессов, инициируемых NO и  $\text{NO}_2$ , авторы работ [21, 75] предполагают возможность использования этого и других антиоксидантов для профилактики онкологических заболеваний.

Интересные данные по стимуляции и ингибированию пролиферации опухолевых клеток (штаммы асцитной карциномы Эрлиха) под действием соответственно низких и высоких концентраций пероксидных радикалов и NO-генерирующих соединений получены И.В. Кондаковой и соавторами в работе [24]. Показано, что NO при малых концентрациях не только не усиливает токсичность свободнорадикальных агентов, но и защищает опухолевые клетки от повреждающих воздействий активных форм кислорода. Однако при высоких концентрациях нитритов и других NO-генерирующих соединений наблюдается усиление токсического их действия. Эти данные хорошо согласуются как с концепцией цикла оксида азота [34–39], так и с теми выводами, которые вытекают из принципа цикличности [38], поскольку свидетельствуют, что нарушения в регуляции синтеза азота и активных форм кислорода могут быть далеко не безразличны для пролиферативной активности опухолевых клеток [24]. В связи с тем что в регуляции активных форм кислорода и оксида азота могут принимать участие циклические механизмы [38, 39], становится ясным их важная роль в жизнедеятельности не только нормальных, но и в таких патологически измененных клетках, какими являются опухолевые. Кроме того, результаты, полученные в работе [24], хорошо согласуются с концепцией Селье и существующими представлениями, основанными на многочисленных данных литературы о том, что малые дозы токсических веществ (слабый химический стресс) оказывают стимулирующее действие, а высокие их дозы вызывают повреждающее действие, вплоть до гибели клеток.

В свете обсуждаемой проблемы о биологической активности оксида азота в механизмах опухолевого роста указанные выше данные представляют особый интерес, поскольку они указывают на один из возможных механизмов модифицирующего действия NO и NO-генерирующих соединений, включающих древнейшее нитратно-нитритное дыхание [34, 39]. В соответствии с концепцией В.П. Реутова, изложенной в работах [34–38], можно предположить, что опухолевые клетки в условиях гипоксии переходят на древнейший нитратно-нитритный тип дыхания и, как указывалось выше, начинают продуцировать повышенные концентрации NO не только из *L*-аргинина, но и из нитритов при участии гемсодержащих белков. Таким образом, эти гемсодержащие белки в условиях дефицита кислорода начинают выполнять нитритредуктазную функцию [34–39].

Кроме того, сам цикл оксида азота можно рассматривать как механизм регуляции содержания NO и продуктов его метаболизма. Поскольку нормальная работа регуляторных систем чрезвычайно важна для поддержания концентрации биологически активных веществ в пределах физиологической нормы, становится все более очевидным, что такую регуляцию могут обеспечить те циклы в живых организмах, которые ответственны за гомеостаз. Одними из основных циклов, ответственных за поддержание содержания NO и активных форм кислорода в пределах физиологической нормы, являются циклы NO и супероксидного анион-радикала [38, 39]. Не исключено, что именно нарушения в работе таких циклических механизмов, обеспечивающих нормальную регуляцию содержания NO и активных форм кислорода, могут вести к тяжелым патологиям, в том числе и к опухолевому росту. Действительно, при значительном повышении содержания NO и активных форм кислорода ферменты, входящие в циклы оксида азота и супероксида, не в состоянии обеспечивать регуляцию содержания этими весьма активными соединениями. В этих условиях появляется возможность для взаимодействия NO с супероксидными анион-радикалами и образования пероксинитритов, которые могут распадаться с высвобождением высокорективных свободных радикалов NO<sub>2</sub> и OH-радикалов [60]. Эти радикалы легко проникают через мембраны клеток и субклеточных структур, в том числе и ядерные мембраны, и могут воздействовать на генетический аппарат клетки, влияя на экспрессию генов и модифицировать основания ДНК клеток [80]. Таким образом, представления, развиваемые в работах [38, 39], позволяют понять некоторые механизмы, ведущие к патологии, вызванной свободными радикалами азота (или NO) и кислорода (или активными формами кислорода – O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH-радикалами).

В заключение хотелось бы еще раз подчеркнуть, что данные, имеющиеся в настоящее время [21–24, 75], свидетельствуют о том, что в основе модифицирующего на опухолевые клетки действия NO-генерирующих соединений и нитритов, способных высвобождать NO, могут быть: 1) гипоксические состояния; 2) усиленная продукция NO и продуктов его метаболизма; а также 3) нарушения в механизмах циклической регуляции содержания NO, при которых появляется возможность для образования высокорективных свободных радикалов NO<sub>2</sub> и OH-радикалов, способных влиять на генетический аппарат клеток, а также на мембраны клеток и субклеточных структур [38, 80].

Интересно отметить, что за последнее десятилетие кроме наших работ [12–15, 18, 19] были опубликованы работы зарубежных авторов [102, 139], которые разделяют представления о цикле оксида азота и механизмах его активации при гипоксии, впервые опубликованные в работах [34–39]. Результаты этих и других исследований [21, 22, 24, 54, 75, 106, 113, 114, 139, 140] могут указывать, что реакции превращения нитритов в NO заслуживают не меньшего внимания среди биологов и медиков, чем NO-синтазные, где синтез осуществляется из *L*-аргинина. Особое внимание на реакции превращения нитритов в NO, как нам представляется, следовало бы обратить онкологам и специалистам, работающим в области канцерогенеза. Это в значительной степени могло бы дополнить те данные, которые были получены при исследовании влияния нитратов, нитритов и N-нитрозаминов на механизмы канцерогенеза без учета роли реакции превращения нитритов в NO в этих процессах. Кроме нитритредуктазных реакций, участвующих в синтезе NO из нитритов, нельзя исключить и возможность участия ферментативных реакций, в ходе которых ионы NO<sub>2</sub><sup>-</sup> протонируются в тех органах и тканях, где возможно достаточно сильное подкисление и образование азотистой кислоты HNO<sub>2</sub>, которая распадается с высвобождением NO [140]. Такие условия существуют в желудочно-кишечном тракте, в миокарде при гипоксии [140]. Однако маловероятно, чтобы такие реакции могли активно протекать в крови, буферные свойства которой не позволяют сдвигать *pH* до низких значений, при которых могут эффективно протекать реакции протонирования нитритных ионов. Тем не менее, и эти данные [140] также указывают на необходимость более внимательного рассмотрения механизмов образования NO из нитритных ионов и анализа следствий, вытекающих из этих реакций.



## ДВОЙСТВЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ NO

Несмотря на все возрастающий поток информации о значении биологической активности NO для канцерогенеза понимание этого вопроса все еще недостаточно. При исследовании цитотоксического и генотоксического влияния различных доноров NO на клетки лимфомы мышей было показано, что цитотоксичность NO и его окислительных метаболитов превышает их генотоксический потенциал [130].

