

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616(006+009.7):[616.36:576.311.347:576.367]:616.092.9

**Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Бандовкина В.А.,
Каплиева И.В., Немашкалова Л.А., Трепитаки Л.К., Шейко Е.А., Качесова П.С., Черярина Н.Д.**

Показатели апоптоза в митохондриях клеток печени при росте меланомы В16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России,
344037, Ростов-на-Дону, Россия 14 линия, д. 63

Введение. Печень по количеству, плотности митохондрий один из самых богатых органов, который также является критическим местом для множества метаболических путей. **Цель исследования** – изучение показателей апоптоза в митохондриях печени самок мышей линии C57BL/6 при самостоятельном росте меланомы В16/F10 и на фоне коморбидной патологии – хронической нейрогенной боли.

Методика. В эксперименте использовали мышей-самок ($n=168$) линии C57BL/6. Группы: интактная ($n=21$); контрольная ($n=21$) – создание модели хронической нейрогенной боли (ХНБ), путем двусторонней перевязки седалищных нервов; группа сравнения ($n=63$) – подкожная трансплантация меланомы В16/F10; основная группа (ХНБ+В16/F10) ($n=63$) – подкожная трансплантация меланомы В16/F10 через 3 нед после моделирования ХНБ. В митохондриях печени методом ИФА определяли концентрацию: цитохрома С (нг/г белка), каспазы 9 (нг/г белка), Bcl-2 (нг/г белка), AIF (нг/г белка), кальция (Са²⁺) (мМоль/г белка).

Результаты. В митохондриях клеток печени через 1 нед роста меланомы относительно интактных значений фиксировали нарастание уровней AIF в 2,2 раза, цитохрома С в 1,7 раза ($p<0,05$) и снижение каспазы 9 в 2,0 раза; через 3 нед – падение кальция в 4,7 раза, AIF в 7,1 раза и цитохрома С в 1,7 раза ($p<0,05$) и накопление каспазы 9 – 1,6 раза ($p<0,05$). Развитие опухоли при ХНБ через 1 нед сопровождалось уменьшением концентрации AIF в 29,3 раза и цитохрома С в 2,0 раза по сравнению с контрольными значениями (ХНБ). Через 3 недели роста меланомы на фоне ХНБ фиксировали снижение уровней AIF в 6,6 раза, цитохрома С в 4,7 раза и кальция в 32,8 раза, уровень каспазы 9, напротив, повышался в 1,5 раза ($p<0,05$).

Заключение. Наличие коморбидной патологии – ХНБ при опухолевом процессе способствует раннему возникновению нарушений в электронно-транспортной цепи митохондрий клеток печени.

Ключевые слова: митохондрии клеток; печень; апоптоз; мыши-самки; экспериментальная меланوما В16/F10; коморбидные заболевания; хроническая нейрогенная боль

Для цитирования. Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Немашкалова Л.А., Трепитаки Л.К., Шейко Е.А., Качесова П.С., Черярина Н.Д. Показатели апоптоза в митохондриях печени при росте меланомы В16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 71-79.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.71-79

Для корреспонденции: Нескубина Ирина Валерьевна, e-mail: nes Kubina.irina@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Франциянц Е.М., Нескубина И.В.; сбор и обработка материала – Трепитаки Л.К., Шейко Е.А., Качесова П.С., Немашкалова Л.А., Черярина Н.Д.; статистическая обработка – Сурикова Е.И., Бандовкина В.А.; написание текста – Франциянц Е.М., Нескубина И.В.; редактирование – Шихлярова А.И., Каплиева И.В.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.06.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Shikhlyarova A.I., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Nemashkalova L.A., Trepitaki L.K., Sheiko E.A., Kachesova P.S., Cheryarina N.D.

Apoptosis indices in liver cell mitochondria in B16/F10 melanoma growing in presence of chronic neurogenic pain

National Medical Research Centre for Oncology,
Rostov-on-Don, 14th Liniya 63, Bld. 8, Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

Background. The liver is one of the richest organs in terms of the number and density of mitochondria; it is also a critical site for many metabolic pathways. **The aim** of the study was to analyze indicators of apoptosis in liver mitochondria in female C57BL/6 mice with B16/F10 melanoma growing alone and in presence of chronic neurogenic pain.

