

МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА КАК МАРКЕРЫ ФАЗ РАЗВИТИЯ АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ

Наумов А. А.¹, Зинатуллина Г. Г.^{1,2}, Поцелуева М. М.^{1,2}

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

²Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино.

Для решения существующих проблем, связанных с качеством и продолжительностью жизни онкологических пациентов, необходимо совершенствовать методы диагностики и эффективной терапии. Для решения этих задач необходимо знать механизмы процессов, которые сопровождают рост злокачественных новообразований. Целью нашего исследования являлось определение маркерных параметров, связанных с продукцией NO в крови и зоне роста опухоли для достоверного разделения процесса развития асцитной опухоли на отдельные дифференцированные стадии. В качестве модели опухолевого процесса была использована асцитная гепатома Зайделя, трансплантированная в брюшную полость крыс линии Вистар. Установлено, что в плазме крови развивается нитрозилирующий стресс. Причём его проявления в ходе роста опухоли различны. Так, на начальных этапах роста опухоли в плазме наблюдается значительное накопление продуктов модификации белков. Причём первая фаза характеризуется преимущественно накоплением нитротирозина, а вторая – S-нитрозотиолов, терминальная стадия выделяется увеличением концентрации нитритов/нитратов. Модифицированные белки с током жидкости попадают в асцит.

Ключевые слова: нитрозилирующий стресс, опухолевый рост, оксид азота, гепатома Зайделя.

NITROGEN OXIDE METABOLITES AS MARKERS OF DEVELOPMENT PHASES OF ZEIDEL ASCITES HEPATOMA

Naumov A. A.¹, Zinatullin G. G.^{1,2}, Potselueva M. M.^{1,2}

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

²Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino.

The modern problems associated with the life quality and duration of oncologic patients must be solved by refining the methods of diagnostics and efficient therapy. To do this, we have to know the mechanisms of processes that accompany neoplasm development. The purpose of our study was to determine marker parameters associated with production of NO in the blood and in the area of tumor growth, in order to reliably separate the process of ascites tumor development into individual differentiated stages. Zeidel ascites hepatoma transplanted into Vistar rat abdominal cavity was used as a model of tumor development. It was found that the tumor causes the development nitrosative stress in the blood plasma and its manifestations in the course of tumor growth being different. Thus, in the early stages of tumor growth, a marked accumulation of protein modification products was observed. The first phase is showing for the most part accumulation of nitrotyrosine and phase 2 accumulating mainly S-nitrosothiols. The terminal stage was characterized by increased concentrations of nitrites/nitrates. Modified proteins fall in ascites with a current fluid of ascites tumors differentiated into separate stages on the example of a model tumor hepatoma Zeidel.

Key words: nitrosative stress, tumor growth, nitric oxide, Zeidel hepatoma.

Введение

В настоящее время онкологические заболевания в России занимают одно из ведущих мест в списке причин смертности населения. Для того чтобы изменить данную ситуацию, необходимо разрабатывать новые методы ранней диагностики и эффективной терапии онкологических заболеваний. Чтобы достичь требуемого результата, необходимо знать механизмы процессов, которые сопровождают рост злокачественных новообразований в

организме. С этой целью используются различные модельные системы, позволяющие изучить данные заболевания с различных сторон.

Удобной для исследования оказалась асцитная гепатома Зайделя, трансплантированная в брюшную полость крыс линии Вистар. Ранние исследования [1,2] на этой модели показали значительную роль врождённого иммунитета и, в частности, систем генерации активных метаболитов кислорода (АФК) в патогенезе данной опухоли. Однако помимо АФК в гуморальный ответ фагоцитирующих клеток в качестве оружия неспецифического иммунитета входит также и система генерации оксида азота (NO). На разных этапах роста опухолей АФК и NO вырабатываются разными клетками (макрофагами, нейтрофилами, миелоидными супрессирующими клетками и др.) для разных целей (внутриклеточная сигнализация, регуляторная модификация функциональных белков, индукция апоптоза). Различными исследованиями была показана роль NO в индукции генотоксического повреждения, в продвижении опухоли и прогрессии ее роста от посреднических важных процессов, в том числе ангиогенеза и инвазии [3, 4, 5,7]. Высокие уровни NO обладают сильной генотоксичностью через образование канцерогенных нитрозаминов или путём повреждения систем репарации ДНК [6]. Однако NO также способен и уменьшать воздействие активных форм кислорода на ДНК [8]. При этом оксид азота является важным компонентом иммунной реакции организма на рост некоторых типов опухолей, например, защищает от рака толстой кишки у мышей [9]. В связи с этим изучение изменения количественного и качественного состава продуцируемых в организме различных метаболитов NO как в зоне роста опухоли, так и в крови является актуальной задачей для понимания роли врождённого иммунитета в процессе роста и патогенеза злокачественных новообразований.

