

**Экстрацеллюлярная NADPH оксидаза из асцитной
жидкости карциномы Эрлиха и дисбаланс между
прооксидантными и антиоксидантными
металлопротеинами клеток тканей мышей**

**М.К.Алексанян¹, Р.М.Симонян², Г.М.Симонян², М.А.Бабаян²,
С.С.Алексанян¹, М.А.Симонян²**

¹*Государственный педагогический институт им. М.Налбандяна, Гюмри*

²*Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, ткань, NADPH
оксидаза, металлопротеины

В настоящее время широко исследуются механизмы пролиферации и апоптоза клеток асцитной карциномы различного характера, ассоциированные со свойственными изменениями метаболизма активных форм кислорода (АФК). Так, при Уолкер 256 асцитной опухоли у крыс ионы Са стимулируют энергетический баланс лимфоцитов селезенки с повышением уровня АФК [6]. При асцитной карциноме гепатомы Сеиделя окислительно-восстановительный статус в плазме крови и в зоне развития асцитных опухолевых клеток печени опухоленосителей существенно повышается число лейкоцитов. При этом происходит стимулирование оксидативного повреждения здоровых клеток, а в зоне развития опухоли уровень макрофагов снижается, соответственно падает содержание АФК [12]. Путем увеличения уровня АФК 54 нмоль диазепамом (убихиноновое лекарство) наблюдается стимулирование роста клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) [10]. Однако под влиянием ультразвука (2,17 МГц, с интенсивностью 3W/см²) наблюдается оксидативное повреждение мембран клеток продуцируемыми гидроксильными радикалами, вызывается апоптоз опухолевых клеток [7]. С другой стороны, механизмы подавления антиопухолевой активности *in vitro* связываются с апоптозом опухоли Т-клетками, которые в большинстве локализованы в тимусе, как органе иммунной системы. У мышей,

носителей клеток АКЭ, число этих клеток обратно пропорционально содержанию тимоцитов. Опухоль индуцирует апоптоз тимоцитов при АКЭ у мышей, а черный чай защищает клетки тимуса и подавляет оксидативное повреждение тимоцитов, снижая уровень АФК, продуцируемых в тимусе, но повышая их уровень при АКЭ у мышей, проявляя противоопухолевый эффект [8]. При АКЭ *in vivo* наблюдается дисбаланс между повышенным уровнем перекиси водорода, продуцируемым супероксиддисмутазой, и пониженным уровнем ГПО (утилизирует H_2O_2). На поверхности гранул внутриклеточного липопро-теина клеток АКЭ найдены места восстановления паранитрофиолетового тетразолия, что свидетельствует о продуцировании O_2^- на поверхности этих гранул [11]. С другой стороны, при АКЭ активность антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО, глутатионтрансфераза) снижается в логарифмической фазе развития опухолевых клеток, но повышается в следующей фазе их развития [14]. После облучения видимого света ртутной лампой АКЭ наблюдается повышение уровня АФК *in vitro*, с существенным снижением выживаемости опухолевых клеток [9].

К настоящему времени еще комплексно и одновременно не определены уровни металлопротеинов прооксидантной активности – МПА (изоформа NADPH оксидазы из АКЭ), металлопротеинов антиоксидантной активности – МАА (изоформы СОД, каталаза) из тканей мышей. Это явилось целью работы.

Материал и методы

АКЭ у белых мышей массой 19-22 г вызывали внутрибрюшинным введением 0,3 мл асцитной жидкости (около 1 млн опухолевых клеток) [1,2]. Через 13-16 дней после декапитации животных производился забор АКЭ.

Выделение фракций изоформ NADPH оксидазы (или цитохрома b_{558}) из мембран клеток селезенки (МКС), мембран клеток печени (МКП), мембран клеток почек (МКПЧ) белых мышей

Фракцию NADPH оксидазы из водной смеси МКС, МКП и МКПЧ выделяли и очищали лицензированным способом без использования детергента для солюбилизации этих гемопротеинов (использовали по 0,1 г ткани селезенки, 5 г печени и 0,5 г почек). После промывания тканей физиологическим раствором и взвешивания их гомогенизировали в 0,25 М сахарозы (по 0,5г ткани в 10 мл сахарозы) стеклянным гомогенизатором с тефлоновым пестиком в течение 1 мин