Methods. Female C57BL/6 mice ($n=168$) were studied. Animals were divided into groups: intact group ($n=21$); controls ($n=21$) with a model of chronic neurogenic pain (CNP) created by bilateral sciatic nerve ligation; comparison group ($n=63$) with subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma; main group (CNP+B16/F10) ($n=63$) with subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma 3 wks after modeling CNP. Cytochrome C (ng/g protein), caspase-9 (ng/g protein), Bcl-2 (ng/g protein), AIF (ng/g protein), and calcium (Ca²⁺) (mmol/g protein) were measured by ELISA in the liver mitochondrial fraction.

Results. After 1 wk of melanoma growth, AIF increased by 2.2 times, cytochrome C increased by 1.7 times ($p<0.05$), and caspase-9 decreased by 2.0 times compared to the intact group values. After 3 wks, calcium decreased by 4.7 times, AIF by 7.1 times, cytochrome C by 1.7 times ($p<0.05$), and caspase-9 increased by 1.6 times ($p<0.05$). After 1 wk, tumor development in the presence of CNP was accompanied by decreases in AIF by 29.3 times and cytochrome C by 2.0 times, compared to control CNP values. After 3 wks of melanoma growth in presence of CNP, AIF decreased by 6.6 times, cytochrome C by 4.7 times, and calcium by 32.8 times. Caspase-9, on the contrary, increased by 1.5 times ($p<0.05$).

Conclusions. The presence of CNP comorbidity during the tumor development facilitates earlier occurrence of disorders in the electron transport chain of hepatocyte mitochondria.

Keywords: cell mitochondria; liver; apoptosis; female mice; experimental B16/F10 melanoma; comorbidity; chronic neurogenic pain

For citation: Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Shikhlyarova A.I., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Nemashkalova L.A., Trepitaki L.K., Sheiko E.A., Kachesova P.S., Cheryarina N.D. Apoptosis indices in liver cell mitochondria in B16/F10 melanoma growing in presence of chronic neurogenic pain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 71-79. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.71-79

For correspondence: Irina V. Neskubina, e-mail: nes kubina.irina@mail.ru

Contribution: concept and design of the study – Frantsiyants E.M., Neskubina I.V.; collection and processing of the material – Trepitaki L.K., Sheiko E.A., Kachesova P.S., Nemashkalova L.A., Cheryarina N.D.; statistical processing – Surikova E.I., Bandovkina V.A.; writing of the text – Frantsiyants E.M., Neskubina I.V.; editing – Shikhlyarova A.I., Kaplieva I.V.

Acknowledgment. The study was not sponsored.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interests.

Information about the authors:

Frantsiyants E.M., <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>

Neskubina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>

Surikova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

Shikhlyarova A.I., <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>

Bandovkina V.A., <https://orcid.org/0000-0002-2302-8271>

Kaplieva I.V., <https://orcid.org/0000-0002-3972-2452>

Nemashkalova L.A., <https://orcid.org/0000-0003-2713-8598>

Trepitaki L.K., <https://orcid.org/0000-0002-9749-2747>

Sheiko E.A., <https://orcid.org/0000-0002-9616-8996>

Kachesova P.S., <https://orcid.org/0000-0001-6928-5014>

Received 23.06.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

Введение

Печень – это многофункциональный орган, который играет ключевую роль в метаболическом гомеостазе, иммунной защите, и постоянно перестраивается

для обеспечения энергетических потребностей всего организма. Несмотря на замечательную адаптационную способность, длительное воздействие на клетки вредных факторов приводит к развитию хронических заболеваний печени. Существуют данные, свидетель-

ствующие о том, что дисфункция или дезадаптация митохондрий пагубно влияет на биоэнергетику гепатоцитов, которая выражается в нарушении гомеостаза активных форм кислорода (АФК), стрессе эндоплазматического ретикулума (ЭР), воспалении и гибели клеток [1]. Печень один из самых богатых органов с точки зрения количества и плотности расположения митохондрий.

Митохондрии представляют собой внутриклеточные органеллы, которые участвуют в биоэнергетическом метаболизме и клеточном гомеостазе, включая генерацию АТФ посредством транспорта электронов и окислительного фосфорилирования в сочетании с окислением метаболитов в цикле трикарбоновых кислот (ТСА) и катаболизме жирных кислот в реакциях β -окисления [3]. Митохондрии участвуют в производстве активных форм кислорода (АФК), а также иницировании и реализации апоптоза. Роль митохондрий в регулировании выживания или смерти клеток зависит от их исходного состояния [2]. Сообщалось, что здоровые митохондрии обеспечивают энергией соматические клетки, способствуют выживаемости и росту клеток [4, 5].