Анализ результатов исследований экспрессии изоформ NOS на разных стадиях канцерогенеза показал, что если в одних случаях активность *iNOS* возрастает при инвазивных формах рака, то в других экспрессия этого фермента снижается по мере прогрессии опухоли. Так, иммуногистохимическое исследование *iNOS* в раковых клетках молочной железы человека показало, что опухоли с высокой активностью *iNOS* характеризуются замедленной пролиферацией, что коррелирует с наблюдениями *in vitro* о торможении пролиферации опухолевых клеток молочной железы человека MCF-7 оксидом азота, индуцированным цитокиновой экспрессией *iNOS* [119]. Аналогичные результаты получены в работе [135]. В другом исследовании продемонстрировано, что между экспрессией *iNOS* и способностью клонированных клеток мышинной меланомы метастазировать, найдена обратная корреляция. В линии клеток, способных к метастазированию, обнаружен селективный блок в транскрипции *iNOS* [67].

В отношении роли *eNOS* в канцерогенезе также не существует однозначных данных. Так, ретроспективное изучение *eNOS* у пациентов с первично инвазивной формой рака молочной железы показало, что высокая плотность *eNOS*-положительных микрососудов в нормальной ткани, окружающей опухоль, коррелировала со значительно лучшей выживаемостью пациентов. Это позволяет считать иммунореактивную *eNOS* в микрососудах независимым прогностическим признаком у пациентов с раком молочной железы и отражает механизм эндотелиальной защиты против инвазии опухолевых клеток [109]. Эти данные согласуются с результатами, полученными в другой работе, которые показали, что в эстроген-независимых клетках рака молочной железы не экспрессируется *iNOS* и менее 5% клеток экспрессируют *eNOS*, что, вероятно, ассоциируется с опухолевой прогрессией [99]. Кроме того, *eNOS* экспрессируются NK-клетками человека, и NO защищает их от апоптоза, вызванного активацией этих клеток, путем снижения экспрессии TNF- $\alpha$ , что позволяет поддерживать их литическую активность [66].

Таким образом, биологическое значение оксида азота при канцерогенезе зависит от соотноше-

ния свободнорадикальной активности NO, вызывающей повреждение клеток, мутагенез, активацию ангиогенеза и увеличение проницаемости сосудов опухоли, а также цитотоксического потенциала NO по отношению к опухолевым клеткам. Хорошо известно, что опухолевые клетки индуцируют функциональные изменения в системе антибластомной резистентности организма, повышая активность макрофагов, NK-клеток, эндотелиоцитов. Под влиянием цитокинов, синтезируемых активными макрофагами, клетки могут получать стимулы как связанные с экспрессией *iNOS*, так и с гуанозинтрифосфат (GTP)-циклогидролазой-I, индуцирующей продукцию 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (BH4), который ответствен за выживаемость клеток. Следовательно, в зависимости от соотношения макрофагальных стимулов для *iNOS* или GTP-циклогидролазы-I может преобладать апоптотический эффект NO или усиление пролиферативного потенциала [103]. Кроме того, эффекты активированных макрофагов, как уже говорилось, зависят также от их собственной устойчивости к NO-медирированному апоптозу, которая определяется сAMP [88].

С другой стороны, неоплазии значительно ограничивают защитную реакцию организма-опухоленосителя [51, 74, 105, 106]. Повышение синтеза *PgE<sub>2</sub>* под влиянием NO может не только повысить проницаемость сосудов опухолей и усилить приток питательных веществ, но и подавлять цитотоксическую активность макрофагов, несмотря на то что увеличенная продукция простагландинов отражает способность NO активировать локальные стресс-лимитирующие системы. Под влиянием оксида азота ингибируется также пролиферация T-лимфоцитов [8]. В другой работе показано, что NO угнетает пролиферацию, снижает экспрессию *Bcl-2* и подвергает апоптозу нормальные и опухолевые T-лимфоциты человека. Кроме того, NO управляет ответом T-клеток на IFN- $\gamma$ , моделируя его действие таким образом, что IFN- $\gamma$  может либо способствовать пролиферации клеток, либо индуцировать апоптоз [47]. Торможение макрофагами противоопухолевого ответа цитотоксических T-лимфоцитов, опосредованное NO, является побочным эффектом активированных макрофагов. Такая супрессорная NO-медирированная деятельность макрофагов – это важный иммунорегулирующий в отношении цитотоксических T-лимфоцитов элемент *in vivo* [101].

Представляет интерес исследование индукции гемоксигеназы-1 (HO-1) и синтеза NO в процессе опухолевого роста в эксперименте на солидных опухолях у крыс (АН 136В гепатома), в котором обнаружено, что *iNOS* локализовались в макрофагах моноцитарного происхождения, инфильтрировавших интерстиций солидных опухолей, но не в самих опухолевых клетках [62]. HO-1, наобо-

рот, была найдена только в опухолевых клетках. Опухолевый рост умеренно подавлялся ингибитором *NOS* (*L-NAME*). Донор NO *S*-нитрозо-*N*-ацетилпенициламин (*SNAP*) значительно повышал экспрессию *HO-1*, а *L-NAME* тормозил её. Причем уровень *HO-1* был одинаковым в опухолях, подвергшихся действию ингибитора *NOS* и в опухолях, где ингибитор *NOS* не применялся. И, наконец, NO ингибитор – цинк протопорфирин IX, введенный интраартериально угнетал опухолевый рост. Авторы делают вывод, что экспрессия *HO-1* обуславливает устойчивость опухолевых клеток к NO-медирированной цитотоксичности [62].

Другой аспект двойственности биологических эффектов оксида азота – его способность к повышенной экспрессии как факторов, способствующих апоптозу (*p53*, *Bax*, *Fas*, *Fas-L*), так и ингибирующих апоптоз (*Bcl-2*), которая была выявлена иммуногистохимически в различных видах глиом. Апоптоз усиливался с повышением злокачественности во всех видах глиом. При этом отмечалась высокая экспрессия *eNOS* во всех разновидностях глиом, тогда как *iNOS* – только в 50% опухолей [134].

Таким образом, усиление цитотоксического потенциала NO с повышением злокачественности опухоли может рассматриваться как проявление функциональной активности защитной антибластомной системы организма.