при 4°C. Мембраны клеток осаждали дифференциальным центрифугированием. Осадок мембран промывали водой (1:50 об/об) и повторно центрифугировали (10 000 об/мин, 10 мин). Очищенные от следов сахарозы и других сопутствующих водорастворимых солей МКС, МКП, МКПЧ смешивали с водой (1:5 об/об) и окончательно гомогенизировали в аналогичном режиме и после солюбилизации фракции изоформы NADPH оксидазы из этих очищенных мембран, удаления нерастворимых осадков центрифугированием и диализа надосадочных растворов против воды, фракции изоформ NADPH оксидазы из приведенных мембран клеток подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой КМ-52 (для удаления следов гемоглобина или других сопутствующих белков основной природы). Не задерживающиеся на колонке с КМ-52 белковые фракции далее подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой ДЕ-52. После промывания этой колонки сначала водой, а затем 0,01 М калий-фосфатным буфером pH 7,4 (КФБ) фракции изоформ NADPH оксидазы кислой природы элюировали из колонки с ДЕ-52 0,2 М КФБ [3].

Выделение фракции NADPH оксидазы из эритроцитарных мембран (ЭМ) мышей

Фракцию NADPH оксидазы из ЭМ у интактных мышей и мышей, носителей АКЭ, выделяли лицензированным способом [4], путем их солюбилизации из ЭМ (из 0,5 мл эритроцитов), диализа против воды, центрифугирования и ионообменной хроматографии супернатанта на колонке с целлюлозой КМ-52 и ДЕ-52.

Выделение фракций экстрацеллюлярной NADPH оксидазы из сыворотки крови мышей и асцитной жидкости карциномы Эрлиха

После инкубирования очищенной от следов эритроцитов и плазменных клеток сыворотки крови мышей и асцитной жидкости в течение 4 суток при 4° их подвергали диализу против воды. После центрифугирования диализата (6000 об/мин, 10 мин) и удаления из нее липопротеина высокой плотности, супрола, повторным центрифугированием фракцию экстрацеллюлярной NADPH оксидазы выделяли ионообменной хроматографией надосадочного раствора на сефадексе ДЕАЕ А-50 с элюированием 0,04 М КФБ. После разбавления элюата водой (20 раз) и ионообменного хроматографирования на колонке с целлюлозой ДЕ-52 фракцию экстрацеллюлярной NADPH оксидазы элюировали 0,04 М КФБ [5].

Уровень NADPH оксидазы определяли путем измерения характерной для нее оптической плотности при A_{530} (β -полоса поглощения).

Удельное содержание NADPH оксидазы (цит b_{558}) из МКС, МКП, МКПЧ, ЭМ, сыворотки крови и асцитной жидкости определяли из расчета на 1 мл раствора цит b_{558} , полученного из 1 г селезенки, 1 г печени, 1 г почек, 1 мл сыворотки, 1 мл асцитной жидкости и 1 мл эритроцитов.

Определение NADPH-зависимой O_2 -продуцирующей активности изоформ NADPH оксидаз (изоформы цит b_{558}) мышей

NADPH-зависимую O_2 -продуцирующую активность изоформ NADPH оксидазы определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом, путем вычисления процента образующегося формазана при 560 нм в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу NADPH-зависимой O_2 -продуцирующей активности изоформ NADPH оксидазы принимали количество белка (плотность оптического поглощения β -полосы цит b_{558} при 530 нм), которое стимулирует образование формазана на 50%. Удельная NADPH-зависимая O_2 -продуцирующая активность была определена в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки или 1 г тканей.

Определение ферриHb-восстанавливающей активности NADPH оксидазы (изоформы цит b_{558})

ФерриHb-восстанавливающую активность изоформы NADPH оксидазы определяли с использованием свежеполученной ферриHb цитоплазмы эритроцитов белых мышей с величиной плотности оптического поглощения (α -полоса поглощения) при $A_{565} = 0,6$ оптических единиц. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3 мл раствора ферриHb добавляли 0,2 мл цит b_{558} с $A_{530} = 0,2$. После перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 15-16 ч при 30°. Далее, после повторного перемешивания реакционной смеси, определяли кинетику восстановления ферриHb до ферроHb, путем измерения снижения плотности α -полосы поглощения ферри Hb при 565 нм (это снижение прямо пропорционально образующемуся ферроHb при A_{555}). За единицу ферриHb-восстанавливающей активности NADPH оксидазы принимали количество белка, вызывающего снижение плотности максимального оптического поглощения α -полосы ферриHb величиной до 0,05 оптических единиц в течение часа при 20°. Удельная ферриHb-восстанавливающая активность изоформы NADPH оксидазы была определена в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки и 1 г тканей [13].

