

Калиш С.В.¹, Буданова О.П.², Лямина С.В.¹, Малышев И.Ю.^{1,2}

Генетические особенности систем генерации оксида азота определяют устойчивость организма к развитию карциномы

¹ — Московский Государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Министерство образования и науки России, 127473, Москва

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва

Предрасположенность к опухоли часто определяется тем, насколько эффективно генотип индивида формирует иммунную защиту. Важным фактором такой защиты является макрофагальный NO. Мы предположили, что уязвимость организма к развитию опухоли может определяться генетическими особенностями систем генерации NO. Содержание NO в опухоли изменяли с помощью ИТУ, ингибитора iNOS, с-PTIO, ловушки NO и SNP, донора NO. Продукцию NO макрофагами оценивали по нитритам в культуральной среде. iNOS оценивали с помощью Western blot анализ. Фенотип макрофагов оценивали с помощью цитофлуориметрии по CD маркерам. Данные опытов показали, что продолжительность жизни мышей C57BL/6N с опухолью Эрлиха была на 25% больше, чем у C57BL/6J. Снижение содержания NO в опухоли снижало продолжительность жизни высокоустойчивой к опухоли сублинии C57BL/6N на 23%. Повышение содержания NO повышало продолжительность жизни низкоустойчивой сублинии C57BL/6J на 26%. Макрофаги C57BL/6N, имели в 1,5 раза более высокую продукцию NO и содержание iNOS, по сравнению с макрофагами C57BL/6J. CD маркеры фенотипа определили фенотип макрофагов C57BL/6N как M1, а фенотип макрофагов C57BL/6J как M2. Таким образом, уязвимость организма к развитию опухоли может определяться генетическими особенностями систем генерации макрофагального NO. C57BL/6J, в отличие от C57BL/6N не синтезируют NNT (nicotinamide nucleotide transhydrogenase) и имеют различия в однонуклеотидном полиморфизме. Важная роль NO в устойчивости к карциноме, NNT и однонуклеотидный полиморфизм заслуживают внимания при разработке новых методов противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: C57BL/6N; C57BL/6J; фенотип M1 и M2; макрофаги; NO; ловушки NO; доноры NO, блокаторы NO-синтазы, карцинома Эрлиха; опухоль

Kalish S.V.¹, Budanova O.P.², Lyamina S.V.¹, Malyshev I.Yu.^{1,2}

Genetic features of nitric oxide generating systems predetermine the body's resistance to the development of carcinoma

¹ — Moscow State medical stomatological University. A.I. Evdokimova. The Ministry of education and science of Russia. 127473, Moscow, Russia

² — Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of general pathology and pathophysiology», 125315, Moscow, Russia

Predisposition to tumors is often determined by how effectively the genotype of an individual forms an immune defense. An important factor of such protection is macrophage NO. We assumed that the body's vulnerability to the development of tumors may depend from the characteristics of the NO generating systems. The content of NO in the tumor changed by ИТУ, inhibitor of iNOS, c-PTIO, traps and SNP, donor NO. Production of macrophage NO were evaluated by nitrites in the culture media. iNOS was assessed using the Western blot analysis. Phenotype of macrophages was assessed using cytometry for CD labels. Life span of mice C57BL/6N with Ehrlich tumor was 25% greater than that of the C57BL/6J. Reducing the content of NO in the tumor reduced life expectancy of high-resistance to tumor subline C57BL/6N at 23%. Increase of NO increased life expectancy of low-resistance subline C57BL/6J at 26%. Macrophages of C57BL/6N were 1.5 times higher contents of iNOS and NO production, as compared with macrophages of C57BL/6J. CD phenotype markers determined the macrophage phenotype C57BL/6N as M1 and C57BL/6J mice macrophage phenotype as M2. Thus, the body's vulnerability to the development of tumors may depend from the characteristics of the NO generating systems. C57BL/6J, unlike C57BL/6N does not synthesize NNT (nicotinamide nucleotide transhydrogenase) and have differences in the single nucleotide polymorphism (SNP). The important role of NO in the resistance to Carcinoma, NNT and SNP deserve attention in the development of new methods of antitumor therapy.