Биологическая активность оксида азота (про- и противоопухолевая) зависит также от его концентрации. Низкие дозы NO могут стимулировать пролиферацию клеток, тогда как высокие концентрации оксида азота вызывают цитотоксический эффект [23, 108]. В работе [108] показано, что и нормальные клетки эпителия мочевого пузыря, и опухолевые клетки линии T24 и MBT-2 демонстрируют  $Ca^{2+}$ -зависимую активность *NOS* в базальных условиях. Раковые клетки экспрессируют еще и  $Ca^{2+}$ -независимую *NOS* в отличие от нормальных клеток. Под влиянием цитокинов и в нормальных, и в опухолевых клетках усиливалась активность  $Ca^{2+}$ -независимой *NOS*. При этом *L*-аргинин стимулировал пролиферацию, и этот эффект устранялся ингибитором синтеза NO  $N^G$ -нитро-*L*-аргинином (*L-NNA*), а цитокины тормозили рост клеток, и этот эффект лишь частично купировался *L-NNA*. Авторы полагают, что эндогенная активность конститутивноэкспрессируемых форм *NOS* в нестимулированных клетках способствует пролиферации клеток, тогда как продукция NO, индуцированная *iNOS* под влиянием цитокинов, тормозит рост клеток [108]. В другом исследовании выявлено, что низкие дозы NO предотвращают гибель гепатоцитов крысы под влиянием *t*-бутилгидропероксида, который вызывает их окислительный киллинг, тогда как даль-

нейшее увеличение дозы NO усиливает их окислительную гибель. Авторы предполагают, что механизмы этих двух эффектов различные [81]. Торможение *eNOS* в клетках *MCF-7* рака молочной железы человека усиливало апоптоз опухолевых клеток, хотя низкие концентрации донора NO (нитропрусида Na) тормозили апоптоз, а высокие концентрации стимулировали это явление *MCF-7* клеток. Этот эффект авторы объясняют тем, что доноры NO повышают уровень *p53* в *MCF-7* клетках, который, в свою очередь, снижает транскрипцию *eNOS* промотора [109]. В работе [43] показано, что высокие концентрации оксида азота обладают противоопухолевым эффектом, хотя длительная продукция повышенных, но еще недостаточно высоких для индукции апоптоза концентраций NO усиливает рост опухоли. Таким образом, с одной стороны, достаточно продолжительная продукция NO опухолевыми клетками может стимулировать канцерогенез, но с другой – временная гиперпродукция оксида азота иммунокомпетентными клетками ингибирует синтез ДНК и индуцирует апоптоз опухолевых клеток. В другом исследовании [137] также продемонстрировано, что NO вовлекается как в регрессию, так и в прогрессию опухолей благодаря его продукции и в опухолевых клетках, и в инфильтрирующих опухоль лейкоцитах. Ионизирующая радиация вызывает регрессию опухоли и может увеличивать продукцию NO макрофагами *in vitro*. Облучение 60 Гр увеличивает в 4 раза продукцию NO в лейкоцитах облученного опухоленосителя по сравнению с его опухолевыми клетками и с опухолевыми клетками необлученных мышей. В течение 10–14 дней после имплантации мышам опухоли уровень  $NO_2^-/NO_3^-$  в плазме крови повышается как у облученных животных, так и у необлученных в равной степени, достигая уровня большего, чем у мышей, которым не имплантировали опухоли. Хотя *in vitro* продукция NO в макрофагах увеличивается и под влиянием дозы радиации 1–10 Гр, более высокие дозы, требуемые для макрофагов, инфильтрирующих опухоль *in vivo*, говорят о снижении активности опухолевых макрофагов.

Таким образом, анализ результатов экспериментальных исследований показал, что первичное защитное действие повышенной продукции NO при опухолевом росте направлено на предупреждение чрезмерной стресс-реакции и является показателем функциональной активности защитной антибластомной системы организма. В то же время длительное воздействие оксида азота на клетки опухолей способно вызывать повреждение ДНК и индуцировать мутагенез. Кроме того, повышение проницаемости сосудов и стимулирование ангиогенеза способствует дальнейшему росту опухоли. Цитотоксический потенциал NO может также снижаться и благодаря наличию ме-

ханизмов защиты от цитотоксических эффектов NO в условиях его гиперпродукции, а именно:

1) экспрессия гена *Bcl-2*, контролирующего продукцию соответствующего антиапоптотического белка;

2) индукция защитных белков теплового шока и гемоксигеназы;

3) цитотоксическая активность NO в отношении клеток иммунокомпетентной системы – макрофагов, NK-клеток и T-лимфоцитов;

4) экспрессия GTP-циклогидролазы-1 и, следовательно, гиперпродукция ВН4, усиливающего выживаемость клеток;

5) торможение NO-медиированного апоптоза одновременной генерацией супероксидного радикала, выделяемого активированными макрофагами помимо NO;

6) защитный эффект длительной продукции повышенных, но недостаточных для индукции апоптоза концентраций NO.

## NO И ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ

Приступая к изучению терапевтической тактики в отношении модуляции экспрессии изоформ NOS, мы прежде всего проанализировали работы, в которых показывается роль NO как посредника различных противоопухолевых воздействий.

В экспериментах на мышах, которым имплантировали клетки карциномы поджелудочной железы, был изучен эффект иринотекана (*CPT-11*) в сочетании с иммуномодулирующим препаратом *JBT 3002* (*N*-ацилированный дериват пси-амино-С1-С3-алканесульфоновой кислоты), который выражался в угнетении роста карциномы панкреатической железы и торможении метастазирования. При этом количество апоптотических клеток и уровень экспрессии *iNOS* прямо коррелировал с терапевтическим эффектом. Кроме того, инкубация опухолевых клеток с макрофагами, активированными *JBT 3002* и *IFN-γ* *in vitro*, вызывала значительный лизис опухолевых клеток, который блокировался ингибитором *iNOS*. Таким образом, был сделан вывод, что противоопухолевый эффект воздействий иринотекана в сочетании с иммуномодулирующим препаратом *JBT 3002* реализуется через активацию *iNOS* в инфилтрирующих опухоль макрофагах [55].

При изучении эффекта галоперидола на развитие карциномы Эрлиха у животных было выявлено, что галоперидол оказывает ингибиторный эффект на развитие этой опухоли, а также установлено, что он реализуется благодаря увеличению высвобождения NO из перитонеальных макрофагов [85].

В работе [111] показано, что эффект противоопухолевого препарата паклитаксела реализуется через NO. Этот эффект выражается в коррекции иммунной дисфункции, вызванной опухолью и, в частности, проявляется в увеличении продукции *IL-12* макрофагами опухоленосителя [111].

Противоопухолевый эффект *IL-12* в отношении рака простаты реализуется в большой степени через активацию NOS в макрофагах. Такой эффект проявляется в значительном угнетении роста (более 50% снижения веса опухоли) и легочного метастазирования, а также увеличении времени выживания мышей с опухолями предстательной железы [112].

Обнаружено, что способность ресвератрола – фитополифенола, полученного из семян и кожуры винограда и содержащегося в красном вине, предупреждать развитие опухоли и снижать риск сердечно-сосудистой патологии у человека связана с угнетением клеточного деления, повышенной экспрессией гена супрессора опухолей *p53* и ингибитора циклин-зависимой киназы *p21*, а также индукцией *iNOS* и усилением продукции NO [73]. Однако в другой работе представлены противоречивые результаты, свидетельствующие о том, что ресвератрол угнетает продукцию NO и снижает уровень *iNOS* в цитозоле; ингибирует активацию ядерного фактора карра *B (NFκB)*, индуцированную *LPS*; действует в качестве антиоксиданта, что позволяет регулировать баланс между реактивными разновидностями кислорода и антиоксидантами [95]. Именно этими механизмами авторы объясняют способность ресвератрола блокировать канцерогенез. Один из противоопухолевых эффектов зеленого чая также реализуется через угнетение активности *iNOS*. Показано, что потребление зеленого чая снижает риск развития некоторых видов опухолей: рака желудка, пищевода, легких. Такой эффект связывают с фитополифенолами, которые содержатся в зеленом чае и, в частности, с эпигалокатехином-3-галатом (*EGCG*), который угнетает внеклеточные сигналы и пролиферацию клеток, например, посредством связывания рецепторов эпидермального фактора роста клеток эпидермоидной карциномы человека *A431*; блокирует индукцию *iNOS* путем снижения активности фактора транскрипции *NFκB*, индуцированной *LPS* в макрофагах; тормозит активность циклинзависимых киназ 2 и 4 [94]. Таким образом, обобщение данных литературы показывает, что терапевтическая тактика, направленная на модуляцию содержания NO в организме-опухоленосителя и в самой опухолевой ткани, может быть целесообразна, если она проводится с учетом тех обстоятельств, которые положительно влияют на ход самой терапии.