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре "Specord UV/VIS" (Германия), с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли

общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности «р».

Результаты и обсуждение

По сравнению с показателями интактных мышей, у мышей-носителей АКЭ в подавляющем большинстве наблюдается резкое повышение уровня изоформ NADPH оксидазы (цит b_{558}) из МКС, МКП, МКПЧ и ЭМ (16-191%). Снижается только уровень экстрацеллюлярной NADPH оксидазы из сыворотки крови мышей (27,3 %), носителей АКЭ, как это показано на рис.1. Резко повышается и NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность этих NADPH оксидаз в среднем от 23 до 164 % (рис.2). У мышей, носителей АКЭ, ферриHb-восстанавливающая активность заметно снижается (12-41 %), как это показано на рис.3. При этом наблюдается неадекватное изменение уровня и активности NADPH оксидаз в мембранах клеток приведенных тканей. На этом фоне активность

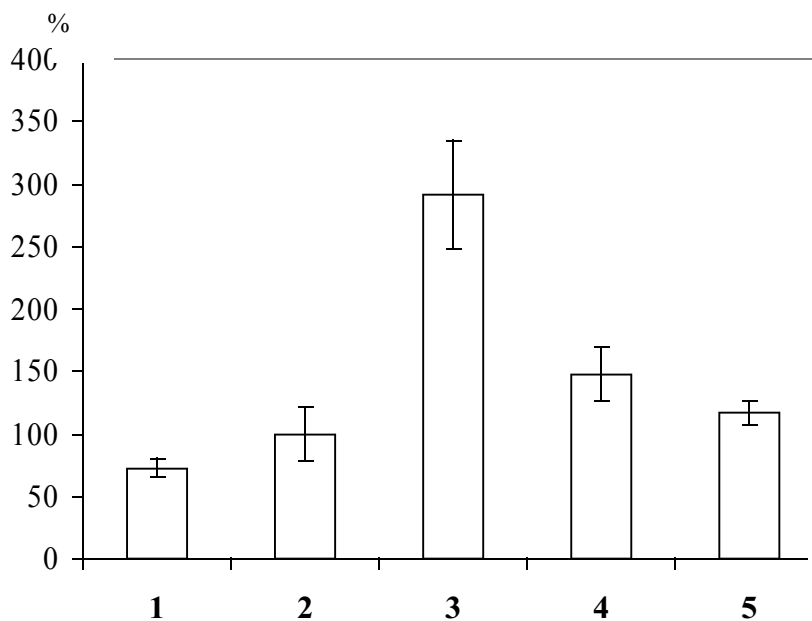


Рис.1. Изменение (%) уровня МПА (плотность максимального оптического поглощения NADPH оксидаз при 530 нм) в тканях мышей, носителей АКЭ: сыворотка крови (1), ЭМ (2), МКП (3), МКПЧ (4) и МКС (5), $p < 0,05$, $n = 6$

%

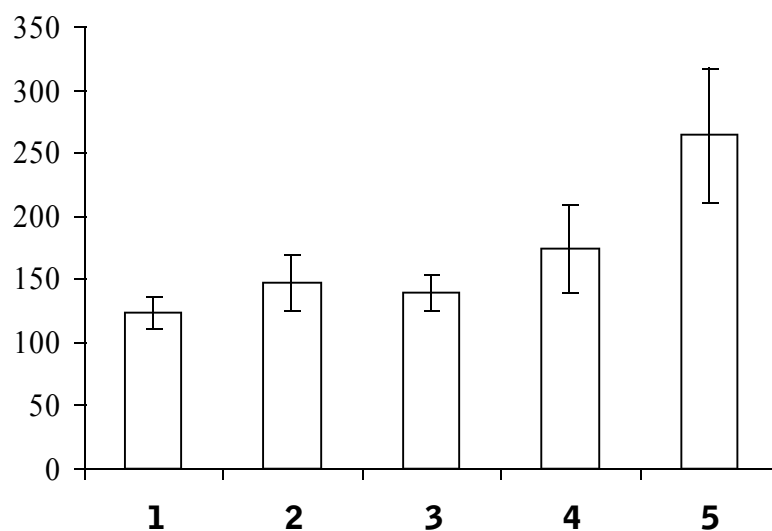


Рис.2. Изменение (%) NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности NADPH оксидазы в тканях мышей, носителей АКЭ: сыворотка крови (1), ЭМ (2), МКП (3), МКПЧ (4) и МКС (5), $p < 0,05$, $n = 6$