Материалы и методы исследования

В работе использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200–220 г. Крыс содержали в условиях вивария на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище, при 16–20 °С в режиме естественной освещенности. Для формирования экспериментальной опухоли использовали клетки асцитной гепатомы Зайделя, отбираемой у крыс опухоленосителей на 5-е сутки развития опухоли. Трансплантацию клеток асцитной гепатомы Зайделя проводили в брюшную полость животного в объеме 0.8 мл (10^7 кл./мл). Исследования метаболитов NO проводились в плазме крови и асцитной жидкости. Форменные элементы удалялись центрифугированием при 400g в течение 10 мин. До проведения непосредственно измерений образцы плазмы и асцита хранили при температуре -27 °С.

Концентрацию нитритов/нитратов измеряли спектрофотометрическим методом. Для этого содержащиеся в асцитной жидкости белки осаждали раствором сульфата цинка и

депротонизировали 1М 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 часа для проведения реакции восстановления нитратов, затем кадмий удаляли центрифугированием. Количество нитритов в супернатантах измеряли с использованием реактива Грисса, содержащего смесь 0,1 %-ого раствора N-1-нафтилэтилендиамин дигидрохлорида в 2,5 % фосфорной кислоте и 1 %-ого раствора сульфаниламида в 2,5 %-ной фосфорной кислоте, в соотношении 1:1. К 150 мкл супернатанта, перенесенного в лунку в 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. Калибровку проводили относительно стандартных растворов NaNO_2 .

Концентрацию S-нитрозотиолов определяли с помощью метода, основанного на спектрофотометрическом измерении нитрита, образующегося при разрушении S-нитрозотиолов в присутствии Hg^{2+} . Выделяемый NO^{2-} определяется с помощью реактива Грисса при 546 нм. Для этого к 150 мкл исследуемого образца, перенесенного в 96-луночный плоскодонный планшет, добавляли 50 мкл свежеприготовленного 0,2 % HgCl_2 в 1 % растворе сульфаниламида и 50 мкл 0,2 % раствора N-1-нафтилэтилендиамина. В течение 40 мин следили за развитием цветной реакции при комнатной температуре. Для исследуемого образца также определяли концентрацию нитритов (150 мкл исследуемого образца, 50 мкл 1 % раствора сульфаниламида и 50 мкл 0,2 % раствора N-1-нафтил-этилендиамина). Затем измеряли оптическую плотность обоих образцов при длине волны – 546 нм. Калибровочная кривая была построена с использованием стандартных растворов нитрита натрия NaNO_2 . Концентрацию нитрозотиолов определяли как разность концентраций нитритов в образцах, обработанных и необработанных HgCl_2 .

Концентрацию нитротирозина определяли иммуноферментным методом с помощью набора фирмы «НВТ» (Нидерланды).

Результаты исследования и их обсуждение

Невозможность проведения экспериментов на человеке делает актуальными вопросы моделирования злокачественных опухолей на лабораторных животных. Широкий спектр применяемых моделей онкогенеза позволяет изучить данные заболевания с различных сторон, выявить общие закономерности для человека и животных и создать теоретическое обоснование для разработки методов терапии опухолей [Попова Н. А., 2000]. Наиболее часто используемыми моделями являются перевиваемые опухоли. Наиболее широкое распространение среди различных модификаций трансплантации новообразований получила

прививка опухолей в брюшную полость животных с последующим получением так называемых асцитных новообразований, т. е. опухолей, растущих в брюшной полости животных в виде размножающихся клеток в накапливающейся перитонеальной жидкости. Такой тип модели опухолевого роста был использован в данном исследовании, а именно асцитная гепатома Зайделя.

