

Коненков В.И., Бородин Ю.И., Макарова О.П., Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н.

Влияние наноразмерных частиц карбоната лития на образование оксида азота и активность аргиназы в опухоли и перитонеальных макрофагах при развитии гепатокарциномы 29

ФБГНУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии, 630117, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, д. 2

В эксперименте использовано 3 группы мышей-самцов СВА. В 1-ю группу вошли интактные мыши, во 2-ю группу — животные, которым трансплантировали клетки гепатокарциномы 29 (Г-29) в мышцу правого бедра. Мышам 3-й группы после инокуляции опухолевых клеток вводили 1-кратно (3 сут.) и 5-кратно (7 и 13 сут.) 0,1 мл взвеси наноразмерных частиц карбоната лития (НЧ Li_2CO_3) в дозе 0,058 мг по периферии опухолевого роста. На 7 сут. в опухолевой ткани в 5,8 раза увеличивалась численная плотность макрофагов, в 1,9 раза повышался уровень NO, и снижалась активность аргиназы по сравнению с аналогичными показателями в нормальной печени. Рост опухоли приводил к повышению продукции NO перитонеальными макрофагами (пМф) в 2,8 и 2,2 раза на 7 сут. и 13 сут. соответственно и не влиял на активность аргиназы. Однократное введение НЧ Li_2CO_3 после индукции опухолевого процесса (3 сут.) не меняло уровня NO в ткани Г-29, но после пятикратного введения (7 сут.) концентрация NO в опухоли была в 1,7 раза выше, чем у животных 2 группы. Инъекции НЧ Li_2CO_3 способствовали нарастанию численной плотности макрофагов в опухоли. На 7 сут. после 5-кратного введения НЧ Li_2CO_3 численность макрофагов у мышей 3 группы увеличивалась в 9,6 и 1,6 раза по сравнению с аналогичными значениями в 1-й и 2-й группах соответственно. Введение НЧ Li_2CO_3 после трансплантации клеток Г-29 в мышечную ткань не влияло на интенсивность образование NO пМф при развитии опухоли. Кроме того, введение НЧ Li_2CO_3 после инициации Г-29 в мышечной ткани бедра не влияло на активность аргиназы в пМф на всех сроках исследования. Таким образом, эффекты НЧ Li_2CO_3 , вводимых после трансплантации опухолевых клеток Г-29, направлены на усиление NO-синтазного пути в опухоли и макрофагах перитонеальной полости, что может способствовать снижению концентрации аргинина, необходимого для роста гепатокарциномы.

Ключевые слова: гепатокарцинома; наноразмерные частицы; карбонат лития; макрофаги; оксид азота; аргиназа

Konenkov V.I., Borodin Yu.I., Makarova O.P., Bgatova N.P., Rachkovskaya L.N.

Effects of lithium carbonate nanosized particles on nitric oxide production and arginase activity in tumor and peritoneal macrophages in hepatocellular carcinoma 29

Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology», 2, Timakoff St., Novosibirsk, Russia, 630117

Three groups of male CBA mice were used. Group 1 consisted of intact mice. Hepatocarcinoma cells 29 (HCC-29) were transplanted into the right thigh muscle of animals group 2. Group 3 mice were injected 0.1 ml of lithium carbonate nanosized particles (NPs Li_2CO_3) at a dose of 0,058 mg on periphery of tumor growth one fold (3 day) and 5 -fold (7 and 13 days). On day 7, numerical density of macrophages was raised in 5.8 times, the NO levels were increased by 1.9 times, and arginase activity was decreased in HCC tissue as compared with those values in normal liver. Tumor growth led to an increase in NO production by peritoneal macrophages (pMf) in 2.8 and 2.2-fold on day 7 and 13 days, respectively, and hadn't effect on arginase activity. A single injection of NPs Li_2CO_3 after inoculation tumor cells (3 days) didn't alter the NO levels rise in the tumor but five injections (7 days) increased it in 1.7 times as compared with values of mice group 2. The treatment of NPs Li_2CO_3 influenced the increasing the number density of macrophages in the tumor. Numerical density of macrophages in the tumor of mice group 3 was increased 9.6 and 1.6 times as compared with similar values in groups 1 and 2, respectively on 7 day after 5 injections of NPs Li_2CO_3 . Treatment of NPs Li_2CO_3 after tumor cell transplantation didn't affect on the rise of NO levels and arginase activity in pMf. Thus, the effects of NPs Li_2CO_3 , administered after HCC-29 cells transplantation, aimed at increasing activity of the NO-synthase way in HCC tumors and pMf, which can reduce the arginine levels required for tumor growth.