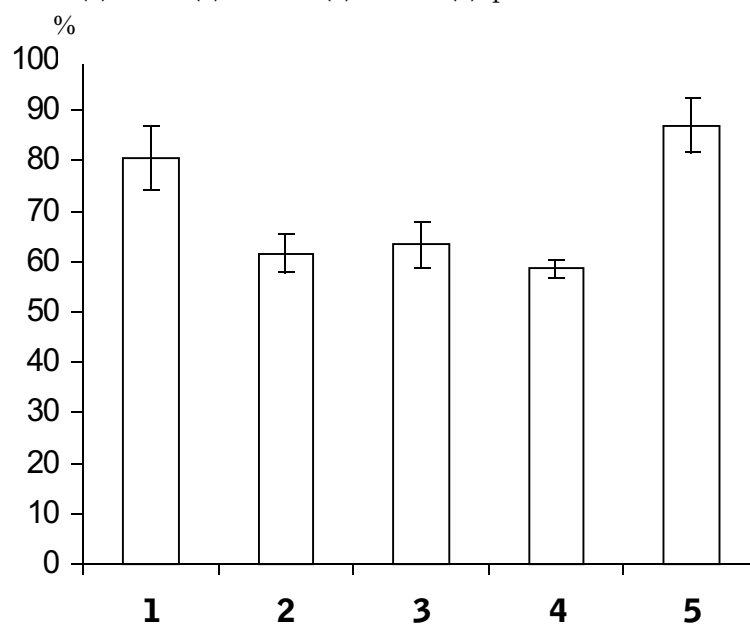


Рис.3. Изменение (%) ферритинHb-восстанавливающей активности NADPH оксидазы в тканях мышей, носителей АКЭ: сыворотка крови (1), ЭМ(2), МКП (3), МКПЧ (4) и МКС (5), $p < 0,05$, $n = 6$

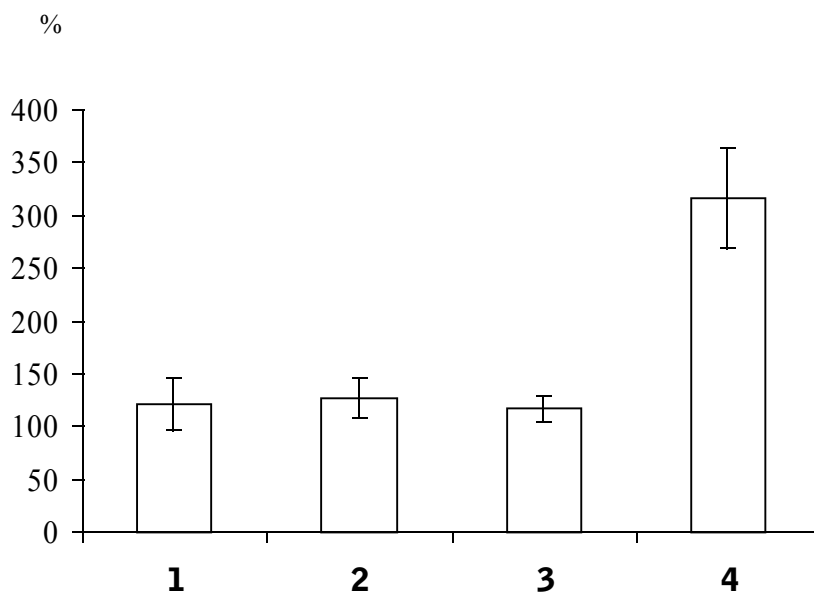


Рис.4. Изменение (%) супероксиддисмутазной активности фракции в тканях мышцей, носителей АКЭ: эритроциты (1), печень(2), почки (3) и селезенка (4), $p < 0,05$, $n = 6$

