

*О.И. Кит, Е.М. Франциянц, И.М. Котиева, Е.И. Сурикова, И.В. Каплиева,
В.А. Бандовкина, Л.К. Трештаки, Ю.А. Погорелова, Ю.С. Сидоренко*

Динамика концентрации компонентов NO-системы в процессе роста меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли у самок мышей

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

В связи с обнаружением влияния состояния хронической нейрогенной боли (ХНБ) на биологические особенности меланомы B16/F10 целью работы было изучение концентрации компонентов NO-системы у мышей в процессе роста перевивной меланомы B16/F10 на фоне ХНБ.

Методы. Работа выполнена на 64 мышках-самках линии C57BL/6. В основной группе меланому перевивали под кожу спины через 2 недели после двусторонней перевязки седалищных нервов. Концентрацию NOS-3, NOS-2, L-аргинина, цитруллина, общего нитрита и АДМА определяли методом ИФА в неповрежденной опухоли кожи и в ткани опухоли.

Результаты. Обнаружены различия в динамике изученных показателей при обычном росте меланомы и при росте опухоли на фоне хронической боли. При росте опухоли на фоне боли выявлен стабильно повышенный уровень NO-синтаз в опухоли, стабильно повышенный уровень АДМА и его снижение к 3-ей неделе роста.

Заключение. Состояние хронической боли возможно способствует развитию в коже состояния иммунологической толерантности к опухолевым антигенам. Формируются условия, облегчающие выживание опухолевых клеток и благоприятствующие дальнейшему развитию меланомы. Динамика активности NO-системы может способствовать стимуляции процессов неоангиогенеза, усиления инвазивности опухоли. Изменение уровня ингибитора АДМА в условиях роста опухоли на фоне хронической боли может свидетельствовать о контроле уровня NO через метаболическую регуляцию активности NO-синтаз, обеспечивая повышенную инвазивность меланомы.

Ключевые слова: меланома B16/F10; хроническая боль; кожа; опухоль; мышцы; NO-система

Введение

Результаты многочисленных исследований продемонстрировали важную роль оксида азо-

та в процессах, связанных с выживанием опухолевых клеток, их пролиферацией, инвазией, метастазированием [1, 2]. С другой стороны, результаты исследования различных моделей боли свидетельствуют об участии всех изоформ NO-синтаз и, следовательно, самого оксида азота в механизмах развития воспалительной, нейрогенной, онкологической боли [3-6].

Несмотря на успехи в различных областях современной медицины, проблема боли и ее хронизации сохраняет свою актуальность. По данным ВОЗ частота распространенности боли у пациентов с онкологическим заболеванием составляет 35-96% [7]. Зачастую в онкологической боли присутствует нейропатический компонент в результате сдавления нерва опухолью и пр. [8]. У 10% онкологических больных причиной боли являются сопутствующие заболевания [8]. Распространенность в России любой боли среди обратившихся к неврологу пациентов составила 39%, среди них у 18% была выявлена нейропатическая боль или ее компонент [9].

Являясь важнейшей адаптационной реакцией организма, боль при ее хронизации теряет свое физиологическое значение и приводит к развитию в организме патологических изменений, начиная от ухудшения функционирования основных систем органов и заканчивая нарушением нормального течения метаболических процессов, снижением иммунитета, дисфункцией сосудистой системы [10].

Ранее было показано, что экспериментальная хроническая нейрогенная боль (ХНБ) оказывает ярко выраженное стимулирующее влияние на рост и развитие перевивной меланомы B16/F10, способствуя более раннему появлению опухоли, ускорению метастазирования и сокращению продолжительности жизни животных [11,12]. Одним из механизмов такой стимуляции, возможно, является активация неоангиогенеза в коже на фоне хронической боли, что проявлялось увеличением уровня факторов семейства VEGF [13].

В связи с вышесказанной целью работы было изучение динамики функционирования вазоактивной NO-системы в неповрежденной опухоли

коже и в ткани опухоли у самок мышей в процессе роста перевивной меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли.