Key words: C57BL/6N; C57BL/6J; M1 and M2 phenotype; macrophages; NO; NO traps; NO donor; NOS inhibitors; Ehrlich carcinoma; tumor

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, зав. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Несмотря на успехи в области фармакологического лечения, онкологические заболевания, по-прежнему, имеют серьезные социальные и экономические последствия. В связи с этим, понимание молекулярных и клеточных механизмов канцерогенеза и обоснование новых эффективных способов ограничения опухолевого роста является одной из фундаментальных проблем современной медицины.

Уязвимость организма к развитию опухоли определяется многими факторами, среди которых генетическая предрасположенность часто играет ключевую роль [1—3]. В свою очередь генетическая предрасположенность к развитию опухолей определяется тем, насколько эффективно генотип индивида или вида формирует противоопухолевую иммунную защиту. Одним из важных факторов такой защиты является оксид азота (NO) и соответственно эффективность систем генерации NO [4, 5—7].

В совокупности это позволяет нам выдвинуть гипотезу, о том, что уязвимость организма или вида к развитию опухоли может предопределяться генетическими особенностями систем генерации NO. Цель работы состояла в проверке этой гипотезы.

Для достижения этой цели мы решили три задачи:

1) оценили уязвимость к развитию опухоли Эрлиха мышей разных генетических сублиний, а именно C57BL/6J и C57BL/6N;

2) с помощью ловушек NO, блокаторов индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и доноров NO. Оценили, насколько важна роль NO в различиях уязвимости мышей разных генетических сублиний к развитию опухоли;

3) оценили мощность систем генерации NO у макрофагов, основных продуцентов иммуногенного NO.

Методика

Экспериментальные животные

Работа была проведена на мышах двух генетически различных сублиний линии C57BL/6: C57BL/6J (15 мышей) и C57BL/6N (15 мышей). C57BL/6J были получены в питомнике животных «Андреевка» (<http://andreevka.msk.ru/index.htm>), а C57BL/6N — в питомнике «Пуццино» (<http://www.spf-animals.ru>). Эксперименты проводились в соответствии с руководством ВОЗ для биомедицинских исследований на животных (http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm).

Опухоль Эрлиха

Опухолевый рост инициировали с помощью внутрибрюшинного введения клеток асцитной карциномы Эрлиха. Клетки опухоли были получены в «Россий-

ском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина». Мышам, внутрибрюшинно вводили 250 тысяч опухолевых клеток, разведенных в 0,2 мл физиологического раствора. Каждый день, до момента гибели, мышей взвешивали. Устойчивость мышей к карциноме Эрлиха оценивали по продолжительности жизни после введения опухолевых клеток и по изменению веса животных, которое отражало накопление асцита в брюшной полости.

Препараты, влияющие на содержание NO

Для изменения содержания NO в зоне опухоли использовали ITU (S-(2-aminoethyl isothioure), селективный ингибитор iNOS, в концентрации 10 мг/кг, с-PTIO ([2-4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxil-3-oxide]), ловушку NO, которая не проникает через клеточную мембрану и не входит в клетку [8], в дозе 200 мкмоль и нитропруссид натрия (sodium nitroprusside SNP), донор NO [9], в дозе 200 мкмоль. Препараты вводили внутрибрюшинно на 3, 7, 12 дни после привития опухоли. Эти дни соответствовали началу лаг, лог и терминальной фаз роста асцитной карциномы Эрлиха.

Оценка систем генерации NO макрофагов

Для оценки макрофагальной продукции NO, из мышей выделяли перитонеальные макрофаги [10]. После выделения, макрофаги размещали в плоскодонные лунки 48-луночных культуральных планшетов в среде RPMI-1640 с 10% сывороткой с 100 U/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина при 37°C и 5% CO₂. Макрофаги распределяли из расчета 0,5 млн клеток на лунку в 0,5 мл среды. Для оценки базальной продукции NO, макрофаги культивировали 24 часа, а для оценки стимулированной — добавляли липополисахарид (ЛПС) в концентрации 500 нг/мл на 24 часа. После этого оценивали продукцию NO макрофагами спектрофотометрически, по содержанию нитритов в культуральной среде с помощью реакции Грисса [11] и содержание iNOS с помощью стандартного метода Western blot анализ [12] и антител к iNOS (iNOS antibodies rabbit polyclonal (KAS-N0001, Assay Designs, USA).