Cu,Zn-СОД эритроцитов и суммарная Cu,Zn-СОД и Mn-СОД активность печени, почек и, особенно, селезенки повышается до 2,16 раза (рис. 4). Повышение СОД активности является ответом адаптационных механизмов клеток против резкого повышения уровня O_2^- . С другой стороны, у мышцей-опухоленосителей активность каталазы в эритроцитах и печени снижается, но повышается в клетках почек и клетках селезенки ($69,1 \pm 6,5$, $p < 0,02$) (рис. 5). Возможное увеличение уровня каталазы в клетках почек и селезенки ассоциировано с увеличением активности СОД (продуктом дисмутирования O_2^- по схеме: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ является перекись водорода, которая является субстратом каталазы) для того, чтобы расщепить продуцируемую перекись водорода. Однако это предположение не действует на примере эритроцитов и печени. Видимо, уровень H_2O_2 снижается глутатионпероксидазой, уровень которой повышается [14]. Расчетный суммарный уровень МПА значительно превышает таковой у МАА. В результате этого уровень АФК (O_2^- , H_2O_2 , $HO^\bullet$) повышается в клетках этих тканей мышцей, вызывая их оксидативное повреждение [7, 8,12].

%

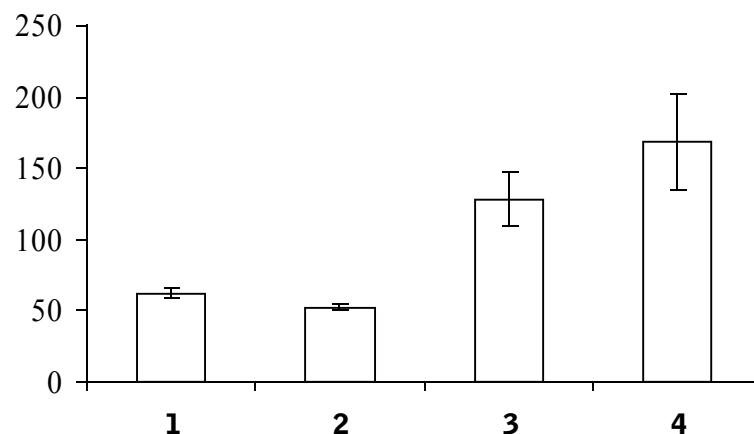


Рис.5. Изменение (%) каталазной активности фракции в тканях мышей, носителей АКЭ: эритроциты (1), печень (2), почки (3) и селезенка (4), $p < 0,05$, $n = 6$

Оптические спектральные характеристики фракций NADPH оксидазы из ЭМ, МКС, МКП, МКПЧ и сыворотки в подавляющем большинстве не отличаются от таковых у NADPH оксидаз из мембран клеток тканей мышей, носителей АКЭ (рис.6). На примере оптического спектра поглощения NADPH оксидазы из МКС можно заметить наличие характерной формы и максимумов оптического поглощения (при 530 нм, 560 нм, 412 нм – в окисленном состоянии, 558 нм, 562 нм и 518 нм – в восстановленном).

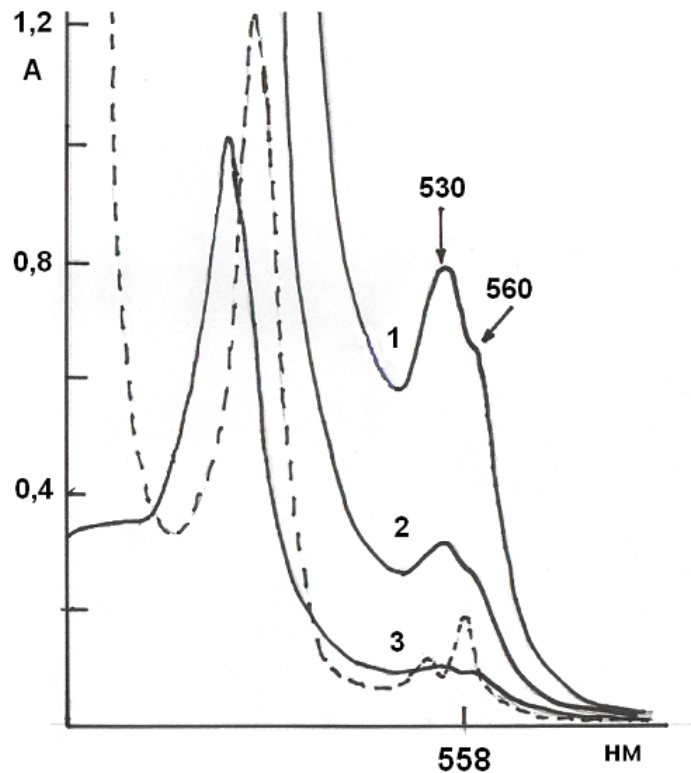


Рис.6. Оптические спектры изоформ NADPH оксидазы: селезенка и эритроциты (1), печень (2) и почки (3) в окисленном состоянии и после восстановления последней дитионитом натрия (-----)