Материал и методы

В работе были использованы мыши линии C57BL/6, полученные из ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область) — 64 животных (самки), возраст 8 недель, начальная масса 21-22 г. Из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва) был получен штамм мышины меланомы B16/F10, метастазирующей в легкие. Экспериментальные группы: группа интактных мышей, n=7, контрольная группа — мыши с воспроизведением модели хронической нейрогенной боли (ХНБ), n=7, группа сравнения — мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы B16/F10, n=22, основная группа — мыши, которым меланому B16/F10 перевивали через 2 недели после создания модели ХНБ, n=28. Для основной группы контрольными были мыши с ХНБ, для группы сравнения (рост меланомы) — интактные мыши. Модель развития ХНБ создавали перевязкой седалищного нерва с обеих сторон под ксила-золетиловым наркозом [11]. Стандартную перевивку меланомы B16/F10 осуществляли подкожным введением взвеси опухолевых клеток меланомы [11]. Модель роста меланомы B16/F10 на фоне ХНБ создавали подкожной перевивкой опухоли через 2 недели после лигирования седалищных нервов [11]. Опухоль перевивали одномоментно всем животным. Через 1, 2 и 3 недели эксперимента животных декапитировали. Все процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive, 86/609/ЕЕС) и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Из кожи и опухоли на льду получали 10% цитозольные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА. Методами ИФА определяли концентрацию индуцибельной NOS-2, эндотелиальной NOS-3 (Cloud-Clone Corp., США),

L-аргинина, L-цитруллина, асимметричного диметиларгинина АДМА (Immundiagnostik, Германия), общего нитрита (R&D systems, США). Полученные результаты пересчитывали на грамм ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0. Данные представлены в виде среднего значения± стандартная ошибка среднего. Соответствие распределения нормальному оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при p<0,05 — p<0,001.

Результаты

При исследовании динамики концентрации компонентов NO-системы в коже самок мышей было обнаружено, что у животных с хронической болью концентрация NOS-2 и NOS-3 была увеличена, соответственно, на 45,4% и в 3,6 раза (p<0,05, p<0,001), концентрация АДМА и аргинина снижена в среднем на 43% (p<0,01-p<0,001), а концентрации общего нитрита и цитруллина не изменялись по сравнению с группой интактных животных (табл. 1).

У мышей из группы сравнения изменения выявлены со 2 недели после перевивки — срок «выхода» опухоли — по сравнению с уровнем у интактных животных отмечалось снижение уровня NOS-3 на 33,3% (p<0,01), увеличение концентрации аргинина на 39,6% (p<0,05), общего нитрита — на 50,6% (p<0,01) и цитруллина — на 34,8% (p<0,05). На 3 неделе после перевивки меланомы концентрация NOS-3 была увеличена на 84% (p<0,001), значительно снижена концентрация аргинина — в 3,6 раза

Таблица 1. Динамика концентрации компонентов NO-системы в коже самок мышей

	NOS-3, нг/г тк	NOS-2, нг/г тк	Общий нитрит, мкМ/л	Аргинин, мкМ/г тк	АДМА, мкМ/г тк	L-цит-руллин, мкМ/г тк
Интактная группа	0,75±0,07	1,1±0,10	10,48±0,9	44,6±4,2	0,27±0,02	8,2±0,78
Контрольная группа	2,7±0,02 p1<0,001	1,6±0,14 p1<0,05	11,6±1,1	25,7±2,5 p1<0,01	0,15±0,01 p1<0,001	7,6±0,74
1 неделя роста B16/F10						
Группа сравнения	0,84±0,08	0,94±0,08	11,34±1,1	41,77±4,1	0,32±0,03	7,34±0,71
Основная группа	2,9±0,26 p1<0,001	2,18±0,19 p1<0,001 pk<0,05	9,94±0,89	14,57±1,34 p1<0,001 pk<0,001	0,22±0,02 pk<0,01	10,9±1,0 pk<0,05
2 неделя роста B16/F10						
Группа сравнения	0,5±0,048 p1<0,01 p2<0,001	0,84±0,08 0,1>p1>0,05	15,78±1,45 p1<0,01 p2<0,05	62,26±6,12 p1<0,05 p2<0,01	0,28±0,02	11,05±0,9 p1<0,05 p2<0,01
Основная группа	1,36±0,12 pk<0,001	1,04±0,97	9,71±0,95	51,47±4,9 pk<0,001	0,25±0,02 pk<0,001	10,15±1,1
3 неделя роста B16/F10						
Группа сравнения	1,38±0,13 p1<0,001 p3<0,001	1,22±0,11	14,18±1,3 p1<0,05	12,5±1,1 p1<0,001 p3<0,001	0,3±0,03	10,5±1,0
Основная группа	0,77±0,074 pk<0,001	1,18±0,10	10,12±0,9	36,8±3,54 pk<0,05	0,21±0,02 pk<0,05	7,29±0,71