Митохондрии разных клеток различаются по размеру, плотности распределения, участию в метаболизме, скорости старения и апоптоза клеток [6]. В специализированных клетках органов (печени, мышц, сердца, почек и т. д.) митохондрии практически не делятся, а образуются предположительно в виде зародышевых прото-митохондрий диаметром менее 0,2 мкм, постепенно вырастают до зрелых органелл размером около 1 мкм и со временем деградируют до, так называемых, пост-митохондрий диаметром 1-6 мкм [7]. Учитывая важность митохондрий в функциональной активности печени, неудивительно, что возникает модификация работы митохондрий, как вероятного «центрального игрока» в развитии патологических процессов. Остается загадкой, почему митохондрии не могут адаптироваться к метаболическим проблемам и может ли прицельное воздействие на митохондрии предотвращать или обращать вспять прогрессирование их дисфункции [1].

Ранее было показано, что злокачественная опухоль не растет сама по себе в организме [8], а онкопроцесс – это опухолевая болезнь, которая предполагает участие всех внутренних органов в обеспечении опухолевого роста.

В свете этого исследования интересным представлялось изучение показателей апоптоза в митохондриях клеток печени на этапах подкожного роста меланомы.

Цель исследования – изучение показателей апоптоза в митохондриях печени самок мышей линии C57BL/6 при самостоятельном росте меланомы B16/F10 и на фоне коморбидной патологии – хронической нейрогенной боли.

Методика

Работа выполнена на мышах-самках линии C57BL/6 ($n=168$), возраст 8 нед, начальная масса 21–22 г. Животные были получены из ФГБУ МНИЦ Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышинной меланомы B16/F10, метастазирующую в легкие. Опухолевый штамм получен из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 31.05.2018, был одобрен протокол исследования (протокол этического комитета № 2). Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики.

Животные ($n=168$) были рандомизированы на 4 группы: **интактная группа** ($n=21$), **контрольная группа** ($n=21$) – моделирование хронической нейрогенной боли (ХНБ). (Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Треничкин Л.К., Котиева И.М. *Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы B16 у мышей*)¹. **Группа сравнения** ($n=63$) – мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы B16/F10, **основная группа** ($n=63$) (ХНБ+B16/F10) – мыши, которым меланому B16/F10 перевивали через 3 нед после моделирования ХНБ.

Мышам основной группы (ХНБ+B16/F10) осуществляли двустороннюю перевязку седалищных нервов под ксила-золетилловым наркозом: ксилазин (препарат Ксила) внутримышечно (0,05 мл/кг, по инструкции), через 10 мин – Золетил-50 (10 мг на 100 г). Через 3 нед после заживления операционной раны

¹Патент на изобретение RU 2650587 C1, 16.04.2018.

подкожно под правую лопатку вводили 0,5 мл взвеси опухолевых клеток меланомы B16/F10 в физиологическом растворе в разведении 1:10. Животным из группы сравнения трансплантировали меланому B16/F10 подкожно в той же дозе и объёме, что и в основной группе, но без моделирования хронической боли. Декапитацию всех животных производили на гильотине. Животных из основной группы и группы сравнения декапитировали в следующие сроки роста меланомы B16/F10: 1-я нед (7-е сут роста), 2-я нед (14 – сут роста) и 3-я нед (21-е сут роста).

После декапитации у животных с применением хладагентов быстро извлекали печень и выделяли митохондрии по методу М.В. Егоровой, С.А. Афанасьева [9] с применением дифференциального центрифугирования на высокоскоростной рефрижераторной центрифуге Avanti J-E, BECMAN COULTER, США. Ткани промывали ледяным 0,9% раствором KCl. Для разрушения межклеточных связей, клеточной стенки и плазматических мембран применяли механическую обработку тканей с измельчением ножницами и гомогенизацией в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (гомогенизатор Поттера-Эльвегейма). На каждый грамм ткани добавляли по 10 мл среды выделения (0,22 М маннитол, 0,3 М сахароза, 1мМ ЭДТА, 2 мМ TRIS-HCL, 10мМ HEPES, pH 7,4). Ткани центрифугировали 1-й раз 10 мин при скорости 1000 g, температура 0-2 °С, 2-е и 3-е центрифугирование осуществлялось при 20 000 g, 20 мин, температура 0-2 °С. Между центрифугированием проводили процедуру ресуспендирования осадка митохондрий в среде выделения. Митохондрии дополнительно очищали от лизосом, пероксисом, меланосом, центрифугируя в 23% градиенте Перколла. Суспензию субклеточных структур наслаивали на градиент Перколла, центрифугировали 15 мин при 21 000 g, после чего наблюдалось разделение на 3 фазы, оставляли нижний слой митохондрий и ресуспендировали средой выделения. Следующую промывку митохондрий осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 15 000 g, температура 0-2 °С. Полученные митохондриальные образцы (концентрация белка 4-6 г/л) до анализа хранили при -80 °С в среде выделения. В митохондриальных образцах с помощью тест-систем на ИФА-анализаторе (Infinite F50 Tecan, Австрия) определяли концентрацию: цитохрома С (нг/г белка), каспазы-9 (нг/г белка) (Bioscience, Австрия); Bcl-2 (нг/г белка) (Thermo Fisher Scientific, Австрия); AIF (нг/г белка) (RayBiotech, США); кальция (Ca²⁺) (мМоль/г белка) (Абрис, Россия) и концентрацию белка в мг/мл – биуретовым методом (Ольвекс Диагностикум, Россия)