Впервые из асцитной жидкости АКЭ получена изоформа NADPH оксидазы слабокислой натуры с характерными для экстрацеллюлярной NADPH оксидазы из сыворотки млекопитающих оптическими спектральными свойствами (имеется характерный для экстрацеллюлярной NADPH оксидазы максимум оптического поглощения при 485 нм) (рис.7). Из 40 мл асцитной жидкости АКЭ получено 20 мл фракции NADPH оксидазы слабокислого характера с $A_{560} = 0,2$ оптических единиц. Причем NADPH оксидаза из АКЭ также обладает NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностью. По сравнению с экстрацеллюлярной NADPH оксидазой из сыворотки крови человека и крыс, NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность экстрацеллюлярной NADPH оксидазы из АКЭ снижена на $19,1 \pm 2,5\%$ ($p < 0,02$),

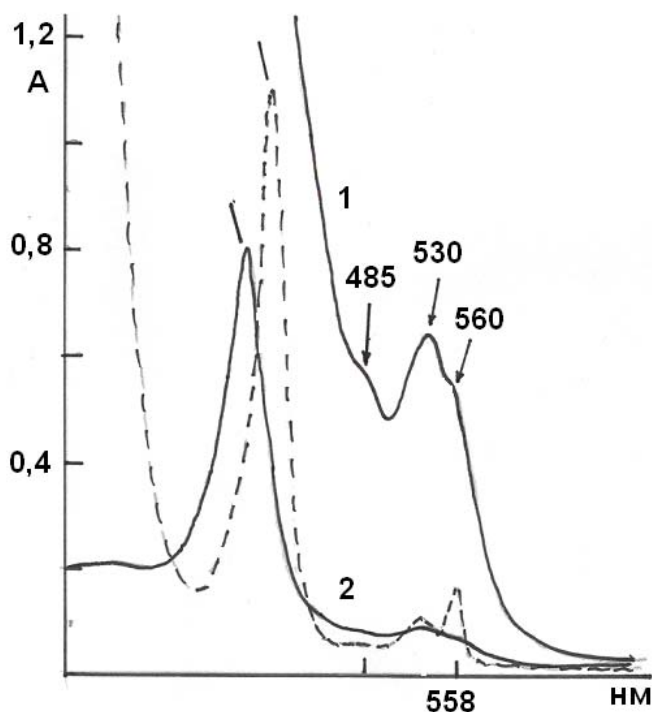


Рис.7. Оптические спектры поглощения концентрированной экстрацеллюлярной NADPH оксидазы из асцитной жидкости АКЭ: сыворотка крови млекопитающих (человек, крыса, мышь) (1) и после их разбавления 0,2 М калий-фосфатным буфером, pH 7,4, в окисленном (2) и восстановленном дитионитом натрия состоянии (----)

$16,8 \pm 3,3\%$ ($p < 0,02$) соответственно и повышена на $28,3 \pm 4,1\%$ ($p < 0,02$) по сравнению с экстрацеллюлярной NADPH оксидазой из сыворотки здоровых мышей. Фактически для пролиферации и развития опухолевых клеток основным источником продуцирования O_2^- является экстрацеллюлярная NADPH оксидаза при АКЭ *in vivo*. Чрезмерное продуцирование O_2^- этим ферментом на конечных этапах проживания мышей может повысить фон оксидативного повреждения этих клеток, вызывая гибель животных. Уровень NADPH оксидазы из опухолевых клеток АКЭ на конечных стадиях эксперимента (через 14-16 дней) ниже такового у экстрацеллюлярной NADPH оксидазы из асцитной жидкости до 8-10 раз.

Таким образом, характерной особенностью канцерогенеза АКЭ является то, что ключевым источником продуцирования O_2^- для

аэробных метаболических процессов при развитии АКЭ является экстрацеллюлярная NADPH оксидаза, у которой ферриHb-восстанавливающая активность снижена ($31,5 \pm 3,0$, $p < 0,05$), по сравнению с сывороточными NADPH оксидазами других млекопитающих. Это является фактором изменения кислородного гомеостаза в опухолевых клетках у мышей при АКЭ.

Полученные данные дают основание выдвинуть предположение о возможном уничтожении экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (как основного компонента АКЭ) антителами, образующимися против этого фермента, полученного из асцитной жидкости АКЭ.