Примечание: статистически значимые различия: p_к — относительно уровня в контроле — кожа животных с хронической болью, p₁ — относительно интактных животных, p₂ — относительно уровня на 1 неделе роста, p₃ — относительно уровня на 2 неделе роста меланомы

($p < 0,001$) и повышена концентрация общего нитрита — на 35,3% ($p < 0,05$) по сравнению с уровнем в группе интактных животных.

У мышей основной группы в непораженной опухолью коже отмечалось значительное снижение уровня NOS-3 в 2 и 3,5 раза ($p < 0,001$) на 2 и 3 неделях, соответственно, по сравнению с уровнем в контрольной группе. Концентрация NOS-2 на 1 неделе была выше показателя в контроле на 36,2% ($p < 0,05$), а к 3 неделе снижалась до уровня на 26,2% ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе. У мышей основной группы в непораженной опухолью коже уровень NOS-3 и NOS-2 на 1 неделе был выше в 3,9 и 2 раза, чем у интактных мышей ($p < 0,001$), а к третьей неделе, снижаясь, достигал значений в группе интактных животных. Изменение концентрации аргинина происходило в соответствии с изменением уровня ферментов, его использующих: на первой неделе уровень субстрата был на 43,3% ($p < 0,001$) ниже уровня в контроле (что было в 3,1 раза ниже, чем его концентрация в коже интактных мышей), на 2 и 3 неделях концентрация аргинина возрастала в 2 раза ($p < 0,001$) и на 43,2% ($p < 0,05$), соответственно, достигая уровня у интактных животных. Также отмечалось увеличение концентрации АДМА в среднем на 51% ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) по сравнению с показателем в контроле.

При изучении ткани опухоли у животных из группы сравнения было обнаружено, что по сравнению с уровнем в коже интактных мышей концентрация NOS-3 и NOS-2 на 2 неделе была выше на 52% ($p < 0,01$) и 98,1% ($p < 0,001$), соответственно, АДМА — на 29,6% ($p < 0,05$), общего нитрита и цитруллина — в среднем в 2,45

раза ($p < 0,001$) (таблица 2). На 3 неделе концентрация ферментов NOS-3 и NOS-2 продолжала расти и достигла уровня соответственно в 4,9 и в 2,8 раза выше ($p < 0,001$), чем в коже интактных мышей; остался повышенным уровень АДМА на 37% ($p < 0,05$) и цитруллина — на 93,9% ($p < 0,001$). Концентрация аргинина на данном сроке была ниже уровня в здоровой коже на 68,4% ($p < 0,001$).