на автоматическом анализаторе ChemWell (Awareness Technology INC, США).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Полученные данные подвергали анализу на соответствие нормальному закону распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка (для малых выборок). Сравнение количественных данных в группах (независимые выборки) проводили с использованием критерия Краскала-Уоллиса (множественные сравнения). Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – стандартная ошибка среднего, за уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$. Полученные результаты статистически обрабатывали с соблюдением общих рекомендаций для медицинских исследований.

Результаты исследования

При изучении влияния ХНБ на митохондрии клеток печени обнаружили, что показатели характеризующие апоптоз в митохондриях печени у животных контрольной группы (ХНБ) статистически значимо отличались по ряду показателей от соответствующих значений у интактных животных (**таблица**). Так, уровень кальция был снижен в 2,7 раза. При этом повышенным оказался уровень AIF – в 1,5 раза ($p < 0,05$) и уровень цитохрома С – в 1,4 раза ($p < 0,05$), уровень Bcl-2 и каспазы 9 не изменялся.

В митохондриях клеток печени при стандартном развитии меланомы у самок мышей обнаружено, что через 1 нед после перевивки опухоли в митохондриях печени относительно показателя в митохондриях печени интактных животных изменялись величины показателей: AIF – возрастал в 2,2 раза, цитохром С – в 1,7 раза ($p < 0,05$), а уровень каспазы 9 – снижался в 1,95 раза (**таблица**). Не было выявлено изменений уровней кальция и Bcl-2. Через 2 нед от момента перевивки меланомы все исследуемые показатели оказались в пределах значений интактных животных. При этом относительно предыдущего срока исследования (1 нед), уровень AIF и цитохрома С были снижены в 2,7 и 2,2 раза, а уровень каспазы 9, напротив, повышен в 2,0 раза. Через 3 нед роста меланомы в митохондриях печени отмечено резкое снижение ряда показателей: уровень кальция снизился в 4,7 раза, уровень AIF – в 7,1 раза, уровень цитохрома С – 1,7 раза ($p < 0,05$). В то же время уровень каспазы 9, напротив, возрос в 1,6 раза ($p < 0,05$). Не отмечено изменений в содержании Bcl-2. По сравнению с предыдущим сроком исследования ряд изучаемых показателей был снижен: кальций в 6 раз, AIF

в 5,8 раза, а уровень каспазы 9 увеличился в 1,6 раза ($p < 0,05$).

В данном исследовании в качестве коморбидной патологии при злокачественном процессе использовали модель ХНБ. Известно, что онкологические больные испытывают боль различного характера [10]. Ранее нами было показано стимулирующее влияние ХНБ на рост перевивной меланомы у мышей-самок, что выражалось в более раннем выходе опухоли и метастазировании, в том числе, на нетрадиционные сайты, а также сокращении сроков жизни животных [11].

После перевивки опухоли на фоне ХНБ через 1 нед найдено резкое падение уровня AIF в 29,3 раза и прак-

тически двукратное снижение уровня цитохрома С. Через 2 нед уровень AIF вернулся к показателям у контрольных мышей, т.е. увеличился относительно предыдущего срока исследования в 24,5 раза, в 2,1 раза увеличился уровень каспазы 9. При этом не обнаружено изменений в содержании цитохрома С, а уровень кальция снизился в 33,5 раза относительно предыдущего срока и стал в 29,5 раза ниже значений контрольных животных. Через 3 нед от момента перевивки меланомы на фоне ХНБ уровень кальция оставался низким, как и в предыдущий срок, уровень цитохрома С относительно контрольного показателя снизился в 4,7 раза, а по сравнению со значениями на 2-й нед — в 5,5 раза.