Keywords: hepatocarcinoma; nanosized particles; lithium carbonate; macrophages; nitric oxide; arginase

Методика

Аргинин способствует росту опухолей, и ферментативное разрушение этой незаменимой аминокислоты, опосредованное аргиназой может привести к подавлению пролиферации и гибели опухолевых клеток [1]. За аргинин конкурируют между собой аргиназный и NO-синтазный метаболические пути. Активация NO-синтазного метаболического пути в опухоли может способствовать элиминации раковых клеток. Показано, что совместное использование 5-фторурацила и L-аргинина у мышей nude с гепатокарциномой приводит к усилению экспрессии индуцибельной NO-синтазы, повышению продукции NO в опухоли, что способствует увеличению экспрессии генов белков, индуцирующих апоптоз опухолевых клеток [2], а применение ингибитора NO-синтазы L-NAME снижает эффект противоопухолевой терапии [3]. Гепатокарцинома относится к аргинин-зависимым опухолям, и рекомбинантные ферменты, разрушающие L-аргинин, аргиназа и аргиназная деиминаза зарекомендовали себя, как противоопухолевые агенты в отношении гепатокарциномы [4, 5].

Известно, что гепатокарцинома активно инфильтрируется макрофагами, которые поддерживают хронический воспалительный процесс необходимый для прогрессирования опухолевого процесса [6]. В основе фенотипической функциональной поляризации макрофагов также лежит соотношение между альтернативными путями метаболизма аргинина — NO-синтазным и аргиназным, которое определяет их способность стимулировать клеточные (Th1-зависимые) или гуморальные (Th2-зависимые) иммунные реакции [7]. В связи с этим вещества, изменяющие этот баланс, могут быть использованы для модуляции противоопухолевого иммунного ответа.

Недавно обнаружено, что в регуляции NO-синтазы и продукции NO в нормальных гепатоцитах и различных линиях гепатокарцином играет важную роль Wnt/beta-catenin сигнальный путь, состояние которого селективно регулируется хлоридом лития [8]. Показано, что соли лития обладают иммуномодулирующими свойствами [9]. Наноразмерные частицы карбоната лития (НЧ Li_2CO_3) доступны для фагоцитоза, поскольку НЧ обладают высокоразвитой активной поверхностью, высокой сорбционной емкостью и благодаря своим размерам могут взаимодействовать и связываться с ними [10].

В связи с этим целью данного исследования является изучение продукции оксида азота и активности аргиназы в опухоли и перитонеальных макрофагах при развитии гепатокарциномы 29 (Г-29) в условиях введения НЧ Li_2CO_3 .