Первостепенной задачей при исследовании опухолевого процесса при развитии асцитной гепатомы Зайделя являлось изучение динамики роста опухолевых клеток и изменение объема асцитной жидкости.

На рис.1. представлена динамика изменения концентрации опухолевых клеток (синяя кривая) в асците в процессе роста опухоли. Зависимость имеет обычный вид кривой с насыщением с максимальной скоростью в интервале 1–4 суток после трансплантации. Процесс возрастания числа опухолевых клеток сопровождается увеличением объема асцитной жидкости, который может достигать 60–70 мл (рис.1, красная кривая). При этом объём крови/плазмы и масса опухоленосителя в течение эксперимента значительно не изменяются.

Анализируя график динамики изменения объёма асцита и концентрации опухолевых клеток (рис. 1), можно выделить три фазы. Первая фаза – (I) латентная (1–3 сут), в течение

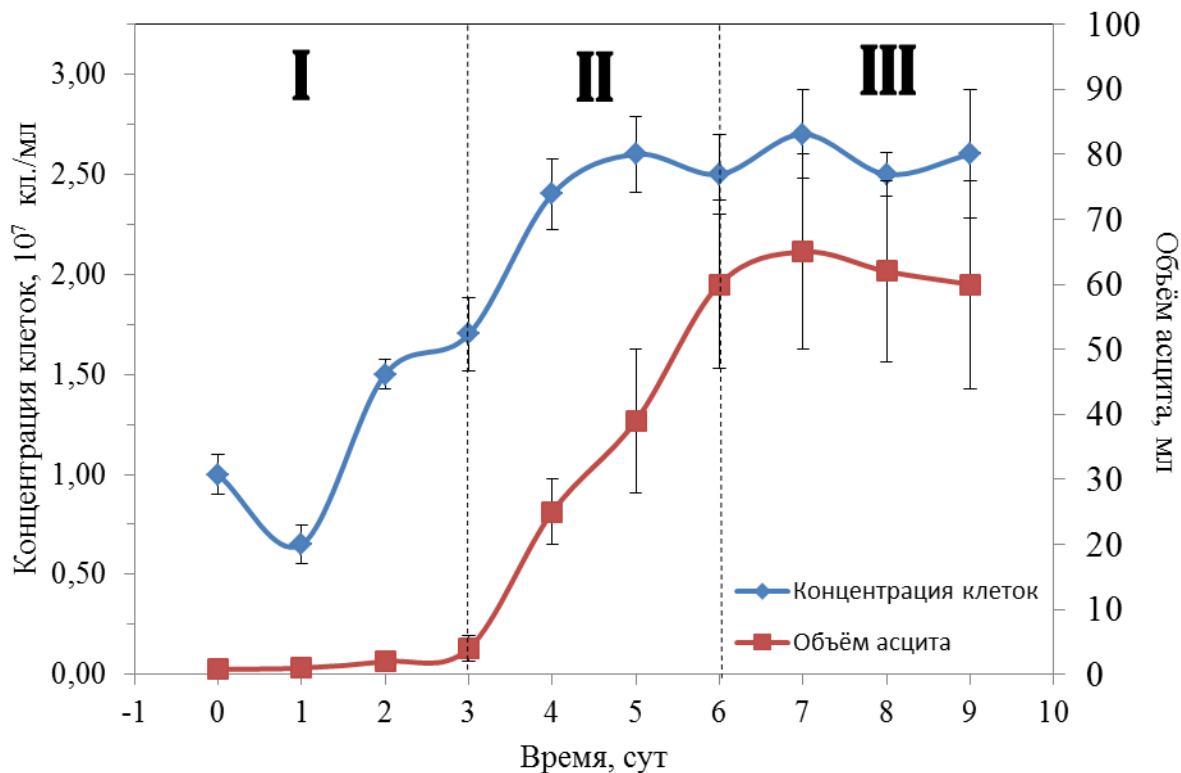


Рис. 1. Изменение объема асцитной жидкости и концентрации опухолевых клеток в процессе развития опухоли. (n=10). Римскими цифрами отмечены фазы развития гепатомы Зайделя: I – начальная фаза; II – фаза экспоненциального роста; III – терминальная фаза. 0 сутки – здоровое животное