Также представляют интерес возможности применения модуляторов содержания NO в каче-

стве адъювантов радио- и химиотерапии. Многие доноры NO (*GSNO*, *SNAP*, *DEA/NO*) сенсibilизируют клетки, находящиеся в гипоксических условиях, к ионизирующей радиации по механизму, аналогичному действию O<sub>2</sub>, но с более глубоким проникновением в ткани, чем O<sub>2</sub>. Однако другие доноры NO (3-морфолиносиднонимин (*SIN-1*) и нитропруссид натрия) не обладают подобным действием [62]. Кроме того, обнаружено, что ионизирующая радиация увеличивает продукцию NO макрофагами в связи с усилением аутокринной секреции *TNF-α* в макрофагах [137]. Другими авторами также показано, что NO-генерирующие агенты помимо торможения роста культивируемых клеток глиомы крыс и человека повышают радиочувствительность этих клеток, что позволяет предложить новый подход к терапии злокачественной глиомы [92]. Существуют данные [30] о повышении радиорезистентности опухоли SCCVII/Na мышей в условиях подавления активности *NOS* различными ингибиторами, а также увеличения радиочувствительности опухолевых клеток при обработке мышей-опухоленосителей *SIN-1*.

NO-модулирующие агенты, как показано в работе [8], способствуют защите нормальных тканей от радиации, причем радиопротекторное действие обнаружено как у генератора NO (*DEA/NO*), так и у ингибитора синтеза NO (*L-NNA*).

Продолжаются исследования возможностей использования доноров NO для повышения эффективности химиотерапии. Введение NO в состав *DEA/NO* или одноразовая инъекция собственно NO повышают цитотоксичность цисплатина и мелфалана [8]. Авторы делают вывод, что сенсibilизация, опосредованная NO, очевидно, вызывается ингибированием наиболее важных белков репарации поврежденной ДНК – алкилтрансферазы, формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы и лигазы. Следовательно, токсичность ряда химиотерапевтических агентов, индуцирующих определенные повреждения ДНК, может быть усилена NO.

Ингибитор *NOS* (*L-NNA*) потенцирует противоопухолевое действие фотодинамической терапии, связанное с уменьшением оксигенации и перфузии фибросаркомы мышей СЗН, индуцированной ионизирующей радиацией. При этом применение одного *L-NNA* обнаруживало лишь незначительную тенденцию к снижению *pO<sub>2</sub>* опухоли и перфузии [71].

И еще один аспект терапевтического применения NO связан с изучением возможностей повышения цитотоксического потенциала оксида азота. Имеются данные об увеличении цитотоксичности NO-высвобождающих агентов при повышении сродства к рецепторам, экспрессированным на опухолевых клетках, что позволяет

повысить избирательность поражения опухолевых клеток. Так, учитывая чрезмерную экспрессию транспортных белков глюкозы на опухолевых клетках, *SNAP* конъюгировали с глюкозой (*2-gluSNAP*), что приводило к резкому усилению лизиса клеток карциномы яичников человека [56].

Таким образом, представленные выше данные позволяют определить некоторые возможности дальнейшего повышения эффективности применения NO-модулирующих агентов с лечебной целью:

- 1) усиление адъювантных эффектов NO в радио-, химио- и фотодинамической терапии;
- 2) усиление цитотоксического потенциала NO;
- 3) предупреждение формирования резистентности опухолевых клеток к NO-медицированному апоптозу;
- 4) защита иммунокомпетентных клеток от цитотоксического действия NO;
- 5) управление метаболизмом NO с целью предупреждения проканцерогенных эффектов NO.

Обобщение данных литературы [1–8, 16, 17, 20–22, 24, 25, 40] и результатов исследований, полученных в нашей лаборатории [19], позволяет сделать вывод, что образование NO в ходе NO-синтазных или нитритредуктазных реакций [36, 39], является важным регуляторным, а иногда и патогенетическим звеном в механизмах канцерогенеза [43, 75]. Можно также ожидать, что более детальное изучение этих механизмов позволит использовать направленную модуляцию двойственных эффектов оксида азота в качестве одного из перспективных способов в лечении опухолей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ажипа Я.И. Электронно-парамагнитный резонанс в медико-биологических исследованиях. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Биофизика. 1979. Т. 12. 188 с.
2. Ажипа Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса. М.: Наука, 1983. 528 с.
3. Ажипа Я.И., Каюшин Л.П., Никишкин Е.И. Электронный парамагнитный резонанс тканей животных при некоторых видах тканевой гипоксии // Биофизика. 1966. Т. 11. Вып. 4. С. 710–713.
4. Ажипа Я.И., Каюшин Л.П., Никишкин Е.И. Спектры электронного парамагнитного резонанса железосодержащих комплексов, возникающих в тканях животных при некоторых видах гипоксии // Биофизика. 1969. Т. 14. Вып. 5. С. 852–856.
5. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л. П. Экологические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами // Физиология человека. 1990. Т. 20. № 3. С.165–174.
6. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П., Никишкин Е.И. Конформационные изомеры комплексов