Таблица/Table

Показатели апоптоза в митохондриях клеток печени самок мышей с меланомой B16/ F10 и меланомой сочетанной с хронической нейрогенной болью

Indicators of apoptosis in liver cell mitochondria in female mice with B16/F10 melanoma and with melanoma combined with chronic neurogenic pain

Показатели (indicators)	Ca ²⁺ мМоль/г белка (Ca ²⁺ mMol/g protein)	AIF нг/г белка (AIF ng/g protein)	Bcl-2 нг/г белка (Bcl-2 ng/g protein)	Цитохром С нг/г белка (Cytochrome C ng/g protein)	Каспаза 9 нг/г белка (Caspase 9 ng/g protein)
Интактная группа (intact group)	0,790±0,031	341,533±15,038	96,335±4,561	8,458±0,472	0,238±0,019
Группа с ХНБ контроль (CNP group control)	0,295±0,019 ¹ ¹ p=0,0000	511,413±36,675 ¹ ¹ p=0,0010	107,348±3,806	11,775±0,563 ¹ ¹ p=0,0007	0,238±0,019
Рост меланомы B16/F10 (группа сравнения) B16/F10 melanoma growth (comparison group)					
1 нед (1 week)	0,761±0,027	753,838±32,529 ¹ ¹ p=0,0000	112,189±4,405	14,748±0,756 ¹ ¹ p=0,0000	0,122±0,018 ¹ ¹ p=0,0009
2 нед (2 weeks)	1,014±0,035	278,963±26,065 ³ ³ p=0,00000	103,349±3,766	6,587±0,613 ³ ³ p=0,0000	0,236±0,019 ³ ³ p=0,0009
3 нед (3 weeks)	0,167±0,013 ^{1,3} ¹ p=0,0000 ³ p=0,0000	47,822±4,283 ^{1,3} ¹ p=0,0000 ³ p=0,0000	103,384±3,413	4,96±0,375 ¹ ¹ p=0,0000	0,373±0,022 ^{1,3} ¹ p=0,0006 ³ p=0,0005
ХНБ + рост меланомы B16/F10 (основная группа) CNP + B16/F10 melanoma growth (main group)					
1 нед (1 week)	0,335±0,017	17,446±2,677 ² ² p=0,0000	102,353±3,805	6,017±0,332 ² ² p=0,0000	0,251±0,016
2 нед (2 weeks)	0,010±0,0004 ^{2,3} ² p=0,0000 ³ p=0,0000	427,886±27,375 ³ ³ p=0,0000	98,077±3,501	6,42±0,647 ² ² p=0,0000	0,527±0,020 ^{2,3} ² p=0,0000 ³ p=0,0000
3 нед (3 weeks)	0,009±0,0009 ² ² p=0,0000	77,326±4,774 ^{2,3} ² p=0,0000 ³ p=0,0000	89,653±10,933	2,513±0,491 ^{2,3} ² p=0,0000 ³ p=0,0004	0,356±0,022 ^{2,3} ² p=0,0017 ³ p=0,0000

Примечание. Статистически значимые различия 1 – по отношению к уровню в интактной группе; 2 – по отношению к уровню в группе ХНБ (контроль); 3 – по отношению к уровню на предыдущем сроке исследования.

Note. Statistically significant differences: 1 – compared to the intact group; 2 – compared to the CNP group (control); 3 compared to the previous study period.

Содержание AIF и каспазы 9 было ниже контрольных величин в 6,6 раза и 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно, а также ниже значений предыдущего срока в 5,5 раза и 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно. Ни в один из изученных сроков исследования не отмечено изменений в содержании Bcl-2.

Таким образом, было определено, что начало (1 нед) изолированного роста меланомы характеризуется нарастанием уровня AIF, цитохрома С и снижением уровня каспазы 9 в митохондриях клеток печени, к 3-й нед роста меланомы фиксировали падение уровней кальция, AIF и цитохрома С, при этом уровень каспазы 9 имел в динамике противоположную направленность и к 3-й нед отмечался рост уровня каспазы 9. Рост опухоли в условиях коморбидной патологии (ХНБ) на начальном этапе (1 нед) сопровождался падением AIF и цитохрома С в митохондриях клеток печени. На терминальном этапе (3 нед) роста меланомы на фоне ХНБ фиксировали снижение уровня AIF, цитохрома С и кальция, которое начиналось уже на 2-й нед. Уровень каспазы 9 при росте опухоли в условиях ХНБ повысился через 2 нед и оставался таковым до конца 3-й нед.