которой не происходит заметного роста объёма асцита. Вторая фаза – (II) фаза линейного роста объёма асцита (3–6 сут) и, наконец, третья фаза – (III) характеризуется замедлением роста объёма асцита (6–9 сут). В первом приближении итоговую, нелинейную кривую изменения объёма асцита можно разбить на три квазилинейных участка – I, II и III, в пределах которых скорость роста асцита имеет постоянную величину. При этом рост концентрации опухолевых клеток опережает динамику объёма асцитной жидкости примерно на сутки (рис. 1). В дальнейшем метаболиты оксида азота изучались на середине каждой стадии роста.

Исследования динамики метаболитов оксида азота в плазме крови и асцитной жидкости проводили в пробах, отобранных у декапитированных животных на разных фазах опухолевого роста – на 3-и сутки после трансплантации опухоли для первой фазы, на 5 сутки – для второй фазы и на 8 сутки – для третьей фазы. В качестве контроля использовалось здоровое животное.

Установлено, что начальная стадия роста опухоли сопровождается повышением уровня NO-модифицированных белков в крови опухоленосителя, а именно S-нитрозотиолов (RS-NO) с 6,5 μM до 11 μM и особенно нитротирозина (Tyr-NO₂ – маркера пероксинитрита) с 4 nM до 12 nM (рис. 2). Такой прирост пероксинитрита и нитрозотиолов, по-видимому, связан с воспалительной реакцией в ответ на трансплантацию опухоли и обусловлен не столько увеличением синтеза NO в кровяном русле, сколько созданием более благоприятных условий для реакции нитрования и нитрозилирования белков. Данные условия могут сформироваться при условии увеличения концентрации АФК, что и происходит за счёт активации клеток неспецифического иммунитета, в частности, полиморфноядерных лейкоцитов.

Во II фазе развития гепатомы Зайделя в спектре метаболитов NO в крови начинают преобладать S-нитрозотиолы. Их концентрация увеличивается в 2–2,5 раза, достигая максимального значения в 12,5 μM . В этот же период концентрация нитротирозина (Tyr-NO₂) и нитратов/нитритов (NO_x) незначительно отличается от уровня здорового животного (рис. 2).