Исследование проведено на мышках-самцах линии СВА массой 18—20 г в возрасте 3 месяцев. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». В эксперименте использовано 3 группы животных. В 1 группу вошли интактные мыши. У животных 2 группы опухолевый процесс индуцировали инокуляцией клеток Г-29. Г-29 получена и верифицирована сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН [11] и любезно предоставлена для нашего исследования. Клетки Г-29 перевивали мышам линии СВА в брюшную полость, через 10 сут. забирали асцитическую жидкость, разводили в 10-кратном объеме 0,85% раствора NaCl и вводили по 0,1 мл интактным животным в мышцу правого бедра. Животным 3 группы после индукции опухолевого процесса вводили 1-кратно (3 сут.) и 5-кратно (7 и 13 сут.) 0,1 мл взвеси НЧ Li_2CO_3 в дозе 0,058 мг, приготовленной на стерильном 0,85% водном растворе NaCl. НЧ Li_2CO_3 диаметром 10—20 нм были получены путем механоактивации образцов в мельнице-активаторе планетарного типа АГО-2С (разработка ИХТТМ СО РАН, г. Новосибирск) при частоте вращения барабанов — 1820 об/мин¹ и центробежном ускорении — 400 м/с². Мелющими телами являлись стальные шары диаметром 8—10 мм. Масса шаров при загрузке одного барабана — 0,2—0,5 кг, навеска образца — 15—20 г, время обработки — 2 минуты. Перед приготовлением суспензии НЧ простерилизовали нагреванием до 100°C 90 мин. Размер НЧ Li_2CO_3 был определен с помощью электронного микроскопа [12]. Многократное внутримышечное введение было выбрано с целью направленной доставки НЧ Li_2CO_3 к месту инициации опухолевого процесса, что дало возможность использовать препарат в пониженной концентрации и ограничить токсическое влияние лития на почки. Забор материала производили на 3, 7 и 13 сут. после введения опухолевых клеток. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом кранио-цервикальной дислокации. Забор экспериментального материала выполняли в утренние часы.

Макрофаги для исследования получали методом перитонеального лаважа. Внутривенно вводили 7 мл среды 199 с 10 Ед/мл гепарина, через 2 мин культуральную среду, содержащую клетки перитонеального экссудата, извлекали с помощью шприца. Суспензии клеток отмывали средой 199 с 10 Ед/мл

Для корреспонденции: Макарова Ольга Петровна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. ультраструктурных исследований Института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН, e-mail: ormak@ngs.ru

гепарина центрифугированием в течение 10 мин при 1,5 тыс. об./мин. Клеточный осадок, полученный после центрифугирования, ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 15 мМ HEPES, 0,3% L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина. Для получения перитонеальных макрофагов (пМФ) клетки вносили в лунки 96-луночного планшета по $2,0 \times 10^5$ в объеме 200 мкл и инкубировали 2 ч (37°C , 5% CO_2), не прилипшую фракцию удаляли, дважды промывали свежей средой и продолжали инкубировать 18 ч. О продукции NO судили по содержанию нитритов в супернатантах клеточных культур. К 100 мкл супернатанта добавляли 100 мкл реактива Грисса, смешивали и через 15 мин измеряли количество продукта реакции на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США) при длине волны 540 нм [13].

Активность аргиназы определяли по скорости образования мочевины [14]. Макрофаги лизировали двукратным замораживанием и размораживанием, после чего к 50 мкл лизата добавляли 50 мкл 50 мМ Трис-HCl (pH 7,4) и 10 мкл 50 мМ раствора хлорида марганца. Аргиназу активировали нагреванием в термостате при 57°C в течение 10 мин, создавая влажную среду, смочив предварительно крышку планшета раствором Хэнкса, после чего к пробам добавляли по 100 мкл 0,5 М раствора L-аргинина и инкубировали их в течение 30 мин при 37°C . Реакцию останавливали помещением планшета на лед в холодильную камеру. Концентрацию мочевины определяли с использованием набора «Biosop» (Германия). Количество продукта реакции измеряли на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США) при длине волны 340 нм.

Для определения концентрации NO и активности аргиназы образцы опухоли и печени интактных животных гомогенизировали на холоде в гомогенизаторе Поттера в 2 мл 0,85% водного раствора NaCl, содержащего 0,1% ЭДТА, затем центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин, супернатанты замораживали при 18°C . Для определения NO гомогенат предварительно депротеинизировали добавлением 10% трихлоруксусной кислоты с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Определение уровней NO и активности аргиназы определяли выше описанными методами.

Для изучения образцов опухолевой ткани в просвечивающем режиме электронного микроскопа их фиксировали в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере (pH = 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35—45 нм на ультратоме Leica EM UC7, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010.