У животных основной группы в ткани опухоли было выявлено, что на 1-3 неделях концентрация NOS-3 была стабильно более высокой, чем уровень фермента в опухоли в группе сравнения на соответствующей неделе (на 1-2 неделях — в 3,8 раза выше, на 3 неделе — выше на 36,8%). Концентрация NOS-2 была максимально повышена на 1 неделе — на 94%, а к 3 неделе снижалась до уровня в группе сравнения. При этом концентрации обоих ферментов были в 6,7 раза и в 3,4 раза ($p < 0,001$), соответственно, выше концентрации ферментов в коже интактных животных. Концентрация АДМА на 1-2 неделях была повышена в среднем на 47% ($p < 0,05$), к 3 неделе она снижалась до уровня показателя в группе сравнения и в коже интактных животных. Концентрация аргинина ко 2 неделе была снижена в 4,1 раза, а цитруллина в 2,3 раза ($p < 0,001$), чем в группе сравнения. При этом на 3 неделе уровень аргинина вырос на 52,5% ($p < 0,01$) по сравнению с группой сравнения, в то время как уровень цитруллина достиг уровня показателя в группе сравнения, что было на 67,1% ($p < 0,01$) выше уровня в коже интактных мышей. Концентрация общего нитрита на 1–2 неделе была в среднем на 44,6% ниже, чем в группе сравнения, на 3 неделе значимых

Таблица 2. Динамика концентрации компонентов NO-системы в ткани опухоли у самок мышей

	NOS-3, нг/г тк	NOS-2, нг/г тк	Общий нитрит, мкМ/л	Аргинин, мкМ/г тк	АДМА, мкМ/г тк	L-цитруллин, мкМ/г тк
Интактная группа — кожа	0,75±0,07	1,1±0,10	10,48±0,9	44,6±4,2	0,27±0,02	8,2±0,78
Контроль-ная группа — кожа	2,7±0,02 $p_1 < 0,001$	1,6±0,14 $p_1 < 0,05$	11,6±1,1	25,7±2,5 $p_1 < 0,01$	0,15±0,01 $p_1 < 0,001$	7,6±0,74
1 неделя роста B16/F10						
Группа сравнения	опухоль отсутствует					
Основная группа	4,4±0,41	4,23±0,41	12,9±1,2	28,5±2,7	0,51±0,05	9,8±0,97
2 неделя роста B16/F10						
Группа сравнения	1,14±0,09 $p_1 < 0,01$	2,18±0,19 $p_1 < 0,001$	26,1±2,5 $p_1 < 0,001$	49,4±4,2	0,35±0,032 $p_1 < 0,05$	19,4±1,7 $p_1 < 0,001$
Основная группа	4,38±0,43 $p_2 < 0,001$	3,88±0,37 $p_2 < 0,001$	15,9±1,48 $p_2 < 0,01$	11,97±1,1 $p_2 < 0,001$	0,49±0,048 $p_2 < 0,05$	8,5±0,84 $p_2 < 0,001$
3 неделя роста B16/F10						
Группа сравнения	3,7±0,35 $p_1 < 0,001$	3,1±0,29 $p_1 < 0,001$	12,95±1,25	14,1±1,35 $p_1 < 0,001$	0,37±0,036 $p_1 < 0,05$	15,9±1,48 $p_1 < 0,001$
Основная группа	5,06±0,49 $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	3,8±0,35 $p_1 < 0,001$	14,1±1,39	21,5±2,1 $p_3 < 0,01$	0,34±0,031	13,7±1,31 $p_1 < 0,01$

Примечание: статистически значимые различия: p_x — относительно уровня в контроле — кожа животных с хронической болью, p_1 — относительно интактных животных, p_2 — относительно уровня на 2 неделе роста меланомы, p_3 — относительно уровня на 3 неделе роста меланомы

изменений данного показателя не выявлено (по сравнению с соответствующими сроками в группе сравнения).

Обсуждение

Анализируя полученные результаты, можно прийти к выводу, что функционирование NO-системы претерпевает существенные изменения как в процессе обычного роста меланомы, так и в процессе роста опухоли на фоне хронической нейрогенной боли. Прежде всего, следует обратить внимание на то, что в состоянии хронической боли у самок мышей наблюдается активация функционирования NO-системы в коже как за счет увеличения концентрации обеих форм NO-синтаз, так и за счет снижения уровня их эндогенного ингибитора АДМА. В создающихся при этом условиях возможно ингибирование иммунного ответа на опухолевые антигены, вносимые в виде клеток перевиваемой меланомы B16/F10 [14, 15]. Мы предполагаем, что одной из причин показанного более раннего появления подкожных опухолей у мышей с ростом меланомы на фоне хронической боли может быть состояние иммунологической толерантности в коже, развитию которого может способствовать состояние ХНБ.