- сов гемоглобина с окисью азота, возникающие в крови при действии нитрита натрия // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1983. № 2. С. 240–250.
7. Брюне Б., Сандау К., Кнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути (обзор) // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 7. С. 966–975.
  8. Винк Д.А., Водовоз Й., Кук Дж.А. и др. Значение химических свойств оксида азота для лечения онкологических заболеваний (обзор) // Там же. С. 948–957.
  9. Гоженко А.И., Бабий В.П., Долматов С.И., Котюжинская С.Г., Зубкова Ю.В. Состояние и механизмы формирования неспецифической защиты слизистой оболочки полости рта у здоровых людей // Медична хімія. 2002. Т. 4. № 2. С. 50–52.
  10. Гоженко А.И., Бабий В.П., Котюжинская С.Г., Николаевская И.В. Роль оксида азота в механизмах воспаления // Экспериментальная и клиническая медицина. 2001. № 3. С. 13–17.
  11. Гоженко А.И., Котюжинская С.Г., Котюжинский А.И. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляции и агрегатного состояния крови // Укр. мед. альманах. 2000. Т. 3. № 1. С. 197–200.
  12. Гоженко А.И., Котюжинская С.Г., Котюжинский А.И. Влияние острой нитритной интоксикации на гемостаз // Медична хімія. 2000. Т. 2. № 4. С. 51–53.
  13. Гоженко А.И., Насибуллин Б.А., Кохно Ю.С. Активность NO-синтазы слизистой оболочки желудка при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Вестн. Российской академии мед. наук. 2000. № 7. С. 8–11.
  14. Гоженко А.И., Николаевская И.В., Котюжинская С.Г., Бабий В.П. Оксид азота и иммунная система организма // Медична хімія. 2001. Т. 3. № 3. С. 5–9.
  15. Гоженко А.И., Николаевская И.В., Федорук А.С., Котюжинская С.Г., Гоженко Е.А. Образование нитритов и нитратов нейтрофилами человека в процессе фагоцитоза // Вест. морск. мед. 1998. № 4. С. 91–92.
  16. Горен А.К.Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота (обзор) // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 7. С. 870–880.
  17. Жумабаева Т.Т. Влияние экзогенного оксида азота на железосодержащие белки тканей органов и крови животных и участие аскорбиновой кислоты в образовании эндогенного оксида азота // Дис. ... докт. биол. наук. М.: Ин-ут биохим. физики. 2001. 269 с.
  18. Запорожан В.Н., Гоженко А.И., Савицкий И.В. NO-зависимые механизмы стимуляции репродуктивной системы самцов. Одесса: Одесский медуниверситет, 2001. 122с.
  19. Запорожан В.Н., Гоженко А.И., Корнеенко Т.В., Макулькин Р.Ф., Дубинина В.Г. Роль эндогенного оксида азота в индукции опухолевого роста // Укр. журн. экстрем. мед. имени Г.О. Можяева. 2002. Т. 3. № 2. С. 77–83.
  20. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 30–34.
  21. Ильницкий А.П., Реутов В.П., Рыжова Н.И., Колпакова А.С., Дерягина В.П., Некрасова Е.А., Савлущинская Л.А., Травкин А.Г. Модифицирующее действие нитритов на легочный бластомогенез и вирусный лейкозогенез у мышей: возможная роль окиси и двуокиси азота // Вестн. РАМН. 2000. № 7. С. 30–34.
  22. Колпакова А.С. Модифицирующее действие нитритов на вирусный лейкозогенез у мышей (экспериментальные данные) // Дис. ... канд. мед. наук, М.: Онкологический научный центр РАМН, 1994. 81 с.
  23. Кондакова И.В., Загребельная Г.В., Реутов В.П. Влияние пероксидных радикалов и оксида азота на пролиферативную активность опухолевых клеток // Вести национальной академии наук Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2003. № 1. С. 78–82.
  24. Кондакова И.В., Чередова В.В., Реутов В.П. Влияние NO-генерирующих соединений на гидролиз фосфолипидов и перекисное окисление липидов опухолевых клеток // Второй съезд биохимического общества. Пушино: Пушкинский научный центр РАН, 1997. С. 324–325.
  25. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке (обзор) // Биохимия. 1998. Т. 3. Вып. 7. С. 1007–1019.
  26. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. 2000. Т. 65. № 4. С. 485–503.
  27. Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций // Иммунология. 2000. № 4. С. 9–20.
  28. Проскуряков С.Я., Коноплянников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Биология окиси азота // Успехи совр. биологии. 1999. Т. 119. № 4. С. 380–395.
  29. Проскуряков С.Я., Коноплянников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г., Цыб А.Ф. Оксид азота в неопластическом процессе // Вопр. онкологии. 2001. Т. 47. № 3. С. 257–269.
  30. Проскуряков С.Я., Коноплянников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г., Цыб А.Ф. Оксид азота и терапия новообразований // Российский онкол. журн. 2000. Т. 4. № 3. С. 41–45.
  31. Проскуряков С.Я., Кучеренко Н.Г., Тришкина А.И., Филимонова М.В., Шевчук А.Г., Штейн Л.В., Верховский Ю.Г., Коноплянников А.Г., Мандругин А.А., Федосеев В.М., Скворцов В.Г. NO-ингибирующая и вазотропная активность некоторых соединений, содержащих тиоамидиновую группу // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2002. Т. 134. № 10. С. 393–396.
  32. Проскуряков С.Я., Кучеренко Н.Г., Семенов М.Н., Тришкина А.И., Трофимова Т.П., Филимонова М.В., Штейн Л.В., Верховский Ю.Г., Коноплянников А.Г., Мандругин А.А., Федосеев В.М., Скворцов В.Г. NO-ингибирующая активность ра-