Результаты подвергали дисперсионному анализу ANOVA с последующей оценкой межгрупповых отличий по критерию Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

У животных 2-й группы на 7 сут. развития опухолевого процесса в правой мышце бедра после трансплантации клеток Г-29 уровень концентрации

Таблица

Изменение продукции NO и активности аргиназы в нормальной печени и гепатокарциноме при развитии опухолевого процесса в условиях введения наноразмерных частиц карбоната лития (Me, 25%—75%)

Показатели	Сроки исследования		
	3 сут.	7 сут.	13 сут.
1-я группа (8)			
NO (мкмоль/г ткани)	5,4 3,8—6,4		
Аргиназа (мкмоль мочевины/мин/г ткани)	3,04 2,48—4,35		
2-я группа			
NO (мкмоль/г ткани)	8,8 4,1—15,7	10,4* 8,6—11,6	7,6 6,0—12,3
Аргиназа (мкмоль мочевины/мин/г ткани)	0,78* 0,56—1,12 (4)	— (3)	0,18* 0,13—0,21 (3)
3-я группа			
NO (мкмоль/г ткани)	5,0 2,2—31,2	15,4*# 12,6—22,2	8,6 6,3—17,1
Аргиназа (мкмоль мочевины/мин/г ткани)	0,57 0,36—0,68 (4)	— (5)	0,42* 0,25—0,48 (4)

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с показателями в 1-й группе животных; # — $p < 0,05$ по сравнению с показателями в 3-й группе животных; в скобках указано количество животных.

NO в опухоли повышался в 1,9 раза по сравнению с уровнем в печени интактных мышей 1-й группы (таблица). По мере роста опухоли Г-29 в ней наблюдали постепенное существенное снижение активности аргиназы: на 3 сут. — в 3,9 раза и к 13 сут. в 16,8 раза по сравнению с уровнем активности этого фермента в нормальной печени (таблица). На 7 сут. в опухолевой ткани в 5,8 раза возрастала численная плотность макрофагов, по сравнению с контролем (рис. 2А).

Метаболические изменения в опухоли, сопровождающие ее рост, отражались на функциональном состоянии макрофагов перитонеальной полости. Так,

у животных 2-й группы после инокуляции опухолевых клеток Г-29 в мышечную ткань правого бедра повышалась способность пМФ образовывать NO (рис. 1А). Однако достоверный рост продукции NO наблюдали позднее к 7 сут., а в опухоли уже на 3 сут. (рис. 1А; таблица). На 7 сут. уровень NO в супернатантах культур пМФ увеличился в 2,8 раза и на 13 сут. — в 2,2 раза по сравнению с уровнем этого медиатора в супернатантах культур пМФ интактных животных 1-й группы (рис. 1А). При этом следует отметить, что увеличение продукции NO пМФ после инициации опухолевого процесса не приводило к изменению активности аргиназы в них (рис. 1Б).

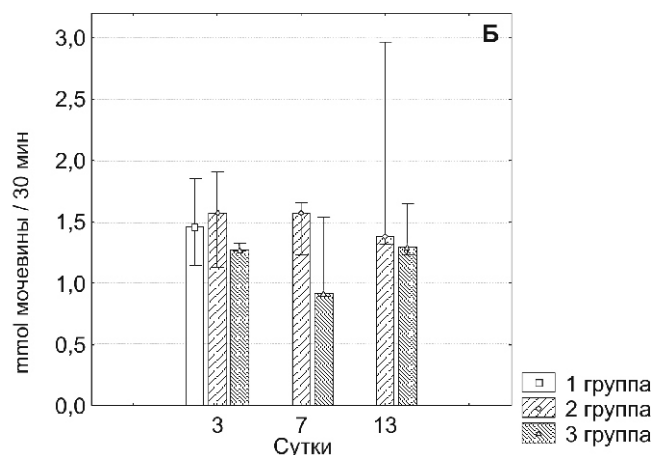
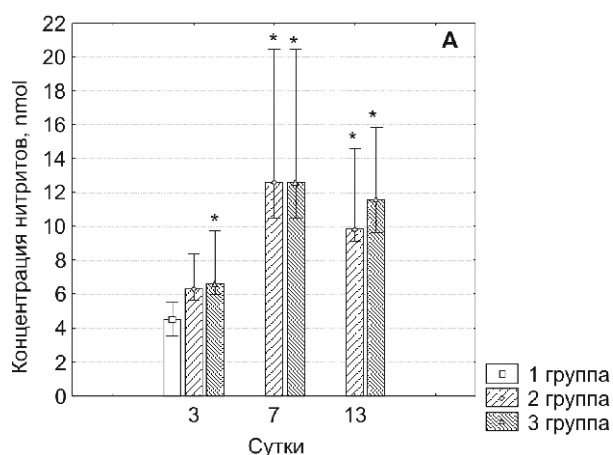