Проопухолевые эффекты NO дозозависимы и реализуются через регулирование уровня экспрессии и активности NO-синтаз. При росте меланомы B16 после стандартной перевивки в непораженной опухоли коже самок мышей наблюдается снижение концентрации NOS-3 на 2 неделе и увеличение к 3 неделе наблюдения, в то время как в ткани опухоли — увеличение концентрации обоих ферментов. При росте меланомы B16 на фоне хронической нейрогенной боли в непораженной коже мышей концентрация NO-синтаз уменьшалась к 3 неделе роста опухоли. В ткани опухоли, выросшей на фоне хронической боли, концентрация ферментов была значительно более высокой, чем у мышей с обычным ростом меланомы, причем активацию NO-системы наблюдали уже с 1 недели роста опухоли. Эти данные могут свидетельствовать о том, что на фоне состояния хронической нейрогенной боли как в коже животных, так и в растущей опухоли уже с 1 недели после перевивки создаются условия NO-зависимой стимуляции пролиферации опухолевых клеток, активации ангиогенеза.

В настоящее время установлена важная роль системы оксида азота (наряду с экспрессией проангиогенных факторов роста) в процессах ангиогенеза и лимфангиогенеза [16, 17]. Ангиогенный эффект VEGFA опосредуется действием оксида азота, на что указывает увеличение

экспрессии и активности NOS-3 в различных опухолях, в том числе и в меланоме, при активации сигнального пути VEGFA [18-21]. Действие VEGFC также связано со стимулирующей эндотелиальной NOS-3 [22]. На модели меланомы, выращенной у мышей с дефицитом NOS-3, было обнаружено, что опухоль имела меньшее количество сосудов по сравнению с меланомой, выросшей у животных дикого типа. На этой же модели было показано, что удаление индуцибельной NOS-2 в стромальных клетках не влияло на ангиогенез и морфологию сосудов [23]. Активация транскрипции NOS-2 опосредует участие ряда факторов роста в процессе ангиогенеза, причем установлено, что в разных опухолях эффект активации NOS-2 был различным — у пациентов с меланомой наблюдалось снижение выживаемости при повышенной экспрессии NOS-2, в отличие от пациентов с раком молочной железы [21].

Результаты работы по изучению возможных взаимосвязей между активацией генов, связанных с ангиогенезом, в частности NOS-3, и уровнем экспрессии VEGFA у здоровых людей, проведенной Saleh A. и соавт., подтверждают гипотезу о том, что в организме в физиологических условиях существуют сложные генетически обусловленные взаимосвязи между воспалением и ангиогенезом, проявляющиеся в существовании функционально связанных с ангиогенезом полиморфизмов генов [17]. Авторы обращают внимание на необходимость учитывать существование сложных взаимодействий между различными факторами роста и связанными с ними генами при интерпретации результатов, полученных при исследовании полиэтиологических хронических патологических процессов, таких как рак, диабет, сердечно-сосудистые патологии.

Полученные результаты, безусловно, нуждаются в дальнейшем более глубоком изучении. Зная, что меланома обладает значительной гетерогенностью с точки зрения этиологии, мутационного статуса, ее молекулярной биологии, можно предположить, что полученные результаты могут подтверждать системное влияние хронической нейрогенной боли как фонового процесса, под воздействием которого могут изменяться биологические характеристики растущей в организме опухоли.

Заключение

Состояние хронической нейрогенной боли способствует формированию условий, облегчающих выживание опухолевых клеток и благоприятствующих дальнейшему развитию меланомы. Стабильно повышенный уровень NO-синтаз в опухоли, растущей на фоне состояния хрониче-

ской нейрогенной боли, может способствовать активации процессов неоангиогенеза, усиления инвазивности опухоли. Наблюдаемый при этом стабильно повышенный уровень АДМА и его снижение к 3 неделе роста опухоли может быть проявлением контроля синтеза оксида азота не только на уровне усиления экспрессии NO-синтазы, но и посредством метаболической регуляции активности ферментов.