Оценка фенотипа макрофагов

Фенотип макрофагов оценивали по продукции NO и содержанию iNOS, а также с помощью поверхностно-клеточных маркеров M1 фенотипа CD25 и CD80 и маркеров M2 фенотипа CD163 и CD206 [13]. Для определения маркеров использовали метод проточной цитофлуориметрии и моноклональные антитела к CD80 и CD25 (Beckman Coulter) и к CD163 и CD206 (Beckman Coulter CD163 и BD Pharmingen CD206) [13]. Подготовка проб макрофа-

гов для анализа проводилась по инструкциям производителя. Оценивали процентное содержание маркеров M1 и M2 фенотипов среди всех макрофагов. Увеличение продукции NO, содержания iNOS и CD маркеров M1 фенотипа свидетельствовало о формировании M1 фенотипа, а снижение продукции NO и содержания iNOS и увеличение CD маркеров M2 фенотипа свидетельствовало о формировании M2 фенотипа [13].

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 8.0 (Statsoft). Данные представлены в виде средних значений полученных показателей (M) и их ошибок ($\pm m$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. Мыши C57BL/6N

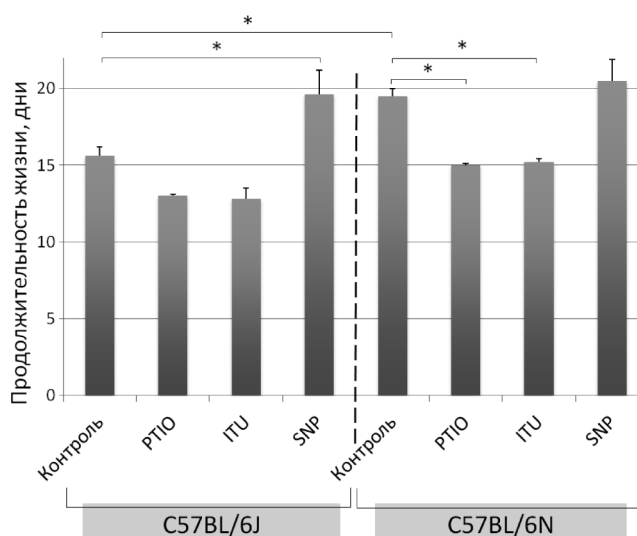
более устойчивы к карциноме Эрлиха по сравнению с мышами C57BL/6J

После введения опухолевых клеток продолжительность жизни мышей сублинии C57BL/6J составила $15,6 \pm 0,6$ дней, тогда как у C57BL/6N — $19,5 \pm 0,5$ дней ($p < 0,01$), то есть была на 25% дольше. Токсическое действие карциномы Эрлиха проявлялось у обеих сублиний увеличением асцита в брюшной полости, и соответственно увеличением веса животных. Однако у мышей сублинии C57BL/6N увеличение веса к 10 дню развития опухоли, по сравнению с первым днем составило лишь $6,5 \pm 1,1\%$, тогда как у C57BL/6J — $12,7 \pm 1,8\%$ ($p < 0,01$), то есть было почти в два раза больше.

Таким образом, мыши сублинии C57BL/6N оказались достоверно более устойчивыми к развитию асцитной карциномы Эрлиха, по сравнению с мышами сублинии C57BL/6J по параметрам продолжительности жизни и накопления асцитической жидкости в брюшной полости.

2. Увеличение содержания NO в зоне опухоли увеличивает, а снижение — снижает продолжительность жизни мышей с карциномой Эрлиха

Гистограммы на рисунке показывают, как изменение содержания NO в зоне роста опухоли влияет на продолжительность жизни мышей. Видно, что снижение содержания NO с помощью ловушки NO, PTIO или с помощью блокатора iNOS, ITU приводит к достоверному снижению продолжительности жизни высокоустойчивой сублинии мышей C57BL/6N с опухолью на 23% ($p < 0,01$). С другой стороны, также видно, что повышение содержания NO с помощью донора NO, SNP приводит к достоверному повышению продолжительности жизни низ-



Влияние изменения содержания NO в зоне роста опухоли на продолжительность жизни мышей.