Рис. 1. Изменение показателей продукции NO перитонеальными макрофагами (А) и активности в них аргиназы (Б) при развитии гепатокарциномы 29 в мышечной ткани правого бедра в условиях введения наноразмерных частиц карбоната лития. Ме, 25%-75%; * — $p < 0,05$ по сравнению с 1-й группой интактных животных.

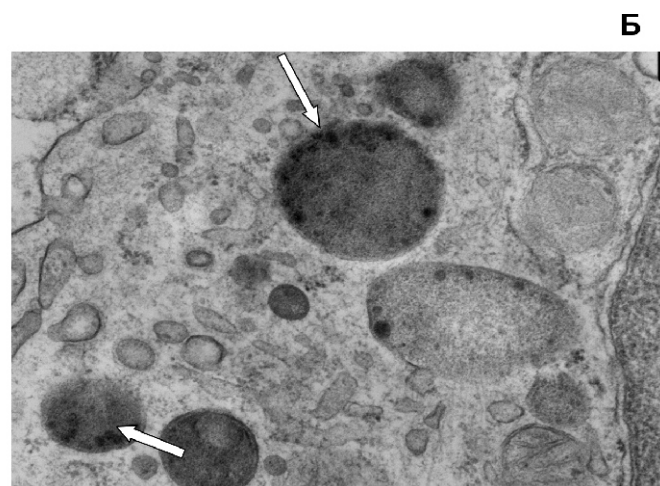
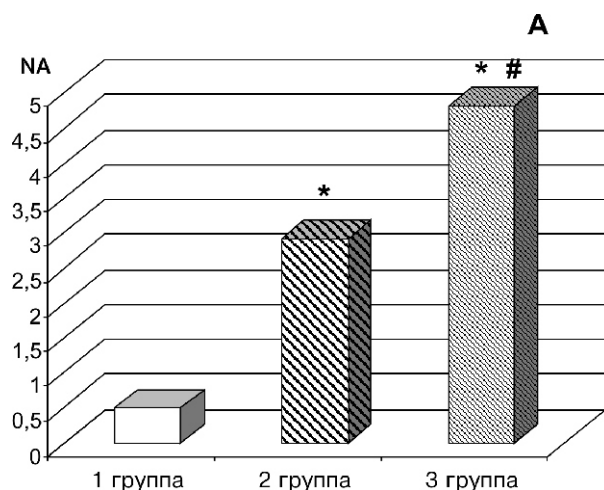


Рис. 2. Изменение численной плотности макрофагов и накопление в их цитоплазме наноразмерных частиц карбоната лития при развитии гепатокарциномы 29 в области бедра на 7-е сутки после пятикратного введения наноразмерных частиц карбоната лития:

А — возрастание численной плотности макрофагов после 5-кратного введения наноразмерных частиц карбоната лития по периферии опухолевого роста;

Б — наноразмерные частицы карбоната лития в фагосоме макрофага (светлые стрелки). Увеличение $\times 15000$.

* — $p < 0,05$ по сравнению с показателями в 1-й группе животных (интактный контроль); # — $p < 0,05$ по сравнению с показателями во 2-й группе животных с гепатокарциномой без введения наноразмерных частиц карбоната лития.