- диопротекторов // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43. № 1. С. 57–61.
33. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куроптева З.В. ЭПР в молекулярной радиобиологии. М.: Энергоатомиздат, 1989. 232 с.
  34. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих // Успехи биол. химии. 1995. Т. 35. С. 189–228.
  35. Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности // Биохимия. 2002. Т. 67. № 3. С.353–376.
  36. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-Синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 1029–1040.
  37. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Каюшин Л.П. Цикл окиси азота и нитритредуктазная активность гемсодержащих белков в организме млекопитающих // Вопр. мед. химии. 1994. Т. 40. № 6. С. 31–35.
  38. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С., Охотин В.Е. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности. М.: Едиториал УРСС, 2003. 96 с.
  39. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1998. 156 с.
  40. Саприн А.Н. Исследование природы и роли свободных радикалов и других парамагнитных центров при канцерогенезе // Дис. ... д-ра биол. наук. М.-Пуцдино: Ин-т биол. физики АН СССР. 1974. 367 с.
  41. Саприн А.Н., Козлова Л.Е., Шабалкин В.А., Круглякова К.Е., Эмануэль Н.М. О новом типе сигнала ЭПР в опухолевых тканях // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1969. № 6. С. 887–892.
  42. Саприн А.Н., Шабалкин В.А., Козлова Л.Е., Круглякова К.Е., Эмануэль Н.М. О новом типе сигнала ЭПР в опухолевых тканях // Докл. АН СССР. 1968. Т. 181. № 6. С. 1520–1523.
  43. Сенько Л.Н., Зозуля Ю.А. Роль оксида азота в патогенезе глиом (обзор) // Экспериментальная онкология. 2000. Т. 22. С. 246–250.
  44. Шуляковская Т.С., Власова С.А., Кондратьева В.А. Изменение парамагнитных свойств печени крыс при воздействии продуктами окисленных жиров // Докл. АН СССР. 1972. Т. 207. № 4. С. 982–984.
  45. Ahmed B., Van Den Oord J. Expression of the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and its inhibitor, protein inhibitor of nNOS, in pigment cell lesions of the skin // Br. J. Dermatol. 1999. V. 141. № 1. P. 12–19.
  46. Ahn B., Han B.S., Kim D.J. et al. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodimethylamine // Carcinogenesis. 1999. V. 20. № 7. P. 1337–1344.
  47. Allione A., Bernabei P., Borticardo M. et al. Nitric oxide suppresses human T-lymphocyte proliferation through INF-gamma-dependent and INF-gamma-independent induction of apoptosis // J. Immunol. 1999. V. 163. № 8. P. 4182–4191.
  48. Bentz B.G., Haines G.K., Lingen M.W. et al. Nitric oxide synthase type 3 is increased in squamous hyperplasia, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the head and neck // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 1999. V. 108. № 8. P. 781–787.
  49. Binder C., Schulz M., Hiddemann W., Oellerich M. Caspase-activation and induction of inducible nitric oxide synthase during TNF alpha-triggered apoptosis // Anticancer Res. 1999. V. 19. № 3A. P. 1715–1720.
  50. Binder C., Schulz M., Hiddemann W., Oellerich M. Induction of inducible nitric oxide synthase is an essential part of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in MCF-7 and other epithelial tumor cells // Lab. Invest. 1999. V. 79. № 12. P. 1703–1712.
  51. Bhaumik S., Khar A. Induction of nitric oxide production by the peritoneal macrophages after intraperitoneal or subcutaneous transplantation of AK-5 tumor // Nitric Oxide. 1998. V. 2. № 6. P. 467–474.
  52. Brennan M., Cole T., Singley I. A unique hyperfine ESR spectrum in mouse neoplasms analysed by computer simulation // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966. V. 123. № 3. P. 715–718.
  53. Brennan M., Cole T., Singley I., Hodginson E. Electron Spin Resonance Spectra of normal and neoplastic mouse tissues // Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 1965. V. 24. № 2. P.437–438.
  54. Brudvig G.W., Stevens T.H., Chan S.I. Reactions of nitric oxide with cytochrome c oxidase // Biochemistry. 1980. V. 19. № 23. P. 5275–5285.
  55. Bruns C.J., Shinohara H., Harbison M.T. et al. Therapy of human pancreatic carcinoma implants by irinotecan and the oral immunomodulator JBT 3002 is associated with enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in tumor-infiltrating macrophages // Cancer Res. 2000. V. 60. № 1. P. 2–7.
  56. Cantuarua G., Magalhaes A., Angioli R. et al. Antitumor activity of a novel glyco-nitric oxide conjugate in ovarian carcinoma // Cancer. 2000. V. 88. № 2. P. 381–388.
  57. Chazotte-Aubert L., Haunaut P., Ohshima H. Nitric oxide nitrates tyrosine residues of tumor-suppressor p53 protein in MCF-7 cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 267. № 2. P. 609–613.
  58. Chenais B., Molle I., Jeannesson P. Inhibitory effect of nitric oxide on chemically induced differentiation of human leukemic K562 cells // Cancer Lett. 1999. V. 122. № 1. P. 13–26.
  59. Cifone M.G., D'Alo S., Parroni R. et al. Interleucin-2-activated rat natural killer cells express inducible nitric oxide synthase that contributes to cytotoxic function and interferon-gamma production // Blood. 1999. V. 93. № 11. P. 3876–3884.
  60. Crown J.P., Beckman J.S. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity // The role of Nitric oxide in physiology and pathophysiology. 1999. P. 57–71.
  61. Doi C., Noguchi Y., Marat D. et al. Expression of nitric oxide synthase in gastric cancer // Cancer Lett. 1999. V. 144. № 2. P. 161–167.
  62. Doi K., Akaike T., Fujii S. et al. Induction of haem oxygenase-I nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth // Br. J. Cancer. 1999. V. 80. № 12. P. 1945–1954.

63. Downen M., Amaral T.D., Hua L.L. et al. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor- $\alpha$  // *Glia*. 1999. V. 28. № 2. P. 144–157.
64. Eroglu A., Demirci S., Ayyildiz A. et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor and nitrite as an estimate of in vivo nitric oxide in patients with gastric cancer // *Br. J. Cancer*. 1999. V. 80. № 10. P. 1630–1634.
65. Fimiani C., Arcuri E., Santoni A. et al. Mu3 opiate receptor expression in lung and lung carcinoma: ligand binding and coupling to nitric oxide release // *Cancer Lett*. 1999. V. 146. № 1. P. 45–51.
66. Furuke K., Burd P.R., Horvath-Arcidiacono J.A. et al. Human NK cells express endothelial nitric oxide synthase, and nitric oxide protects them from activation-induced cell death by regulating expression of TNF- $\alpha$  // *J. Immunol*. 1999. V. 163. № 3. P. 1473–1480.
67. Gerecitano J., Perle M.A., Vilcek J. Transcriptional basis for the differences in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression between nonmetastatic and metastatic murine melanoma cell lines // *J. Interferon Cytokine Res*. 1999. V. 19. № 4. P. 393–405.
68. Gloskzin S., von Knethen A., Scheffner M., Brune B. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274. № 28. P. 19581–19586.
69. Goto T., Haruma K., Kitadai Y. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients // *Clin. Cancer Res*. 1999. V. 5. № 6. P. 1411–1415.
70. Hamaoka R., Yaginuma Y., Takahashi T. et al. Different expression patterns of nitric oxide synthase isozymes in various gynecological cancers // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 1999. V. 125. № 6. P. 321–326.
71. Henderson B.W., Sitnik-Busch T.M., Vaughan L.A. Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent // *Photochem. Photobiol*. 1999. V. 70. № 1. P. 64–71.
72. Ho Y.S., Liu H.L., Duh J.S. et al. Induction of apoptosis by S-nitroglutathione and Cu<sup>2+</sup> or Ni<sup>2+</sup> ion through modulation of *bax*, *bad*, and *bcl-2* proteins in human colon adenocarcinoma cells // *Mol. Carcinog*. 1999. V. 26. № 3. P. 201–211.
73. Hsieh T.C., Juan G., Darzynkiewicz Z., Wu J.M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21 (WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2 // *Cancer Res*. 1999. V. 59. № 11. P. 2596–2601.
74. Hu C., Li G., Tang F. Antitumorigenic immunocompetence of alveolar macrophages in patients with lung cancer // *Human I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao*. 1998. V. 23. № 3. P. 285–288.
75. Ilnitsky A.P., Reutov V.P., Ryzhova N.I., Kolpakova A.S., Deryagina V.P., E.N. Nekrasova, Savluchinskaya L.A., Travkin A.G. Urethane-induced pulmonary adenoma and Raushers's Leukemia in mice modified by sodium nitrite: a possible role of nitric oxide and nitric dioxide // *Experimental Oncol*. 1997. V. 19. № 2. P. 101–109.
76. Imaizumi K., Kawabe T., Ichiyama S. et al. Enhancement of tumoricidal activity of alveolar macrophages via CD40-CD40 ligand interaction // *Amer. J. Physiol*. 1999. V. 277. № 1. Pt 1. P. 149–157.
77. Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J.S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide // *Arch. Biochem. Biophys*. 1992. V. 298. P. 446–451.
78. Iwata S., Nakagawa K., Harada H. et al. Endothelial nitric oxide synthase expression in tumor vasculature is correlated with malignancy in human supratentorial astrocytic tumors // *Neurosurgery*. 1999. V. 45. № 1. P. 24–28.
79. Jadeski L.C., Lala P.K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors // *Amer. J. Pathol*. 1999. V. 155. № 4. P. 1381–1390.
80. Jaiswal M., LaRusso N.F., Burgart L.J., Gores G.J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism // *Cancer Res*. 2000. V. 60. № 1. P. 184–190.
81. Joshi M.S., Ponthier J.L., Lancaster J.R. Cellular anti-oxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide // *Free Radic. Biol. Med*. 1999. V. 27. № 11–12. P. 1357–1366.
82. Jyothi M., Divya, Ashok Khar. Induction of nitric oxide production by natural killer cells: its role in tumor cell death // *Nitric Oxide: Biol. and Chem*. 1999. V. 3. № 5. P. 409–418.
83. Kawamori T., Takahashi M., Watanabe K. et al. Suppression of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci by nitric oxide synthase inhibitor // *Cancer Lett*. 2000. V. 148. № 1. P. 33–37.
84. Khalifa A., Eissa S., Aziz A. Determination of cytosolic citrulline and nitrate as indicators of nitric oxide in bladder cancer: possible association with basic fibroblast growth factor // *Clin. Biochem*. 1999. V. 32. № 8. P. 635–638.
85. Kleeb S.R., dos S. Rizzo M., Dagli M.L., Frussa-Filho R. Haloperidol increases spreading and nitric oxide production in macrophages from tumor-bearing mice: a possible mechanism for its antitumoral effect // *Int. J. Immunopharmacol*. 1999. V. 21. № 9. P. 575–580.
86. Klimp A.H., Regts J., Scherphol G.L., de Vries E.G. Effect of intraperitoneally administered recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rmFM-CSF) on cytotoxic potential of murine peritoneal cells // *Br. J. Cancer*. 1999. V. 79. № 1. P. 89–94.
87. Klotz T., Bloch W., Jakobs G. et al. Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer // *Urology*. 1999. V. 54. № 3. P. 416–419.
88. von Knethen A., Brockhaus F., Kleiter I., Brune B. NO-Evoked macrophage apoptosis is attenuated by cAMF-induced gene expression // *Mol. Med*. 1999. V. 5. № 10. P. 672–684.
89. Koh E., Noh S.H., Lee Y.D. et al. Differential expression of nitric oxide synthase in human stomach cancer // *Cancer Lett*. 1999. V. 146. № 2. P. 173–180.
90. Komatsu Tsrivastava N., Revzin M., Ireland D.D., Chesler D. Mechanisms of cytokine-mediated inhibi-