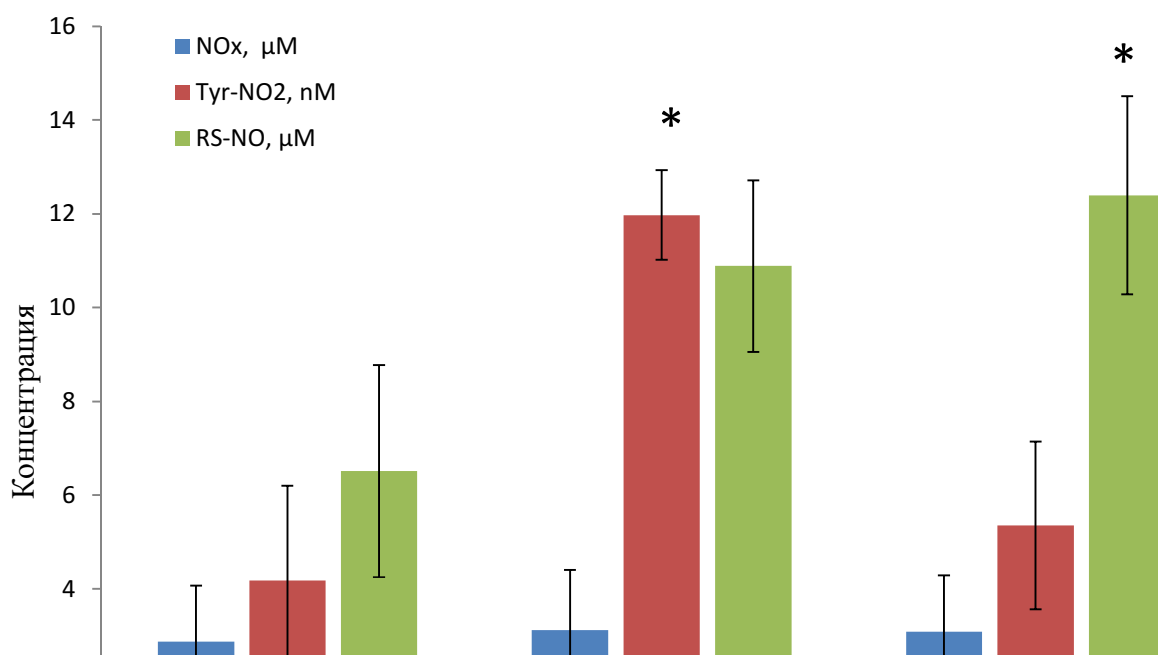


Рис. 2. Изменения спектра основных внеклеточных метаболитов оксида азота в плазме крови в зависимости от фазы опухолевого роста (n=7). * – P < 0,05 относительно здорового животного

Терминальная стадия опухоли (III фаза) характеризуется падением концентрации NO-модифицированных белков. Однако наблюдается заметное увеличение доли низкомолекулярных метаболитов (NOx), что может быть связано с расходом мишеней взаимодействия NO с белками, в том числе за счет значительного их окисления вследствие развития окислительного стресса. NO преимущественно метаболизируется в NO₂⁻ и NO₃⁻. NOx также могут поступать из иного источника.

Зона роста опухоли для гепатомы Зайделя характеризуется составом асцитной жидкости, которая является производной от процессов, протекающих как в плазме крови, так и непосредственно в зоне патологии. Состав асцита также зависит от скорости обмена между компонентами плазмы и асцита, которая зависит от природы и свойств диффундирующих веществ.

Нами установлено, что концентрации низкомолекулярных метаболитов NO в асцитной жидкости (NOx) на первых двух фазах развития опухоли (рис. 3) превышают таковые в крови примерно на 4 μM . Однако на терминальной (III фазе) роста опухоли эти значения сравниваются. Так как начальные стадии характеризуются преимущественно накоплением объёма асцитной жидкости, а на III фазе наблюдается стационарное состояние, то вероятно, что в конце роста опухоли развивается равновесное состояние, при котором низкомолекулярные соединения, в частности NOx, могут равномерно распределяться между плазмой и асцитом. Данный процес приводит к наблюдаемому выравниванию концентрации NOx в крови и асците на заключительной, III фазе. Более высокий уровень NOx на первых

двух фазах может быть обусловлен как работой иммунной системы, в частности, макрофагов, так и сниженной скоростью утилизации веществ из асцита ввиду тока жидкости, направленного в сторону брюшной полости.