Конфликт интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Choudhari S.K., Chaudhary M., Bagde S., Gadbaile A.R., Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol.* 2013;11:118. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>.
- Rizi B.S., Achreja A., Nagrath D. Nitric oxide — the forgotten child of tumor metabolism. *Trends Cancer.* 2017;3(9):659–672. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.07.005>.
- De Alba J., Clayton N.M., Collins S.D., Colthup P., Chessell I., Knowles R.G. GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* 2006;120:170–181.
- Naik A.K., Tandan S.K., Kumar D., Dudhgaonkar S.P. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;530:59–69.
- Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H, Yanagihara N, Inoue K. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol Pain.* 2011;7:50. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-50>.
- Yang Y, Zhang J, Liu Y, Zheng Y, Bo J, Zhou X, Wang J, Ma Z. Role of nitric oxide synthase in the development of bone cancer pain and effect of L-NMMA. *Mol Med Rep.* 2016;13(2):1220-6. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4647>.
- Worldwide palliative care alliance (WPCA); World Health Organization 2015.- www.who.int/nmh/Global_Atlas_of_Palliative_Care.pdf.
- Каприн А.Д., Абузарова Г.Р., Хороненко В.Э. и др. Фармакотерапия хронического болевого синдрома у онкологических пациентов. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России. 2015. 48 с. [Kaprin A.D., Abuzarova G.R., Khoronenko V.E. et al. Pharmacotherapy of chronic pain syndrome in cancer patients. М.: MNI OI im. P.A.Gercena — filial FGBU «FMIC im. P.A.Gercena» Minzdrava Rossii. 2015. 48 p. (In Russ)].
- Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л., Давыдов О.С. и др. Результаты Российского эпидемиологического исследования распространенности нейропатической боли, ее причин и характеристик в популяции амбулаторных больных, обратившихся к врачу неврологу. *Журнал Боль.* 2008;20(3):24–32. [Jahno N.N., Kukushkin M.L., Davydov O.S. et al. The results of the Russian epidemiological study of the prevalence of neuropathic pain, its causes and characteristics in a population of outpatients who consulted a neurologist. // *J. Bol'.* 2008, 18(3):24–32. (In Russ)].
- Решетняк Д.В., Смирнова В.С., Кукушкин М.Л. Половые различия при изменении биохимических показателей крови у крыс в ответ на острую соматическую и хроническую нейрогенную боль. *Журнал Боль.* 2004;2(3):12–16. [Reshetnyak D.V., Smirnova V.S., Kukushkin M.L. Sex differences with changes in blood biochemical parameters in rats in response to acute somatic and chronic neurogenic pain. *J. Pain.* 2004;2(3):12–16. (In Russ)].
- Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Российский журнал боли.* 2017;2(53):14-20. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M. et al. Some mechanisms of increasing malignancy of B16/F10 melanoma in female mice with chronic pain. *Russian Journal of Pain.* 2017;2(53):14-20. (In Russ)].
- Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М. и др. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы B16/F10 у самок мышей. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки.* 2019;1(201):106-111. [Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M. et al. Influence of chronic neuropathic pain on the course of malignant B16/F10 melanoma in male mice. *University news. North-Caucasian region. Natural sciences series.* 2019;1(201):106-111. (In Russ)].
- Кит О. И., Котиева И.М., Франциянц Е.М. и др. Регуляция ангиогенеза факторами роста в интактной и патологически измененной коже самок мышей при злокачественной меланоме, развивающейся на фоне хронической боли. *Российский журнал боли.* 2017;3-4(54):17-25. [Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M. et al. Angiogenesis growth factors in the intact and pathologically changed skin of female mice with malignant melanoma, which develops on the background of chronic pain. *Russian Journal of Pain.* 2017;3-4(54):17-25. (In Russ)].
- Mazzoni, A., Bronte V., Visintin, A., Spitzer, J.H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P., Segal, D.M. Myeloid suppressor lines inhibit T-cell responses by an NO-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2002;168:689–695.
- Viola A., Bronte V. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(4):309–316.
- Ziche M., Morbidelli L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *European Cytokine Network.* 2009;20(4):164-170. <https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0169>.
- Saleh A, Stathopoulou MG, Dadé S, Ndiaye NC, Azimi-Nezhad M, Murray H, Masson C, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S. Angiogenesis related genes NOS3, CD14, MMP3 and IL4R are associated to VEGF gene expression and circulating levels in healthy adults.