Поступила 19,07,11

**Արտաբջջային ՆԱԴՔԻH օքսիդազը Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի
հեղուկից և հաշվեկշռի խախտումը հյուսվածքների բջիջների
պրոօքսիդանտային և հակաօքսիդանտային
մետաղապրոտեինների միջև**

**Մ.Կ. Ալեքսանյան, Ռ.Մ. Միմոնյան, Գ.Մ. Միմոնյան, Մ.Ա. Բաբայան,
Ս.Ս. Ալեքսանյան, Մ.Ա. Միմոնյան**

Առողջ մկների ցուցանիշների համեմատ Էրլիխի կարցինոմա (ԷԱԿ) կրող մկների մոտ մեծամասամբ դիտվում է ՆԱԴՔԻH օքսիդազի (ցիտոքրոմ b_{558}) իզոմերների մակարդակների աճ (16-191%) ստացված փայծաղի (ՓԲԹ), լյարդի (ԼԲԹ), երիկամի բջջաթաղանթներից (ԵԲԹ) և երիթրոցիտների թաղանթներից (ԷԹ): Նվազում է միայն ԷԱԿ կրող մկների արյան շիճուկից ստացված արտաբջջային ՆԱԴՔԻH օքսիդազի մակարդակը (27,3%): Միաժամանակ բարձրանում է այդ ֆերմենտների ՆԱԴՔԻH-կախյալ O_2^- -գոյացնող և նվազում դրանց ֆերրիHb-վերականգնող ակտիվությունները (12-41%): Դրան զուգընթաց աճում է Cu,Zn-ՍՕԴ-ի ակտիվությունը երիթրոցիտների ցիտազոլում և Cu,Zn-ՍՕԴ-ի ու Mn-ՍՕԴ-ի գումարային ակտիվությունը հյուսվածքների, հատկապես փայծաղի բջիջներում: Սակայն կատալազային ակտիվության անկում է դիտվում երիթրոցիտներում և լյարդում, իսկ աճ՝ երիկամներում, հատկապես փայծաղում: ԷԹ-ից, ՓԲԹ-ից, ԼԲԹ-ից և ԵԲԹ-ից ու արյան շիճուկից ստացված ՆԱԴՔԻH օքսիդազի ֆրակցիաների օպտիկական սպեկտրալ բնութագրերը չեն տարբերվում դրանցից ԷԱԿ կրող մկների մոտ:

Առաջին անգամ Էրլիխի կարցինոմայի ասցիտային հեղուկից անջատվել է թթվային բնույթի ՆԱԴՓH օքսիդազ, որն ունի կաթնասունների արյան շիճուկից ստացված արտաբջջային ՆԱԴՓH օքսիդազին բնորոշ կլանում՝ 485 նմ-ում: Էրլիխի ասցիտային հեղուկից անջատված արտաբջջային ՆԱԴՓH օքսիդազի ՆԱԴՓH-կախյալ O_2^- - գոյացնող ակտիվությունը պակաս է, համեմատած առողջ մկների արյան շիճուկից ստացված արտաբջջային ՆԱԴՓH օքսիդազների հետ, սակայն դրա քանակությունը 8-10 անգամ ավելի է:

Այսպիսով՝ ԷԱԿ-ի ուռուցքագոյացման ժամանակ դիտվում է պրոօքսիդանտային կարգավիճակի աճ և թթվածնային հոմեոստազի ընկճում, համապատասխանաբար, արտաբջջային և թաղանթային ՆԱԴՓH օքսիդազների մակարդակների աճի և դրանց ֆերրիHb-վերականգնման ակտիվության նվազման հաշվին:

Extracellular NADPH oxidase from ascitic liquid of Ehrlich carcinoma and disbalance between prooxidant and antioxidant metalloproteins in tissue cells of the tumor carrier mice

**M.K.Alexanyan, R.M.Simonyan, G.M.Simonyan, M.A.Babayan,
S.S.Alexanyan, M.A. Simonyan**

In comparison with the indices of healthy mice, in the mice- carriers of the Ehrlich ascitic carcinoma (EAC) in majority the elevation (16-191%) of the level of the isoforms of NADPH oxidase (cytochrome b_{558}) from cell membranes of spleen (SCM), liver (LSM), kidney (KCM) and erythrocyte membranes (EM) are observed. Only the level of extracellular NADPH oxidase from blood serum of the EAC carriers is decreased (27,3%). The NADPH depending O_2^- - producing activity of these enzymes increases , contrary to that its ferriHb-reducing activity decreases (12-41%). On the other hand, the activities of Cu,Zn-SOD from erythrocytes and total Cu,Zn-SOD and Mn-SOD activities from liver, kidney and , particularly, in spleen cells are increased in EAC carrier mice. The activity of catalase is decreased in the cells of liver and in erythrocytes and increased in the kidney cells and, particularly, in the spleen cells. The optical spectral characteristics of these NADPH oxidases in intact mice in majority do not differ in comparison with the same indices in the EAC- carriers.