Однократное введение НЧ Li_2CO_3 после индукции опухолевого процесса (3 сут.) не влияло на рост концентрации NO в ткани гепатокарциномы (таблица). Однако после пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 на 7 сут. исследования уровень концентрации NO в опухолевой ткани увеличивался в 1,7 раза больше, чем у животных 2-й группы. После одно- и пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 уровень активности аргиназы в ткани гепатокарциномы также снижался, как и у мышей 2 группы: на 3 сут. в 5,3 раза, на 7 сут. в 7,2 раза по сравнению с контрольным уровнем в 1-й группе (таблица). При этом снижение активности аргиназы в опухолевой ткани у животных, получавших пятикратные инъекции НЧ Li_2CO_3 , происходило вдвое медленнее, чем у мышей 2-й группы. Так, на 13 сут. у животных 2-й группы уровень активности аргиназы в опухоли снижался 16,8 раза, а у мышей 3-й группы — в 7,2 по сравнению с уровнем активности данного фермента в нормальной печени животных 1-й группы. Следует отметить, что после пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 по периферии опухолевого роста макрофаги, присутствующие в опухоли, активно фагоцитировали частицы, наличие которых отмечали в фагосомах при электронной микроскопии (рис. 2Б). При этом происходило возрастание численной плотности макрофагов в опухолевой ткани. На 7 сут. после пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 численность макрофагов у мышей 3-й группы увеличивалась в 9,6 и 1,6 раза по сравнению с аналогичными значениями в 1-й и 2-й группах соответственно (рис. 2А).

Динамика увеличения уровня продукции NO пМф у мышей 3-й группы была сходной с таковой у животных 2-й группы (рис. 1А). Ни 2-, ни 5-кратное введение НЧ Li_2CO_3 после трансплантации клеток Г-29 в мышечную ткань не влияло на интенсивность образования NO пМф при развитии опухоли. Кроме того, введение НЧ Li_2CO_3 после инициации Г-29 в мышечной ткани бедра не влияло на активность аргиназы в пМф на всех сроках исследования по сравнению с аналогичными показателями у животных 1-й и 2-й групп (рис. 1Б).

Согласно полученным данным, развитие гепатокарциномы сопровождалось увеличением уровня NO и снижением активности аргиназы в ней. Вклад в повышение продукции NO могла внести миграция макрофагов в локус формирования опухолевого узла, приведшая к многократному увеличению их численной плотности в опухолевой ткани. Известно, что повышенная продукция NO приводит к увеличению внутриопухолевой микроциркуляции и снижению уровня гипоксии [3]. NO регулирует такие критические факторы, как гипоксия-индуцибельный фак-

тор-1 и p53, приводя к торможению роста опухоли и усилению апоптоза опухолевых клеток, а также повышая чувствительность клеток гепатомы к противоопухолевым препаратам [15]. Введение НЧ Li_2CO_3 после индукции гепатокарциномы заметно увеличивало численную плотность макрофагов и уровень продукции NO в опухоли. Показано, что хлорид лития — селективный ингибитор гликоген синтазы киназы 3β повышает уровень β -катенина в цитоплазме и ядре, экспрессию индуцибельной NO-синтазы и продукцию NO в нормальных гепатоцитах человека и крысы и клеточных линиях различных опухолей, включая гепатокарциному [8]. Снижение продукции NO в опухоли может привести к усилению прогрессии и метастазирования гепатокарциномы [16].

Анализ полученных данных свидетельствовал о том, что метаболические изменения в опухолевой ткани сопровождались усилением продукции NO дистантными макрофагами, к которым относятся макрофаги перитонеальной полости. пМф напрямую не принимают участие в развитии опухоли, но согласно современным представлениям эти клетки могут играть роль свидетелей, отражающих системный иммунный ответ на рост опухоли в целом. Недавно обнаружено, что периферические макрофаги не обладают свойствами ни M1, ни M2 фенотипа: показывают обратную регуляцию NF- κ B-зависимых провоспалительных сигнальных путей и продукции ИЛ-12 и не проявляют типичных маркеров M2 фенотипа, а именно повышенной экспрессии ИЛ-10 и аргиназы [17]. Наши данные согласуются с результатами, полученными Kisseleva E.P. et al. [18]. В этом исследовании у мышей после подкожного введения клеток гепатомы 22a в область спины на 3 сут. уровень продукции NO пМф был снижен, но к 7 сут. он существенно превышал контрольные показатели. Согласно нашим данным, в ранний период развития Г-29 (3 сут) пМф продуцируют NO в пределах контрольных значений, а на 7 и 13 сут. значительно больше, но при этом в них не отмечается активации аргиназы. Введение НЧ Li_2CO_3 после индукции гепатокарциномы 29 в мышечной ткани правого бедра, не оказывало влияния на функциональное состояние дистантных пМф и не способствовало поляризации их фенотипа.