- tion of viral replication // *Virology*. 1999. V. 259. № 2. P. 334–341.
91. *Konoshima T., Takasaki M., Tokuda H.* Anti-carcinogenic activity of the roots of *Panax notoginseng* // *Biol. Pharm. Bull.* 1999. V. 22. № 10. P. 1150–1152.
  92. *Kurimoto M., Endo S., Hirashima Y., Hamada H. et al.* Growth inhibition and radiosensitization of cultured glioma cells by nitric oxide generating agents // *J. Neurooncol.* 1999. V. 42. № 1. P. 35–44.
  93. *Li J., Bombeck C.A., Yang S. et al.* Nitric oxide suppress apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 24. P. 17325–17333.
  94. *Lin J.K., Tsai S.H.* Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol // *Proc. Natl. Sci. Repub. China B.* 1999. V. 23. № 3. P. 99–106.
  95. *Lin J.K., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y.* Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade // *Biochem. Pharmacol.* 1999. V. 58. № 6. P. 911–915.
  96. *Maccarrone M., Salucci M.L., Melino G. et al.* The early phase of apoptosis in human neuroblastoma CHP100 cells is characterized by lipoxygenase-dependent ultraweak light emission // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 265. № 3. P. 758–762.
  97. *Mallard I.R., Kent M.* Differences observed between electron spin resonance signals from surviving tumor tissues and from their corresponding normal tissues // *Nature*. 1964. V. 204. № 4964. P. 1192–1193.
  98. *Maeda H., Wu J., Okamoto T. et al.* Kallikrein-kinin in infection and cancer // *Immunopharmacology*. 1999. V. 43. № 2–3. P. 115–128.
  99. *Martin J.H., Alalami O., van den Berg H.W.* Reduced expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in a human breast cancer cell line which has acquired estrogen independence // *Cancer Lett.* 1999. V. 144. № 1. P. 65–74.
  100. *Marujama T., Kataoka N., Nagase S., Nahada H., Sato H., Sasaki H.* Identification of three-line electron spin resonance signal and its relationship to ascite tumor // *Cancer Res.* 1971. V. 31. № 2. P. 179–184.
  101. *Medot-Pirenne M., Heilman M.J., Saxena M.* Augmentation of an antitumor CTL response in vivo by inhibition of suppressor macrophage nitric oxide // *J. Immunol.* 1999. V. 163. № 11. P. 5877–5882.
  102. *Millar J.* The nitric oxide/ascorbate cycle: how neurons may control their own oxygen supply // *Medical Hypotheses*. 1995. V. 45. P. 21–26.
  103. *Mogi M., Kinpara K., Kondo A., Togari A.* Involvement of nitric oxide and biopterin in proinflammatory cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 // *Biochem. Pharmacol.* 1999. V. 58. № 4. P. 649–654.
  104. *Moon E.Y., Rhee D.K., Pyo S.* Involvement of NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  in the reduced antitumor activity of murine peritoneal macrophages by aflatoxine B1 // *Cancer Lett.* 1999. V. 136. № 2. P. 167–176.
  105. *Moon E.Y., Rhee D.K., Pyo S.* In vitro suppressive effect of aflatoxin B1 on murine peritoneal macrophage functions // *Toxicology*. 1999. V. 133. № 2–3. P. 171–179.
  106. *Morse R.H., Chan S.I.* Electron paramagnetic resonance studies of nitrosyl ferrous heme complexes. Determination of an equilibrium between two conformations // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 16. P. 7876–7882.
  107. *Morcos E., Jansson O.T., Adolfsson J. et al.* Endogenously formed nitric oxide modulates cell growth in bladder cancer cell lines // *Urology*. 1999. V. 53. № 6. P. 1252–1257.
  108. *Mori N., Nunokawa Y., Yamada Y.* Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type-I and primary adult T-cell leukemia cells // *Blood*. 1999. V. 94. № 8. P. 2862–2870.
  109. *Mortensen K., Holck S., Christensen I.J. et al.* Endothelial cell nitric oxide synthase in peritumoral microvessels is a favorable prognostic indicator in premenopausal breast cancer patients // *Clin. Cancer Res.* 1999. V. 5. № 5. P. 1093–1097.
  110. *Mortensen K., Skow J., Hougaard D.M., Larsson L.I.* Endogenous endothelial cell nitric-oxide synthase modulates apoptosis in cultured breast cancer cell and is transcriptionally regulated by p53 // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 53. P. 37679–37684.
  111. *Mullins D.W., Burger C.J., Elgert K.D.* Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor bearing hosts through nitric oxide // *J. Immunol.* 1999. V. 162. № 11. P. 6811–6818.
  112. *Nasu Y., Bangma C.H., Hull G.W. et al.* Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer: suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model // *Gene Ther.* 1999. V. 6. № 3. P. 338–349.
  113. *Newton N.* A soluble cytochrome containing c-type and a<sub>2</sub>-type haem groups from *Micrococcus denitrificans* // *Biochem. J.* 1967. V. 105. № 1. P. 21C–23C.
  114. *Newton N.* The two-haem nitrite reductase of *Micrococcus denitrificans* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1969. V. 185. № 2. P. 316–331.
  115. *Nemoto Y., Otsuka T., Niuro H. et al.* Differential effects of interleukin-4 and interleukin-10 on nitric oxide production by murine macrophages // *Inflamm. Res.* 1999. V. 48. № 12. P. 643–650.
  116. *Ninomiya T., Akbar S.M., Masumoto T., Horiike N., Onji M.* Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma // *J. Hepatol.* 1999. V. 31. № 2. P. 323–331.
  117. *Oh-hashii K., Maruyama W., Yi H. et al.* Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 263. № 2. P. 504–509.
  118. *Orucevic A., Bechberger J., Green A.M. et al.* Nitric oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness // *Int. J. Cancer*. 1999. V. 81. № 6. P. 889–896.
  119. *Reveneau S., Arnould L., Jolimoy G. et al.* Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade proliferation rate, and expression of progesterone receptors // *Lab. Invest.* 1999. V. 79. № 10. P. 1215–1225.
  120. *Ribiero-Dias F., Russo M., Marzagao Barbuto J.A. et al.* Mycoplasma arginini enhances cytotoxicity of thioglycollate-elicited murine macrophages toward