Снижение содержания NO проводили с помощью ловушки NO, PTIO или с помощью блокатора iNOS, ITU.

Повышение содержания NO проводили с помощью донора NO, SNP. NO — оксид азота; PTIO — ([2-4-carboxyphenyl]-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxil-3-oxide) — ловушка NO; ITU — (S-(2-aminoethyl isothioureia) — блокатор NO; SNP — sodium nitroprusside — донор NO; C57BL/6N и C57BL/6J — сублинии мышей.

По оси ординат — продолжительность жизни, дни. Достоверность отличий между сублиниями мышей: * — $p < 0,01$

коустойчивой сублинии мышей C57BL/6J с опухолью на 26% ($p < 0,01$). При этом ни один из препаратов, модулирующих содержание NO в зоне опухоли, практически не влиял на накопление асцита в брюшной полости мышей (данные не показаны).

Полученные результаты согласуются с гипотезой о важной роли NO в генетически-детерминированном механизме, который определяет продолжительность жизни после начала развития опухоли.

3. Макрофаги мышей с большей устойчивостью к карциноме Эрлиха генерируют больше базального и индуцированного NO, по сравнению с макрофагами мышей с меньшей устойчивостью

Основными продуцентами иммуногенного антиопухолевого NO являются макрофаги. Данные таблицы 1 показывают, что перитонеальные макрофаги высокоустойчивой к опухоли сублинии мышей C57BL/6N, имеют примерно в 1,5 раза более высокую базальную и стимулированную продукцию NO, по сравнению с макрофагами низкоустойчивой к опухоли сублинии мышей C57BL/6J. Этим различиям в продукции макрофагального NO соответствует более высокое содержание iNOS в макрофагах мышей C57BL/6N, по сравнению с C57BL/6J (данные на вставке в таблице).

Высокая продукция NO и содержание iNOS являются маркерами провоспалительного M1 фенотипа макрофагов [13]. На этом основании фенотип макрофагов C57BL/6N можно определить как M1, а фенотип макрофагов C57BL/6J, с более низкой продукцией NO — как M2. Таковую фенотипическую принадлежность подтверждают CD маркеры фенотипа макрофагов. Макрофаги C57BL/6N имели на своей поверхности больше маркеров M1 фенотипа, CD25 и CD80, и меньше маркеров M2 фенотипа, CD163 и CD206, по сравнению с макрофагами C57BL/6J.

Полученные данные согласуются с исходной гипотезой о том, что уязвимость организма или вида к развитию опухоли может предопределяться генетическими особенностями систем генерации NO. NO играет в канцерогенезе двойственную роль. Так с одной стороны показано, что NO может индуцировать апоптоз, благодаря подавлению синтеза антиапоптотического Bcl-2 и увеличению экспрессии проапоптотического Bax и p53 [14], и таким образом обладать антиопухолевым действием. Однако, с другой стороны, NO, благодаря например нитрозилированию каспаз [15, 16] и/или активации синтеза HSP70 [17] может ограничивать развитие апоптоза в опухолевых клетках [18] и соответственно обладать проопухолевым действием. Локальная концентрация NO и свободных радикалов в зоне опухоли определяет, каким образом NO и его метаболиты будут взаимодействовать

с ДНК, с системами репарации ДНК, опухолевым супрессором p53, другими активаторами и ингибиторами апоптоза. Эти взаимодействия, в свою очередь, будут формировать про или анти опухолевые эффекты NO [6].




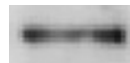
Очевидно, что в наших экспериментах у мышей C57BL/6J и C57BL/6N при развитии опухоли Эрлиха реализовался антиопухолевый эффект NO, так как ловушка NO и блокатор iNOS приводили к снижению продолжительности жизни мышей обеих сублиний после введения опухолевых клеток, а введение донора NO, напротив, увеличивало продолжительность жизни (рисунок).