Таким образом, эффекты НЧ Li_2CO_3 , вводимых после трансплантации опухолевых клеток Г-29, связаны с усилением NO-синтазного пути в опухолевой ткани и макрофагах перитонеальной полости, что может способствовать снижению концентрации аргинина, необходимого для роста гепатокарциномы.

Список литературы

1. Phillips M.M., Sheaff M.T., Szlosarek P.W. Targeting Arginine-Dependent Cancers with Arginine-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges. *Cancer Res Treat.* 2013; 45(4): 251-62.
2. Yin X.Y., Jiang J.M., Liu J.Y., Zhu J.R. Effects of endogenous nitric oxide induced by 5-fluorouracil and L-Arg on liver carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(46): 6249-53.
3. Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, et al. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437(3): 420-25.
4. Cheng P.N., Lam T.L., Lam W.M., Tsui S.M., Cheng A.W., Lo W.H., et al. Pegylated recombinant human arginase (rhArgpeg5,000mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Res.* 2007; 67(1):309-17.
5. Chow A.K., Ng L., Sing Li H., Cheng C.W., Lam C.S., Yau T.C., et al. Anti-tumor efficacy of a recombinant human arginase in human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12(9): 1233-43.
6. Capece D., Fischietti M., Verzella D., Gaggiano A, Ciccirelli G, Tessitore A, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res. Int.* 2013, 2013;2013:187204. doi: 10.1155/2013/187204. Epub 2012 Dec 30. Available at: <http://doi.org/10.1155/2013/187204>
7. Михайленко А.А., Коненков В.И., Базанов Г.А., Покровский В.И. *Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии.* М.: Триада; 2005.
8. Du Q., Park K.S., Guo Z., Park K.S., Geller D.A. Regulation of human nitric oxide synthase 2 expression by Wnt beta-catenin signaling. *Cancer Res.* 2006; 6(14): 7024-31.
9. Raghavendra P.B., Lee E., Parameswaran N. Regulation of macrophage biology by lithium: a new look at an old drug. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 9(3): 277-84.
10. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
11. Каледин В.И., Жукова Н.А., Николин В.П., Попова Н.А., Беляев М.Д., Багинская Н.В. и др. Гепатокарцинома Г-29 — метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2009; 148(12): 664-69.
12. Бгатовая Н.П., Макарова О.П., Пожидаева А.А.Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н., Коненков В.И. Биологические эффекты наноразмерных частиц лития. *Успехи наук о жизни.* 2012; 5: 29-46.
13. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1984; 126(1): 131-8.
14. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micro-method. *J. Immunol. Methods.* 1994; 174(1-2): 231-5.
15. Muntane J., De la Rosa A.J., Marin L.M., Padillo F.J. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion.* 2013; 13(3): 257-62.
16. Zhou L., Wang Y., Tian D.A., Yang J., Yang Y.Z. Decreased levels of nitric oxide production and nitric oxide synthase-2 expression are associated with the development

and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2012; 6(6): 1261-6.

17. Torroella-Kouri M., Silvera R., Rodriguez D., Caso R, Shatry A, Opiela S, et al. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Research.* 2009; 69(11): 4800-9.

18. Kisseleva E.P., Lrylov A.V., Stepanova O.I., Liodyno V.I. Transplantable subcutaneous hepatoma 22a affects functional activity of resident tissue macrophages in periphery. *J Cell Biol.* 2011;2011:793034. Article ID 793034, 14 pages. doi:10.1155/2011/793034.