- YAC-1 tumor cells through production of NO // *J. Leukoc. Biol.* 1999. V. 65. № 6. P. 808–814.
121. Saavedra J.E., Shami P.J., Wang L.Y. et al. Esterase-sensitive nitric oxide donors of the diazeniumdiolate family: in vitro antileukemic activity // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. № 2. P. 261–269.
  122. Sandhu J.K., Privora H.F., Wenckebach G., Birnboim H.C. Neutrophils, nitric oxide synthase, and mutations in the mutact murine tumor model // *Amer. J. Pathol.* 2000. V. 156. № 2. P. 509–518.
  123. Schirrmacher V., Bai L., Umansky V., Yu L. et al. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity // *Int. J. Oncol.* 2000. V. 16. № 2. P. 363–373.
  124. Shoun H., Kim D.H., Uchiyama H., Sugiyama J. Denitrification by fungi // *FEMS Microbiol Lett.* 1992. V. 73. № 3. P. 277–281.
  125. Shoun H., Suyama W., Yasui T. Soluble, nitrate/nitrite-inducible cytochrome P-450 of the fungus, *Fusarium oxysporum* // *FEBS Lett.* 1989. V. 244. № 1. P. 11–14.
  126. Shoun H., Tanimoto T. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 17. P. 11078–11082.
  127. Sonoki T., Matsuzaki H., Nadasaki A. et al. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by RT-PCR in ATL patients and HTLV-I infected cell lines: clinical features and apoptosis by NOS inhibitor // *Leukemia.* 1999. V. 13. № 5. P. 713–718.
  128. Sosunov A.A., Chairkin I.N., Odyvanova L.R. et al. Nitric oxide synthase in neuroepithelial brain tumors // *Arkh. Patol.* 1997. V. 59. P. 61–65.
  129. Souici A.C., Mirkovitch J., Hausel P. et al. Transition mutation in codon 248 of the p53 tumor suppressor gene induced by reactive oxygen species and a nitric oxide-releasing compound // *Carcinogenesis.* 2000. V. 21. № 2. P. 281–287.
  130. Stopper H., Moller M., Bommel H.M., Schmidt H.H. Cytotoxic versus genotoxic effects of nitric oxide (NO) // *Toxicol. Lett.* 1999. V. 106. № 1. P. 59–67.
  131. Suzuki K., Islam K.N., Kaneto H. et al. The contribution of fructose and nitric oxide to oxidative stress in hamster islet tumor (HIT) cells through the inactivation of glutathione peroxidase // *Electrophoresis.* 2000. V. 21. № 2. P. 285–288.
  132. Szaleczky E., Pronai L., Nakazawa H., Tulassay Z. Evidence of in vivo peroxynitrite formation in patients with colorectal carcinoma, higher plasma nitrate/nitrite levels, and lower protection against oxygen free radicals // *J. Clin. Gastroenterol.* 2000. V. 30. № 1. P. 47–51.
  133. Tanaka H., Kijima H., Tokunaga T. et al. Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas // *Int. J. Oncol.* 1999. V. 14. № 6. P. 1069–1073.
  134. Tews D.S. Cell death and oxidative stress in gliomas // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1999. V. 25. № 4. P. 272–284.
  135. Tschugguel W., Schneeberger C., Unfried G. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer depends on tumor grade // *Breast. Cancer. Res. Treat.* 1999. V. 56. № 2. P. 145–151.
  136. Umansky V., Ushmorov A., Ratter F. et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in human breast cancer cells requires changes in mitochondrial functions and is independent of CD95 (APO-1/Fas) // *Int. J. Oncol.* 2000. V. 16. № 1. P. 109–117.
  137. Vodovotz Y., Coffin D., DeLuca A.M. et al. Induction of nitric oxide production in infiltrating leukocytes following in vivo irradiation of tumor-bearing mice // *Radiat. Oncol. Investing.* 1999. V. 7. № 2. P. 86–97.
  138. Vithaythil J.A., Ternberg J.L., Commoner B. Changes in electron spin resonance signals of the rat liver during clinical carcinogenesis // *Nature.* 1965. V. 207. № 5003. P. 1246–1249.
  139. Wingrow J.A., O'Farrell P.H. Nitric Oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila* // *Cell.* 1999. V. 98. P. 105–114.
  140. Zweier J.L., Samouilov A., Kupposamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems // *Biochem. Biophys. Acta.* 1999. V. 1411. P. 250–262.

Поступила в редакцию  
04.08.2002 г.

## The Biological Role Of Nitric Oxide In The Mechanisms Tumor Growth

V. N. Zaporozhan, A. I. Gozhenko, T. V. Korneenko, V. G. Dubinina

*Odessa State Medical University*

This review article will analyze the role of nitric oxide in antitumor organism resistance, in particular some mechanisms of NO-mediated apoptosis in different cells and NO involvement in etiological mechanisms as well as tumor growth promotion. The possible mechanisms of nitric oxide dual effect are discussed. The data about NO as a mediator in different methods of cancer treatment are given. In conclusion, we have determined some principles of application of NO-modulating agents in cancer therapy.