- BMC Med Genet. 2015;16:90. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0234-6>.
18. Tu YT, Tao J, Liu YQ, Li Y, Huang CZ, Zhang XB, Lin Y. Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in human malignant melanoma and their relation to angiogenesis. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31(3):413-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2006.02123.x>.
 19. Barbieri A., Palma G., Rosati A., Giudice A., Falco A., Petrillo A., Mario Petrillo, Bimonte S., Benedetto M. Di, Esposito G., Stiuso P., Abbruzzese A., Caraglia M., Arra C. Role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in chronic stress-promoted tumour growth. *J. Cell. Mol. Med.* 2012;16(4):920-926. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01375.x>.
 20. Lankhorst S., Kappers MH, van Esch JH, Danser AH, van den Meiracker AH. Hypertension during vascular endothelial growth factor inhibition: focus on nitric oxide, endothelin-1, and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(1):135-45. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5244>.
 21. Vahora H., Khan M.A., Alalami U., Hussain A. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. *J Cancer Prev.* 2016;21(1):1-12. <https://doi.org/10.15430/JCP.2016.21.1.1>.
 22. Lahdenranta J, Hagendoorn J, Padera TP, Hoshida T, Nelson G, Kashiwagi S. Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res.* 2009;69:2801-2808.
 23. Kashiwagi S, Izumi Y, Gohongi T, Demou ZN, Xu L, Huang PL, Buerk DG, Munn LL, Jain RK, Fukumura D. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1816-27.

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

*O.I. Kit, E.M. Frantsiyants, I.M. Kotieva,
E.I. Surikova, I.V. Kaplieva, V.A. Bandovkina,
L.K. Trepitaki, Ju.A. Pogorelova, Yu.S. Sidorenko*

Dynamics of concentrations of NO-system components during B16/F10 melanoma growth in female mice with chronic neurogenic pain

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don

Since chronic neurogenic pain has been reported to affect biological characteristics of B16/F10 melanoma, the purpose of the study was to analyze concentrations of components of the NO-system in mice during the growth of transplantable B16/F10 melanoma combined with chronic neurogenic pain.

Methods. The study included 64 female mice. Melanoma was transplanted under the skin of the back to animals of the main group 2 weeks after the bilateral sciatic nerve ligation. Levels of NOS-3, NOS-2, endothelin-1, L-arginine, citrulline, total nitrite and ADMA were determined by ELISA in the intact skin and in tumor tissues.

Results. The study showed that the dynamics of the studied parameters differed in tumor growth alone and in combination with chronic pain. Stably increased levels of NO-synthases in the tumor and stably increased ADMA levels with their decrease by week 3 of the growth were registered in the tumor growth with pain.

Conclusions. Chronic pain probably contributes to the development of immunological tolerance to tumor antigens in the skin. Conditions are formed that facilitate the survival of tumor cells and contribute to the further development of melanoma. The dynamics of the NO-system activity can stimulate neoangiogenesis and enhance tumor invasion. Changes in the ADMA inhibitor levels in the tumor growth combined with chronic pain may indicate the control of NO levels through the metabolic regulation of NO-synthase activity, thus providing increased melanoma invasiveness.

Key words: B16/F10 melanoma; chronic neurogenic pain; skin; tumor; mice; NO-system