В ходе иммунного ответа, главным источником синтеза NO являются макрофаги. Макрофаги могут ограничивать рост опухолевых клеток не только за счет продукции NO [19, 20], но также и за счет других механизмов, таких, как увеличение продукции провоспалительных цитокинов [20], свободных радикалов [19] или презентации опухолевых антигенов и формирования Th1 и цитотоксических лимфоцитов [21, 22]. Вместе с тем, тот факт, что селективное блокирование iNOS макрофагов снижает продолжительность жизни мышей с опухолью (рисунок) свидетельствует о важной роли макрофагального NO в антиопухолевой защите.

Наши экспериментальные данные не дают возможность прямо ответить на вопрос, какой механизм определяет генетически-обусловленную более высо-

Таблица

Базальная и стимулированная продукция NO и содержание iNOS в макрофагах, выделенных из высокоустойчивой сублинии C57BL/6N и низкоустойчивой к опухоли сублинии C57BL/6J. На вставках представлены иммунограммы Вестерн блот анализа: интенсивность окрашивания черной полосы соответствует содержанию iNOS в макрофагах

Сублиния	Продолжительность жизни после введения опухоли, дни	Показатели систем генерации NO	
		Базальные условия	Стимулирующие условия
C57BL/6N	19,5 ± 0,5	Нитриты, мкмоль	
		45,7 ± 1,34	74,4 ± 1,26
		iNOS	
		Базальные условия	Стимулирующие условия
			
C57BL/6J	15,6 ± 0,6*	Нитриты, мкмоль	
		29,6 ± 1,43*	52,2 ± 1,28*
		iNOS	
		Базальные условия	Стимулирующие условия
			

Примечание. Достоверность различий между сублиниями мышей: * — $p < 0,001$

кую мощность систем генерации NO макрофагов C57BL/6N, по сравнению с макрофагами C57BL/6J. Вместе с тем, поскольку обе сублинии имеют общее происхождение (от линии C57BL/6), весьма вероятно, что различие в механизмах синтеза NO связано с небольшими отличиями в генотипе этих сублиний. Генетические исследования показали, что генотипы C57BL/6J и C57BL/6N имеют два важных отличия.

Первое отличие. Мыши C57BL/6J, в отличие от C57BL/6N, имеют небольшую делецию в гене никотинамид нуклеотид трансгидрогеназы (nicotinamide nucleotide transhydrogenase, NNT) и поэтому не синтезируют белок NNT [23]. NNT является митохондриальным протонным насосом, который кодируется ядерной ДНК. Отсутствие NNT приводит к нарушению гомеостаза глюкозы и снижению секреции инсулина [23]. В макрофагах, как показали Ripoll et al. [24], NNT играет роль регулятора воспалительных ответов, продукции свободных радикалов и синтеза NO.

Второе отличие. Mekada et al. [25] и Zurita et al. [26] обнаружили различия в однонуклеотидном полиморфизме (SNP) ДНК этих сублиний.

Можно предположить, что различия в механизмах генерации NO и уязвимости к развитию опухоли связаны с отсутствием/присутствием белка NNT и/или различиями в SNP. Это предположение требует тщательного изучения.

Необходимо также учитывать, что в зоне опухоли создаются условия гипоксии и репрограммирование макрофагов может быть связано и с этим фактором [27, 28]. Вместе с тем, сам факт важной роли NO в увеличении продолжительности жизни при наиболее агрессивном виде опухоли карциноме, делает перспективным поиск новых подходов к лечению опухолей с помощью манипулирования NO в зоне опухоли. Сопоставление наших данных и анализ литературы, показывает, что ген и белок NNT и различия в SNP, обнаруженные у разных сублиний C57BL/6 также заслуживают внимания при разработке новых методов противоопухолевой терапии.

Исследования были проведены при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки России (Соглашение от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0020, Уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEF160414X0020).