An extracellular NADPH oxidase of acidic nature with the characteristic optical absorption spectrum has been isolated from EAC liquid of the mice (the absorbance band in the 485 nm is observed) for the

first time. The NADPH depending O_2^- - producing activity of this enzyme is decreased, in comparison with the extracellular NADPH oxidase from healthy mice, though, the level of extracellular NADPH oxidase from EAC liquid is higher (8-10 times).

Thus, an increase in the prooxidative status and decrease in the oxygen homeostasis in result of the elevation of the level of extracellular NADPH oxidase and cells membrane NADPH oxidase, and a decrease in its ferriHb-reducing activity is observed.

Литература

1. *Даниелян Э.П., Овсепян Гу.П., Степанян Г.М., Арсенян Ф.Г., Гарибджанян Б.Т.* Влияние заместителей на противоопухолевую активность некоторых дистиосемикарбазонов метил глиоксаля и их хелатов с ионами меди (Cu^{+2}). Хим.фарм., 2008, 9, с. 42-44.
2. *Ирадян М.А., Ирадян Н.С., Степанян Г.М., Арсенян Ф.Г., Гарибджанян Б.Т.* Производные имидазола XXVIII. Синтез и противоопухолевая активность 4(5)-[4(3,3-диметилтриазено-1)]-3-нитрофенил имидазола и родственных веществ. Хим.фарм. 2001, 35, 4, с. 7-9.
3. *Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А.* Способ получения цитохрома b_{558} из клеточных компонентов. Лицензия изобрет. Армпатента, N 2233 А. Ереван, 2008.
4. *Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А.* Способ получения цитохрома b_{558} из эритроцитарных мембран. Лицензия изобрет. Армпатента, N 908. Ереван, 2001.
5. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М.* Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет.Армпатента, N 341. Ереван, 1997.
6. *Degasperi G.R., Velho J.A., Zecchin K.G., Souza C.T et al.* Role of mitochondria in the immune response to cancer: a central role for Ca^{+2} . J.Bioenerg.Biomembr., 2006, 38(1): 1-10.
7. *Hao G., Liu G., Wang X., Li T., Tong W.Y.* Membrane damage effect of therapeutic ultrasound on Ehrlich ascetic tumor cells. Cancer.Biother.Radiopharm., 2004, 24(1): 41-48.
8. *Maddal D., Lahiry L., Bhattacharyya A., Chattopadhyay S., Siddiqi M., S.Gi., Das.T.* Black tea protects thymocytes in tumor-bearing animals by differential regulation of intracellular ROS in tumor cells and thymocytes. J.Emiron.Pathol.Toxicol., 2005, 24(4):91-104.
9. *Prilutska S.V., Burlaka A.P., Matyshevskaya O.P., Golub A.A. et al.* Effect of the visible light irradiation of fullerene-containing composites on the ROS generation and the viability of tumor cells. Exp.Oncol., 2006, 28(2): 160-162.
10. *Sakai M., Ferranz-de-Paula V., Pinheiro M.L. et al.* Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. Eur.J. Pharmacol., 2010, 626(2-3):131-138.
11. *Schwartzburd P.M., Lankin V.Z.* Endogenous induction of transient oxidant-imbalances in Ehrlich cells as a possible trigger to fast tumor liquid accumulation. Med.Oncol., 1995, 12(4): 203-207.

12. *Shatalin Iu. V., Naumov A.A., Potselueva M.M.* Variation in cell population size and reactive oxygen species level in the blood and the ascites liquid of tumor carrier. *Tsitologia*, 2010, 52(2): 131-135.
13. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A.* The reduction of hemoglobin by erythrocyte membranes cytochrome $b_{558}III$ at various pathological states in vitro. *Electronic J. Natural Sci. NAS RA*, 2006, 2(7): 3- 6.
14. *Smirnova L.P., Kondakova I.V.* Dependence of antioxidant enzyme activities rate and tissue organization of Ehrlich's carcinoma. *Biomed.Khim.*, 2004, 50(6):566-575.