Поступила 10.07.14

References

1. Phillips M.M., Sheaff M.T., Szlosarek P.W. Targeting Arginine-Dependent Cancers with Arginine-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges. *Cancer Res Treat.* 2013; 45(4): 251-62.
2. Yin X.Y., Jiang J.M., Liu J.Y., Zhu J.R. Effects of endogenous nitric oxide induced by 5-fluorouracil and L-Arg on liver carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(46): 6249-53.
3. Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, et al. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437(3): 420-25.
4. Cheng P.N., Lam T.L., Lam W.M., Tsui S.M., Cheng A.W., Lo W.H., et al. Pegylated recombinant human arginase (rhArgpeg5,000mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Res.* 2007; 67(1):309-17.
5. Chow A.K., Ng L., Sing Li H., Cheng C.W., Lam C.S., Yau T.C., et al. Anti-tumor efficacy of a recombinant human arginase in human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12(9): 1233-43.
6. Capece D., Fischietti M., Verzella D., Gaggiano A, Ciccirelli G, Tessitore A, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res. Int.* 2013, 2013; 2013:187204. doi: 10.1155/2013/187204. Epub 2012 Dec 30. Available at: <http://doi.org/10.1155/2013/187204>
7. Mikchailenko A.A, Konenkov V.I., Bazanov G.A., Pokrovsky V.I. *Handbook of Clinical Immunology, Allergy, Immunogenetics and Immunopharmacology.* Moscow: Triada; 2005 (in Russian)
8. Du Q., Park K.S., Guo Z., Park K.S., Geller D.A. Regulation of human nitric oxide synthase 2 expression by Wnt beta-catenin signaling. *Cancer Res.* 2006; 6(14): 7024-31.
9. Raghavendra P.B., Lee E., Parameswaran N. Regulation of macrophage biology by lithium: a new look at an old drug. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 9(3): 277-84.
10. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
11. Kaledin V.I., Zhukova N.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Belyaev M.D., Baginskaya N.V. et al. Hepatocarcinoma-29, a Metastasizing Transplantable Mouse Tumor Inducing Cachexia. *Bull. Experim. Biol. Med.* 2009; 148(12): 664-9. (in Russian)
12. Bgatova N.P., Borodin Yu.I., Makarova V.V., Pozhidaeva A.A., Rachkovskaya L.N., Konenkov V.I. Effects of Nanosized Lithium Carbonate Particles on Intact Muscle

Tissue and Tumor Growth. *Bull. Experim. Biol. Med.* 2014. 157 (1): 102-7. (in Russian)

13. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1984; 126(1): 131-8.

14. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micro-method. *J. Immunol. Methods.* 1994; 174(1-2): 231-5.

15. Muntane J., De la Rosa A.J., Marin L.M., Padillo F.J. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion.* 2013; 13(3): 257-62.

16. Zhou L., Wang Y., Tian D.A., Yang J., Yang Y.Z. Decreased levels of nitric oxide production and nitric oxide synthase-2 expression are associated with the development

and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2012; 6(6): 1261-6.

17. Torroella-Kouri M., Silvera R., Rodriguez D., Casso R, Shatry A, Opiela S, et al. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Research.* 2009; 69(11): 4800-9.

18. Kisseleva E.P., Lrylov A.V., Stepanova O.I., Liodyno V.I. Transplantable subcutaneous hepatoma 22a affects functional activity of resident tissue macrophages in periphery. *J Cell Biol.* 2011; 2011:793034. Article ID 793034, 14 pages. doi:10.1155/2011/793034.

Received 10.07.14

Сведения об авторах:

Коненков Владимир Иосифович, акад. РАН, доктор мед. наук, директор НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

Бородин Юрий Иванович, акад. РАН, доктор мед. наук, науч. консультант НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

Бгатова Наталия Петровна, доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. ультраструктурных исследований Института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

Рачковская Любовь Никифоровна, канд. хим. наук, руководитель лаб. биологически активных соединений НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН