

ROLES OF NITRIC OXIDE IN ONCOGENESIS OF GLIOMAS

L.N. Senko, Y.A. Zozulja*

*A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery,
Academy of Medical Sciences of Ukraine, 04050, Kyiv, Ukraine*

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЛИОМ

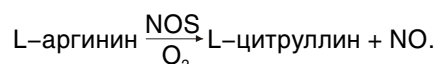
Л.Н. Сенько, Ю.А. Зозуля*

*Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова,
Академия медицинских наук Украины, Киев, Украина*

В последние годы значительно расширились наши знания о роли одного из универсальных регуляторов клеточного и тканевого метаболизма — оксида азота (NO) и его окисленных стабильных продуктов (NO_2^- , NO_3^-) в разнообразных физиологических и патологических процессах, в том числе при опухолевом росте [1–13]. Двойственная природа NO проявляется в том, что, несмотря на способность значительно усиливать мутагенные и канцерогенные эффекты, гиперпродукция NO макрофагами, астроглией, микроглией в ответ на воздействие различных внешних факторов является существенным звеном в противовоспалительной реакции и при определенных обстоятельствах важным фактором противоопухолевой защиты [7, 10, 14–16]. Знание механизмов, контролирующих экспрессию изоформ NOS, фермента, отвечающего за биосинтез NO, взаимодействие метаболических путей, сопряженных с синтезом NO и развитием опухолей, может помочь в определении новых внутриклеточных мишеней для противоопухолевых агентов. Эта проблема наиболее актуальна для злокачественных опухолей мозга, в частности глиом, которые характеризуются высокой степенью инвазии, что значительно затрудняет терапию.

В настоящей работе предприняты попытки не только определить роль NO, синтезирующегося в различных клетках из L-аргинина, в возникновении и развитии злокачественных опухолей мозга, но и рассмотреть возможные пути создания новых методов терапии.

Основной путь образования NO в клетках связан с окислением L-аргинина и катализируется группой изоферментов NOS:



Процесс окисления двухстадийный и для проявления полной активности NOS необходим целый ряд кофакторов: тетрагидробиоптерин (BH_4), флавиновые моно- и диадениннуклеотиды (FMN, FAD), NADPH, кальмодулин (CaM) и гем [1, 17]. Иденти-

фицированы три типа NOS, две конститутивные (nNOS, тип I — конститутивная нейрональная; eNOS, тип III — конститутивная эндотелиальная) и одна индуцибельная (iNOS, тип II) изоформы.

В головном мозге функционируют все три изоформы NOS. В зависимости от клеточной локализации они участвуют в выполнении различных физиологических функций. Отличаются и механизмы регуляции их экспрессии и каталитической активности. В то время как nNOS и eNOS конститутивно активируются в результате транзитной ассоциации с CaM при возрастании внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , синтезируя NO для процессов физиологической регуляции и опосредования таких быстрых действий, как нейротрансмиссия и дилатация сосудов, iNOS при физиологических условиях не экспрессирована. При различных патологических условиях, независимо от изменений концентраций внутриклеточного Ca^{2+} , iNOS активируется различными провоспалительными стимулами, такими, как фактор некроза опухолей (ФНО-альфа), интерлейкин-1 (ИЛ-1) и интерферон-гамма в астроцитах и микроглии/макрофагах, что приводит к продолжительной гиперпродукции NO [1–2, 11, 16–20].

Токсический эффект гиперпродукции NO в основном определяется радикальной природой этого соединения и его способностью взаимодействовать с белками, ДНК, влиять на активацию N-метил-D-аспартат (NMDA)-рецепторов. Это и определяет нейротоксичность и гибель нейронов при развитии многих патологических состояний мозга (болезни Паркинсона и Хентингтона, эпилепсия, ишемические повреждения) [2–4, 21–24]. Взаимодействие NO-радикала с супероксидом приводит к образованию высокотоксичного свободнорадикального соединения — пероксинитрита, в результате чего выключается передача сигнала в нервной ткани и наступает гибель клеток. В экспериментах на клеточных линиях выявлено, что гибель нейронов после повреждающих воздействий медиаторов сопряжена с генерацией NO, продуцируемого iNOS астроцитов и микроглии [25, 26]. Продолжительная гиперпродукция NO может вызывать разрывы ДНК в результате нитрозилирования аминов гуанина и аденина [27]. Показано, что в эпителиальных клетках желудка разрывы ДНК инициирует не сам NO,

Received: June 02, 1999.

*Correspondence. Fax: (380-44) 213-9573

E-mail: brain@neuro.kiev.ua

Используемое сокращение: NOS — NO-синтаза.

а пероксинитрит [28]. В экспериментах *in vivo* установлено, что нитрозоамины, образовавшиеся из NO, вовлечены в процесс малигнизации клеток органов пищеварительного тракта [12].

Высокий уровень экспрессии iNOS был обнаружен в опухолях репродуктивных органов человека, повышение ее активности положительно коррелировало со стадией заболевания и степенью инвазии опухолей [8, 9]. Есть данные об активации iNOS в опухолях прямой кишки, что сопровождается активацией ангиогенеза [29], а также при дисплазиях и раке верхних отделов желудочно-кишечного тракта [13]. Существует ряд сообщений о том, что как в тканях нейроэпителиальных опухолей головного мозга человека и животных, так и в отдельных линиях глиальных клеток отмечается значительная экспрессия iNOS, причем такая экспрессия сопряжена с индукцией цитокинами, а развитию опухоли предшествует неоангиогенез и нарушение проницаемости сосудов [30–35]. На модели глиомы 101.8 головного мозга крыс нами показано, что рост опухоли сопровождается активацией NOS и накоплением стабильных окисленных метаболитов NO [36].

Роль NO в биологии опухолей неоднозначна и пока выяснена недостаточно. Рост солидных опухолей регулируется взаимодействием разных клеток: эндотелиальных клеток сосудов опухоли, инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов и макрофагов (в мозге — клетки микроглии) и собственно самих клеток опухоли. Все эти клетки способны *in vitro* генерировать NO. Для решения вопроса о роли эндогенно синтезируемого NO в развитии опухоли были проведены исследования с использованием генетических конструкций субклона клеточной линии аденокарциномы человека DLD-1 с трансфицированной кДНК iNOS под контролем конститутивного промотора. Рост таких клеток *in vitro* сопровождался постоянной генерацией NO, а трансплантация клеточных ксенографтов мышам CD1 nu/nu создавала удобную модель для изучения различных эффектов эндогенно синтезируемого NO на фенотип опухоли. Тот факт, что субклон клеток с iNOS пролиферирует *in vitro* значительно медленнее, чем контрольные клетки дикого типа, свидетельствует о том, что NO может оказывать цитостатическое влияние на клетки опухоли. Замедлению роста препятствовало добавление ингибитора NOS: N-имино-этил-L-орнитина. Однако *in vivo* у мышей с ксенотрансплантатами клеточных линий с геном iNOS и активностью фермента, соответствующей активности в мастоцитоме человека, но не такой высокой, чтобы быть ассоциированной с цитотоксичностью или апоптозом, эти опухоли росли быстрее, чем у мышей с клетками дикого типа. Причем рост таких опухолей сопровождался повышенной васкуляризацией и инвазией, что предполагает участие NO в сигнальном каскаде васкуляризации опухоли.

Анализ полученных результатов экспериментально подтверждает гипотезу о двойном действии эндогенно продуцируемого NO при канцерогенезе — про- и антиопухолевом в зависимости от концент-

рации NO. Иными словами, высокие концентрации NO оказывают противоопухолевое действие, однако длительное генерирование повышенных, но еще недостаточно высоких концентраций NO, т.е. таких, которые еще не могут оказывать цитотоксическое/цитостатическое влияние, становится промотором роста опухоли. Торможение роста клеток опухоли, продуцирующих NO, может быть достигнуто под влиянием сильных селективных ингибиторов iNOS, однако таким образом, чтобы не вызвать нарушения системного кровообращения [6].

Таким образом, NO оказывает двойное действие (промоторное и противоопухолевое) в зависимости от концентрации. Все это актуально для мозга, поскольку именно в нейронах, микроглии, астроцитах и эндотелии сосудов выявлены все три формы NOS. Кроме того, необходимо отметить, что хотя в некоторых химически индуцированных моделях внутрикишечных воспалений ингибирование NOS привело к улучшению состояния, у мышей, в геноме которых отсутствует ген iNOS, отмечалось развитие стойкого колита [37].

С одной стороны, достаточно продолжительная гиперпродукция NO и аккумуляция его окисленных метаболитов нитритов/нитратов часто положительно коррелирует с развитием опухоли, стимулирует дозозависимые разрывы ДНК, накопление эндогенных нитросоединений, способных повышать бластоогенез, но, с другой стороны, временная гиперпродукция NO иммунокомпетентными клетками может оказывать цитолитическое/цитостатическое влияние на раковые клетки, тормозить в них синтез ДНК [7, 8, 16, 38–40]. Хотя NO, генерируемый iNOS, выступает в качестве эффекторной молекулы активированных макрофагов, он, обладая цитотоксической активностью, может участвовать в уничтожении опухолевых клеток. Ингибирование продукции цитокинов и адгезии лейкоцитов в сосудистом эндотелии под действием NO [41, 42] может снижать иммунный ответ.

Для понимания регуляторных механизмов развития и прогрессии глиом необходимо изучать модуляцию экспрессии основных факторов роста и их рецепторов, особенно при трансформации астроцитом в глиобластомы. Установлено, что в злокачественных глиомах повышена экспрессия рецептора фактора роста фибробластов (ФРФ) I и понижена экспрессия рецептора ФРФ II, в то время как в нормальных клетках мозга это соотношение является обратным [43]. Активация белковыми факторами экспрессированных рецепторов ФРФ I на мембранах злокачественных клеток глиомы “запускает” соответствующие внутриклеточные тирозинкиназы. Такая стимуляция эндогенными агентами аутокринного роста глиом дает возможность для поиска препаратов, вызывающих селективное ингибирование активности соответствующих тирозинкиназ.

Так, антипролиферативная активность 5'-метилтиоаденозина (МТА) положительно коррелирует с ингибированием фосфорилирования тирозинкиназы, которое стимулируется ФРФ-бета [44]. Показано, что активация тирозинкиназ сопровождается стимуляцией iNOS. Инкубация клеток астроцитомы C6

с бактериальным эндотоксином ЛПС плюс интерферон-гамма или с комбинацией цитокинов (ФНО-альфа, ИЛ-1-бета и интерфероном-гамма) вызывает высокую экспрессию iNOS. Применение ряда ингибиторов тирозинкиназ — тирфостинов — оказывает ингибирующее действие как на индукцию тирозинкиназы, так и iNOS, однако, в зависимости от дозы и вида ингибиторов этого класса, определены различия в ингибировании ЛПС- или цитокин-зависимой индукции iNOS [45]. Предполагается, что тирозинкиназы дифференциально выбирают метаболические пути, в которых стимулируется iNOS, т.е. те, которые связаны с ЛПС или с цитокинами. Это может стать основой для дальнейшего выбора избирательных ингибиторов экспрессии iNOS.

Существуют доказательства, что пролиферация злокачественных глиом может происходить и в результате активации метаболического пути с участием протеинкиназы С (ПКС), поэтому ингибирование ее активности в клетках глиомы может тормозить рост этих опухолей. Различные ингибиторы ПКС, в том числе и новый фотозависимый ингибитор регуляторного домена ПКС — кафостин С, уменьшают пролиферацию и тормозят рост клеток глиальных опухолей *in vitro*. Светочувствительное ингибирование пролиферации такими агентами, как кафостин С, открывает новое стратегическое направление применения фотодинамической терапии [46]. Пока еще не определена молекулярная основа повышения активности ПКС, т.е. не выяснено, является ли это результатом генетических изменений в изоферментном спектре ПКС или снижением регуляторной способности ростовых факторов клеток глиальной опухоли. Однако, как уже выявлено, использование в доклинических исследованиях некоторых ингибиторов ПКС значительно повышает выживаемость животных. Результаты экспериментальных исследований с применением комбинации активатора ПКС (форбол-12-меристат-13-ацетат) и рекомбинантного интерферона-гамма в течение короткого и длительного периода с последующим использованием как ингибиторов ПКС (стауроспорина, полимиксина В), так и ингибиторов iNOS (N-G-монометил-L-аргинин-моногидрата) свидетельствуют о синергичном возрастании активности ПКС и iNOS в клетках микроглии крыс. На основании этих наблюдений авторы пришли к выводу, что в клетках микроглии активность ПКС может быть сопряжена с посттрансляционными модификациями mPHK iNOS [47].

Известно, что экзогенный донор NO, S-нитрозо-N-ацетилпенициламин (SNAP), способен обратимо инактивировать ПКС, проявляя при этом цитотоксическое/цитостатическое действие [48]. Другой экзогенный донор NO-3-морфолиносинонимин гидрохлорид (SIN-1) — вызывает значительное снижение уровня стимулирующей субъединицы G-белка (альфа-Gs) в клетках глиомы С6. Причем, после воздействия на эти клетки SIN-1 не обнаружено никаких дефектов в mPHK Gs-альфа, однако АДФ-рибозилирование, как эндогенное, так и катализируемое холерным токсином, возрастало. Обработка соединением, являющимся ловуш-

кой NO-2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидозолин-1 оксид, 3-окси (PTIO), не оказывала влияния ни на эндогенное, ни на катализируемое холерным токсином АДФ-рибозилирование Gs-альфа, однако устраняла возрастание АДФ-рибозилирования, стимулируемое SIN-1. Эти результаты позволили предположить, что в клетках глиомы С6 повышение процессов АДФ-рибозилирования под влиянием SIN-1 сопряжено с подавляющей регуляцией Gs-альфа, опосредуемой SIN-1 [49].

При изучении цитотоксических свойств и биотрансформации двух химически различных доноров NO, таких, как SNAP и глицеролтринитрата (GTN), на двух линиях опухолевых клеток MCF-7 и U251 было выявлено, что высвобождение NO из GTN может быть как энзиматическим, так и неэнзиматическим. SNAP генерирует NO в среду, не взаимодействуя с клеточными компонентами. Оба донора NO дозозависимо ингибируют включение тимидина в клетки U251, но не в клетки MCF-7. В последних SNAP при его использовании в наиболее высокой дозе (1000 мкмоль) проявлял только 33% своего цитостатического эффекта. Для MCF-7 клеток GTN был более токсичным. Исходя из этих данных, предлагается рассматривать противоопухолевую активность доноров NO *in vitro* в зависимости от типа линий клеток опухоли, количества и продолжительности высвобождения NO из экзогенных доноров NO [50].

В ходе экспериментов по проверке биосинтеза и биологических эффектов NO в 5 линиях различных злокачественных клеток глиомы под воздействием таких цитокинов, как INF-гамма, ФНО-альфа или ИЛ-1-бета и ЛПС, было выявлено, что синтез NO индуцировался только в двух клеточных линиях, а именно, в клетках глиомы С6 крысы и A172 человека, но не в линиях LN-229, T98G и LN-18 клеток злокачественной глиомы человека. В последних индукцию NO не удавалось вызвать и после нейтрализации эндогенного трансформирующего фактора роста (TGF-бета) или после совместного воздействия цитокинов, ЛПС и антиоксидантов. Ни ингибиторы, ни доноры NO не модулировали также и CD95L-индуцированный апоптоз. Принудительная же экспрессия мутантного и дикого типа температурочувствительного p53val 135 в клетках С6 ингибировала синтез NO, стимулируемый цитокинами/ЛПС. Более того, аккумуляция p53 как дикого, так и мутантного типа защищала клетки глиомы С6 от токсического влияния экзогенного NO. Это позволило заключить, что резистентность к NO-зависимым защитным механизмам может быть связана с прогрессией опухолей у человека, причем в первую очередь тех видов злокачественных новообразований, которые ассоциированы с аккумуляцией мутантного белка p53 [51]. В этой связи следует указать, что NO индуцирует экспрессию белка p53 дикого типа, который затем снижает уровень транскрипции iNOS через связывающий сайт в промоторе iNOS [52]. Все это предполагает, что регуляция экспрессии iNOS может быть одним из важных эффектов p53, а также и то, что при хронической стимуляции NO способен индуцировать мутации p53 [52].

Результаты иммуногистохимических исследований NOS в астроцитарных опухолях мозга свидетельствуют о прямой корреляции интенсивности реакции во многих клетках опухоли со степенью анаплазии. Астроцитомы I степени не выявляли такой иммунореактивности, в то время как в высокоанапластических опухолях многие клетки проявляли положительную реакцию различной степени интенсивности. Положительная реакция отмечена у многих гигантских клеток, тогда как маленькие клетки глиобластомы и олигодендроглии были иммуноотрицательными. Обнаружена прямая корреляция между экспрессией NOS и кислым фибриллярным белком глиии [31].

Вызывает интерес исследование, в котором участвовали 8 пациентов (у 7 — глиомы; у 1 — менигиома и метастазирующая аденокарцинома). В данном исследовании определяли экспрессию NOS в биопсийном материале трех областей мозга: опухоль, окружающая ее ткань и кажущиеся “нормальными” соседние ткани мозга [33]. Клетки опухолей, за исключением метастазирующей аденокарциномы и глиобластомы, экспрессировали все три изоформы NOS. В четырех случаях экспрессия eNOS уменьшалась по мере удаления от опухоли. В трех глиомах многие клетки были интенсивно иммуногистохимически окрашены. Данное окрашивание было менее интенсивным в тканях, окружающих опухоль. В четырех опухолях внутри и вокруг кровеносных сосудов активно метилась iNOS (преимущественно лимфоциты и CD45⁺ макрофаги). Авторы предполагают, что клетки опухоли и эндотелий сосудов активно продуцируют NO.

Таким образом, можно заключить, что высокая экспрессия NOS обнаружена в ряде солидных опухолей, в том числе в тканях нейроэпителиальных опухолей полушарий головного мозга человека. Активация свободнорадикальных процессов, вызывающая повреждение клеток мозга, мутагенез, активация ангиогенеза и проницаемости сосудов опухоли, нарушение локального кровотока, повышение цитотоксичности солидных опухолей обусловлены нарушением экспрессии изоформ NOS и часто положительно коррелируют с высокой инвазивностью злокачественных глиом. Это дает возможность предположить, что определение экспрессии NOS и уровня биосинтеза NO можно применять в качестве биомаркеров прогрессии нейроэпителиальных опухолей мозга и в первую очередь малигнизированных глиом.

При развитии внутримозговых опухолей глиальной природы эндотелий сосудов и клетки опухоли, генерируя повышенные количества NO, могут стимулировать глиальные клетки для его гиперпродукции, что в конечном счете значительно увеличивает цитотоксический потенциал опухоли. В то же время активированные трансформированные глиальные клетки опухоли, генерируя NO, не только сами становятся резистентными к цитолитическому/цитотоксическому влиянию NO, продуцируемого иммунокомпетентными клетками (макрофагами, микроглией), но и могут повреждать соседние клетки, способствуя прогрессии опухоли. Не исключено, что начальные этапы малигнизации опухолей мозга че-

ловека, часто обусловленные мутациями супрессорного гена *p53*, определяют резистентность к цитолитическому влиянию внеклеточного NO. Понимание и модулирование биологических свойств клеток злокачественных глиом помогают обнаружить новые мишени для противоопухолевых агентов, в частности высокоселективных ингибиторов iNOS, что формирует новую стратегию ингибирования роста и цитотоксичности внутримозговых глиом.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Moncada S, Palmer RVJ, Higgs EA.** Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; **43**: 109–41.
2. **Moncada S, Higgs A.** The L-arginine — nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 1993; **329**: 2002–12.
3. **Snyder SH.** Janus faces of nitric oxide. *Nature* 1993; **364**: 577.
4. **Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS.** A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nirtoso-compounds. *Nature* 1993; **364**: 626–32.
5. **Kitajima JK, Kawahara K, Nakajima T, Soejima Y, Matsuyama T and Maruyama I.** Nitric oxide-mediated apoptosis in murine mastocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **204**: 244–51.
6. **Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S.** Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4392–96.
7. **Wiseman H, Halliwell B.** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J* 1996; **313**: 17–29.
8. **Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JF, Riverous-Moreno V, Moncada S.** Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 1994; **54**: 1352–54.
9. **Thomsen LL, Millies DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles R, Moncada S.** Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 1995; **72**: 41–4.
10. **Cifone MG, Cironi L, Meccia MA, Roncaioli P, Festuccia C, Denuntis G, Dalo S, Santoni A.** Role of nitric oxide in cell-mediated tumor cytotoxicity. *Adv Neuroimmunology* 1995; **5**: 443–61.
11. **Nakano S, Natsukado K, Black KL.** Increased brain tumor microvessel permeability after intracarotid bradykinin infusion is mediated by nitric oxide. *Cancer Res* 1996; **56**: 4027–31.
12. **Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B and Calmels S.** Endogenously formed N-nitrosocompounds and nitrosating agents in human cancer etiology. *Pharmacogenetics* 1992; **2**: 272–7.
13. **Wilson KT, Ramanuyam KS, Meltzer SJ.** Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; **58**: 2929–34.
14. **Murray HW, Teitelbaum RF.** L-Arginine-dependent reactive nitrogenintermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 1992; **165**: 513–17.
15. **Li L, Kilbourn RC, Adams J, Fidler J.** Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res* 1991; **51**: 3531–6.
16. **Lorebuch RB, Murphy WJ, Lowenstein CI, Snyder S, Russell AW.** Expression of the nitric-oxide synthase gene in mouse macrophages activities for tumor cell killing.

Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1908–13.

17. **Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1994; **298**: 249–58.

18. **Simmons MI, Murphy S.** Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem* 1992; **59**: 897–905.

19. **Faraci F, Brian JE.** Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 1994; **25**: 692–703.

20. **Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke Z, Fu ZF, Hanlon C, Dietzsgold B.** *In vivo* expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3024–7.

21. **Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; **8**: 3–11.

22. **Dawson TM, Snyder SH.** Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neuroscience* 1994; **14**: 5147–59.

23. **Dawson VL.** Nitric oxide. Role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharm Physiol* 1995; **22**: 305–8.

24. **Nowicki JP, Duval D, Poingent H, Scatton B.** Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol* 1991; **204**: 339–40.

25. **Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW.** Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 1994; **13**: 487–94.

26. **Boje KM, Arora PK.** Microglial-produced nitric oxide and reactive oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992; **587**: 250–56.

27. **Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3030–4.

28. **Kennedy M, Denenberg AG, Szabo C, Salzman AL.** Poly (ADP-ribose) synthetase activation mediates increased permeability induced by peroxynitrite in Caco-2B cells. *Gastroenterology* 1998; **114**: 510–8.

29. **Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM, Klein S, Shields PG, Billiar TR, Harris CC.** Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 1998; **58**: 334–41.

30. **Hara E, Takahashi K, Tominaga T, Kumabe T, Kayama T, Suzuki H, Fujita H, Yoshimoto T, Shirato K, Shibahara S.** Expression of heme oxygenase and inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **224**: 153–8.

31. **Sosunov AA, Chairkin IN, Odyvanova LR, Guski G, Tservos-Navarro DZh.** Nitric oxide synthase in neuroepithelial brain tumors. *Arkh Patol* 1997; **59**: 61–5 (in Russian).

32. **Whittle IR, Collins F, Kelly PA, Ritchie I, Ironside JW.** Nitric oxide synthase is expressed in experimental malignant glioma and influences tumor blood flow. *Acta Neurochir (Wien)* 1996; **138**: 870–5.

33. **Bakshi A, Nag TC, Wadhwa S, Mahapatra AK, Sarkar C.** The expression of nitric oxide synthase in human brain tumours and peritumoral areas. *J Neurol Sci* 1998; **155**: 196–203.

34. **Tawara Y, Kagaya A, Uchitomi Y, Horiguchi J, Yamawaki S.** Lipopolysaccharide regulates both serotonin and thrombin-induced intracellular calcium mobilization in rat C6 glioma cells: possible involvement of nitric oxide synthase-mediated pathway. *J Neurosci Res* 1998; **51**: 517–25.

35. **Swaroop GR, Malcolm GP, Kelly PA, Ritchie I, Whittle IR.** Effect of nitric oxide modulation on tumour blood flow and microvascular permeability in C6 glioma. *Neuroreport* 1998; **9**: 2577–81.

36. **Сенько ЛН, Гридина НЯ, Розуменко ВД.** Корреляция активности NO-синтазы (NOS) с ростом экспериментальной глиальной опухоли *in vivo*. В: Нейромодулирующее влияние трансплантации эмбриональной нервной ткани (ТЭНТ) III научно-практическая конференция, 8–10 апреля 1999, Киев, Украина, 1999: 153.

37. **McCafferty DM, Mudgett JS, Swain MG, Kubes P.** Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1997; **112**: 1022–7.

38. **Stuehr DJ, Marletta MA.** Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* 1987; **47**: 5590–4.

39. **Rosales AA, Roque RS.** Microglia-derived cytotoxic factors. Inhibition of tumor cell growth *in vitro*. *Brain Res* 1997; **748**: 195–204.

40. **Richardson DR, Neumannova V, Ponka P.** Nitrogen monoxide decreases iron from uptake from transferrin but does not mobilise iron from prelabelled neoplastic cells. *Biochem Biophys Acta* 1995; **1226**: 250–60.

41. **Pening HP, Rajavashtish TB, Libby P, Liao JK.** Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17050–5.

42. **Kubes P, Suzuki M, Gragner DN.** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4651–85.

43. **Morrison RS, Yamaguchi F, Bruner J.** Fibroblast growth factor receptor gene expression and immunoreactive are elevated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1994; **54**: 2794–9.

44. **Miyaji K, Tani E, Nakano A, Ikemoto H, Kaba K.** Inhibition by fibroblast by 5'-methylthioadenosine of cell growth and tyrosine kinase activity stimulated by fibroblast growth factor receptor in human gliomas. *J Neurosurg* 1995; **83**: 690–7.

45. **Galea E, Reddi J, Feinstein DL.** Differential suppression of glial nitric oxide synthase induction by structurally related tyrosine kinase inhibitors. *Neuroscience Lett* 1995; **200**: 195–8.

46. **Pollack IF, Kaweski S.** The effect of calphostin C, a potent photodependent protein kinase C inhibitor on the proliferation of glioma cells *in vitro*. *J Neurooncol* 1997; **31**: 255–66.

47. **Yoon HJ, Jun CD, Kim JM.** Phorbol ester synergistically increased interferon-gamma induced nitric oxide synthesis in murine microglial cells. *Neuroimmunomodulation* 1994; **1**: 377–82.

48. **Fensel K, Kroncke KD, Meyer K.** Nitric oxide induced apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 1995; **155**: 2858–65.

49. **Young LT, Woods CM, Wang JF, Asghari V.** Nitric oxide donor SIN-1 mediated down-regulation of G-protein alpha-subunits in C6 glioma cells. *Life Sci* 1997; **16**: 1279–85.

50. **Adami A, Crivellente F, De Prati AC, Cavalieri E, Cuzzolin L, Tommasi M, Suzuki H, Benoni G.** Biotransformation and cytotoxic properties of NO-donors on MCF7 and U251 cell lines. *Life Sci* 1998; **63**: 2097–105.

51. **Rieger J, Stander M, Loschmann PA, Heneka M, Dichgans J, Klockgether T, Weller M.** Synthesis and biological effects of NO in malignant glioma cells: modulation by cytokines including CD95L and TGF-beta, dexamethasone, and p53 gene transfer. *Oncogene* 1998; **17**: 323–32.

52. **Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Fellae-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E, Billir TR, Harris CC.** Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2442–7.