Список литературы

1. Cybulski C, Nazarali S, Narod SA. Multiple primary cancers as a guide to heritability. *Int J Cancer*; 2014 Oct 15; 135(8): 1756-63.
2. Demichelis F, Stanford JL. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urol Oncol*. 2014 Jul 1. pii: S1078-1439(14)00163-X.
3. Lochhead P, Chan AT, Nishihara R, Fuchs CS, Beck AH, Giovannucci E, Ogino S. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Mod Pathol*. 2015 Jan; 28(1):14-29.
4. Bellin D1, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013 Mar; 26(3): 271-7.
5. Buijs N, Luttkikh J, Houdijk AP, van Leeuwen PA. The role of a disturbed arginine/NO metabolism in the onset of cancer cachexia: a working hypothesis. *Curr Med Chem*. 2012; 19 (31): 5278-86.
6. Engin AB. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis, reappraisal. *Curr Drug Metab*. 2011 Nov; 12 (9): 891-9.
7. Korde Choudhari S, Sridharan G, Gadbaill A, Poornima V. Nitric oxide and oral cancer: a review. *Oral Oncol*. 2012 Jun; 48(6): 475-83.
8. Akaike T. and Maeda H. Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxide 3-oxide (PTIO). *Methods. Enzymol*. 1996; 268:211-21.
9. Wang J, He Q, Yan X, Cai Y, Chen J. Effect of exogenous nitric oxide on sperm motility in vitro. *Biol Res*. 2014 Sep 18; 47 (1): 44.
10. Xia Zhang, Ricardo Goncalves and David M. Mosser. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol*. 2008 November; CHAPTER: Unit-14.1.
11. Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S. et al. Lung tumor growth is stimulated in IFN- γ -/- mice and inhibited in IL-4-R α -/- mice; *Anticancer Research*. 2009; 29(12): 5095-101.
12. Smith F.S., Titheradge M.A. Nitric oxide protocols. *Methods in molecular biology*. 1998; 100: 171-80
13. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 1(13): 453-61.
14. Zeini M1, Traves PG, Lopez-Fontal R, Pantoja C, Matheu A, Serrano M, Bosca L, Hortelano S. Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *J Immunol*. 2006 Sep 1; 177(5): 3327-36.
15. Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2005 Jan; 38(1):163-74. Epub 2004 Dec 8.
16. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res*. 2002 Mar 15; 62(6):1648-53.
17. Malyshev IYu, Malugin AV, Golubeva LYu, Zenina TA, Manukhina EB, Mikoyan VD, Vanin AF. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett*. 1996 Aug 5; 391(1-2):21-3.
18. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013 Jun; 34(6):1181-8. Epub 2013 Apr 4.
19. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.
20. Lum HD, Buhtoiarov IN, Schmidt BE, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL. Tumoristatic ef-

fects of anti-CD40 mAb-activated macrophages involve nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Immunology*, 2006; 118 (2):261-70.

21. Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jngerkes F, Tting T et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107 (1):216-21.

22. Barrio MM, Abes R, Colombo M, Pizzurro G, Boix C, Roberti MP et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS One*, 2012; 7 (7):e40311

23. Toye AA1, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005 Apr; 48 (4):675-86. Epub 2005 Feb 24.

24. Ripoll VM1, Meadows NA, Bangert M, Lee AW, Kadioglu A, Cox RD. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) acts as a novel modulator of macrophage inflammatory responses. *FASEB J*. 2012 Aug; 26(8):3550-62. Epub 2012 May 16.

25. Mekada K1, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*. 2009 Apr; 58(2):141-9.

26. Zurita E1, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, Gonzalez-Neira A, Lopez-Jimenez A, et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res*. 2011 Jun; 20 (3):481-9. Epub 2010 May 27.

27. Малышев И.Ю. Гипоксия и репрограммирование иммунного ответа при развитии опухоли: центральная роль макрофагов. *Патогенез*. 2011;(3): 44-5.

28. Малышев И.Ю., Круглов С.В., Лямина С.В. Гипоксия, воспаление и фенотипическая пластичность макрофагов: центральная роль HIF-1 и NFkB. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012;(3): 42-50.

Поступила 26.02.15

References

1. Cybulski C, Nazarali S, Narod SA. Multiple primary cancers as a guide to heritability; *Int J Cancer*; 2014 Oct 15; 135(8):1756-63.

2. Demichelis F, Stanford JL. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urol Oncol*. 2014 Jul 1. pii: S1078-1439(14)00163-X.

3. Lochhead P, Chan AT, Nishihara R, Fuchs CS, Beck AH, Giovannucci E, Ogino S. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Mod Pathol*. 2015 Jan; 28(1):14-29.