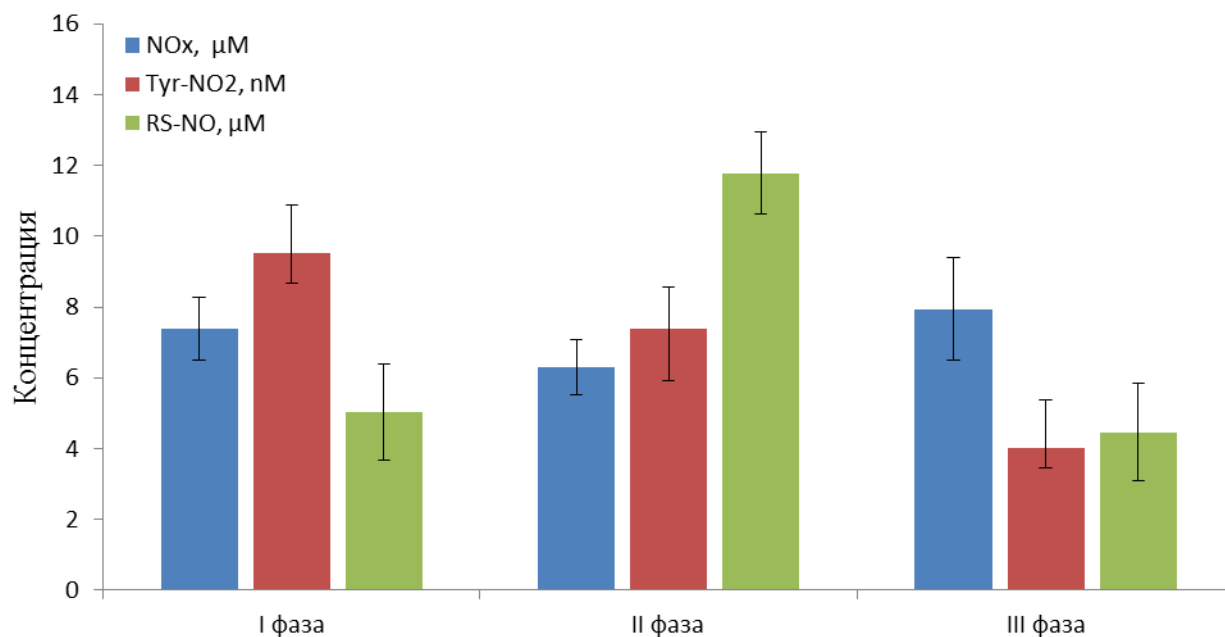


Рис. 3. Изменения спектра основных внеклеточных метаболитов оксида азота в асцитной жидкости в зависимости от фазы опухолевого роста (n=7)

В зоне роста опухоли (рис. 3) наблюдается постепенное снижение концентрации нитротирозина (Tyr-NO₂) от 9–10 пМ до 3–4,4 пМ. Максимальная концентрация S-нитрозотиолов в 11,5 µM отмечена во II фазе роста опухоли, что коррелирует с результатами по нитрозотиолам в плазме крови в этот период. Учитывая то, что скорость роста объёма асцита и, следовательно, транспорт веществ из крови в брюшную полость максимален именно во второй фазе опухолевого роста, то можно заключить, что основным источником NO-модифицированных белков в асцитной жидкости является кровь, где имеется значительный источник NO в виде эндотелиальных клеток и созданы условия для протекания процессов нитрования и нитрозилирования белков.

Таким образом, оценивая уровень метаболитов NO в ходе развития асцитной опухоли в организме животного, можно заключить, что в плазме крови развивается нитрозилирующий стресс. Причём его проявления в ходе роста опухоли различны. Так, на начальных этапах опухоли в плазме наблюдается значительное накопление продуктов модификации белков, причём первая фаза характеризуется преимущественно накоплением нитротирозина, а вторая – S-нитрозотиолов. Терминальная стадия выделяется увеличением концентрации нитритов/нитратов. Модифицированные белки с током жидкости затем транспортируются в зону роста опухоли – в асцитную жидкость.

Список литературы

1. Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Алабин В. С., Евтодиенко Ю. В. Генерация реактивных форм кислорода полиморфноядерными лейкоцитами в процессе развития гепатомы в брюшной полости животного // Цитология. 41(2): 162-166, 1999.
2. Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Ковалева Е. В., Шаталин Ю. В., Евтодиенко Ю. В. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки *in vitro* и *in vivo* // Цитология. 71(1): 57-63, 2005.
3. Hussain S. P., Hofseth L. J., Harris C. C. Radical causes of cancer // *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 276–285.
4. Jenkins D. C., Charles I. G., Thomsen L. L., Moss D. W., Holmes L. S., Baylis S. A., Rhodes P., Westmore K., Emson P. C., Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 4392–4396.
5. Lala P. K., Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol*. 2001; 2: 149–156.
6. Laval F., Wink D. A., Laval J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins // *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1997; 131: 175–191.
7. Wink D. A., Vodovotz Y., Laval J., Laval F., Dewhirst M. W., Mitchell J. B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer // *Carcinogenesis*. 1998; 19:711–721.
8. Yoshie Y., Ohshima H. Nitric oxide synergistically enhances DNA strand breakage induced by polyhydroxyaromatic compounds, but inhibits that induced by the Fenton reaction // *Arch Biochem Biophys*. 1997; 342: 13–21.
9. Zhang R., Ma A., Urbanski S. J., McCafferty D. M. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma // *Carcinogenesis*. – 2007; 28: 1122–1130.

Рецензенты:

Новоселова Елена Григорьевна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов рецепции ФГБУН Института биофизики клетки РАН, г. Пущино.

Асланиди Константин Борисович, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики внутриклеточной регуляции ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г.Пущино.