4. Bellin D1, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013 Mar; 26(3):271-7.

5. Buijs N, Luttkhold J, Houdijk AP, van Leeuwen PA. The role of a disturbed arginine/NO metabolism in the onset of cancer cachexia: a working hypothesis. *Curr Med Chem*. 2012; 19 (31): 5278-86.

6. Engin AB. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis, reappraisal. *Curr Drug Metab*. 2011 Nov; 12 (9): 891-9.

7. Korde Choudhari S, Sridharan G, Gadbaill A, Poornima V. Nitric oxide and oral cancer: a review. *Oral Oncol*. 2012 Jun; 48(6): 475-83.

8. Akaike T. and Maeda H. Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (PTIO). *Methods. Enzymol*. 1996; 268: 211-21.

9. Wang J, He Q, Yan X, Cai Y, Chen J. Effect of exogenous nitric oxide on sperm motility in vitro. *Biol Res*. 2014 Sep 18; 47 (1):44.

10. Xia Zhang, Ricardo Goncalves and David M. Mosser. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol*. 2008 November; CHAPTER: Unit-14.1.

11. Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S. et al. Lung tumor growth is stimulated in IFN- γ -/- mice and inhibited in IL-4-R α -/- mice; *Anticancer Research*. 2009; 29(12): 5095-101.

12. Smith F.S., Titheradge M.A. Nitric oxide protocols. *Methods in molecular biology*. 1998; 100: 171-80/

13. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 1(13): 453-61.

14. Zeini M1, Traves PG, Lopez-Fontal R, Pantoja C, Matheu A, Serrano M, Bosca L, Hortelano S. Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *J Immunol*. 2006 Sep 1; 177(5): 3327-36.

15. Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2005 Jan; 38(1):163-74. Epub 2004 Dec 8.

16. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res*. 2002 Mar 15; 62(6):1648-53.

17. Malyshev IYu, Malugin AV, Golubeva LYu, Zenina TA, Manukhina EB, Mikoyan VD, Vanin AF. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett*. 1996 Aug 5; 391(1-2):21-3.

18. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013 Jun; 34(6):1181-8. Epub 2013 Apr 4.

19. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.

20. Lum HD, Buhtoiarov IN, Schmidt BE, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL. Tumoristatic effects of anti-CD40 mAb-activated macrophages involve nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Immunology*. 2006; 118 (2): 261-70.

21. Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jngerkes F, Tting T et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107 (1):216-21.

22. Barrio MM, Abes R, Colombo M, Pizzurro G, Boix C, Roberti MP et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS One*, 2012; 7 (7):e40311

23. Toye AA1, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005 Apr; 48 (4):675-86. Epub 2005 Feb 24.

24. Ripoll VM1, Meadows NA, Bangert M, Lee AW, Kadioglu A, Cox RD. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) acts as a novel modulator of macrophage inflammatory responses. *FASEB J*. 2012 Aug; 26(8):3550-62. Epub 2012 May 16.

25. Mekada K1, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim.* 2009 Apr; 58(2): 141-9.

26. Zurita E1, Chagoen M, Cantero M, Alonso R, Gonzalez-Neira A, et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res.* 2011 Jun; 20(3):481-9. Epub 2010 May 27.

27. Malyshev I.Yu. Hypoxia and reprogramming the immune response in the development of tumors: the central role of the macrophages. *Patogenez.* 2011;(3): 44-5.(in Russian)

28. Malyshev I.Yu., Kruglov S.V., Lyamina S.V. Hypoxia, inflammation and its phenotypic plasticity of macrophages: the central role of HIF-1 and NFκB. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2012; (3): 42-50. (in Russian)

Received 26.02.15

Сведения об авторах:

Калиш С.В. — ст. лаборант кафедры патофизиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, тел. 8(495)365-03-25

Лямина С.В. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, тел.8(495)365-03-25

Буданова О.П. — ст.н.с. лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИОПП». Москва, 125315, ул.Балтийская, д.8. e-mail: ercsgamma@inbox.ru, тел.+7-499-151-1756

Мальшев И.Ю. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, зав. лабораторией регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИОПП», Москва, 125315, ул.Балтийская, д.8; e-mail: iymalyshev1@gmail.com. Тел.+7-499-151-1756.