Обсуждение

Основное различие между опухолевыми и нормальными клетками заключается в метаболическом перепрограммировании опухолевых клеток, при этом митохондрии опухоли играют решающую роль в этом процессе. Накапливающиеся данные указывают на то, что митохондрии опухоли по мере развития изменяют свою структуру и функцию, а аномальные митохондрии впоследствии ускоряют прогрессирование опухоли, что вызвано снижением способности окислительного фосфорилирования и индукции апоптоза [12, 13]. Однако внутренняя причина изменения митохондриальной функции все еще неясна. Наряду со способностью контролировать энергетический метаболизм клеток митохондрии принимают участие во многих других физиологических процессах, таких как апоптоз, аутофагия, редокс-сигнализация и перепрограммирование стволовых клеток [14-17]. Все эти явления зависят от количества ионов кальция, содержащихся в органеллах [18, 19].

Как основная буферная система большой емкости для ионов кальция, митохондрии участвуют в регуляции его внутриклеточного гомеостаза [20]. Изменения уровня кальция в митохондриях модулирует ключевые клеточные процессы, начиная от аэробного метаболизма (через чувствительные к кальцию дегидрогеназы и ферменты цикла Кребса) до высвобождения про-

апоптотических факторов, а также локальную модуляцию активности каналов и ферментов [21-23].

В настоящем исследовании показано снижение уровня кальция в митохондриях печени как при развитии ХНБ, так и по мере роста меланомы в самостоятельном варианте и на фоне ХНБ. Вероятно, это связано с изменением соотношения унипортеров переноса кальция (MCU), так как именно соотношение между Ca^{2+} -чувствительными регуляторами (MICU1) и поровой единицей MCU рассматривают как физиологический регулятор митохондриального захвата кальция в тканях, что способствует тканеспецифическому колебанию уровня кальция в направлении дифференциальной регуляции окислительного метаболизма в печени [24].

Семейство белков Bcl-2 строго регулирует внутренний путь апоптоза. Эти белки контролируют высвобождение из митохондрий специфических факторов активации каспаз. Некоторые из белков семейства Bcl-2 могут действовать как агонисты клеточной смерти, а такие как Bcl-2 и Bcl-xL могут действовать как антагонисты гибели клеток [25-27]. Внутренний путь апоптоза активируется множеством внутриклеточных сигналов, включая повреждение ДНК из-за онкогенного стресса [28]. Этот путь связан с нарушением потенциала внешней мембраны митохондрий и приводит к активации каспазы 9. Платформа, активирующая каспазу 9, содержит AIF и цитохром С. Внутриклеточные сигналы помогают в образовании пор во внешней митохондриальной мембране, что нарушает потенциал митохондриальной мембраны и вызывает высвобождение цитохрома С из внутренней мембраны митохондрий. Высвободившийся цитохром С образует комплекс с APAF1 и приводит к активации каспазы 9. Инициация каспазы 9, в свою очередь, активирует другие каспазы-эффекторы, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [29].

Поскольку в настоящем исследовании уровень Bcl-2 не претерпевал изменений ни в случае действия ХНБ, ни в динамике стандартного или индуцированного роста меланомы, по-видимому, нельзя говорить о влиянии исследуемых факторов на апоптоз, тем более что практически у всех из них имеются и другие функции.

Вместе с тем, в настоящем исследовании обнаружены низкие значения уровня AIF и цитохрома С в митохондриях клеток печени при опухолевом процессе, сопряженном с коморбидной патологией – ХНБ, что по всей видимости приводит к подавлению активности комплексов I и IV дыхательной цепи митохондрий.

Цитохром С представляет собой небольшой глобулярный ядерно-кодируемый белок с ковалентно

присоединенной гемовой группой. Он расположен в митохондриальном межмембранном пространстве (IMS) в качестве мобильного одноэлектронного переносчика между комплексами III (комплекс Bc1) и IV (цитохром С оксидаза, СОХ) электронно-транспортной цепи – ЕТС [30]. АIF играет биоэнергетическую роль, регулируя главным образом активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий [31]. Было обнаружено, что в клетках человека или мыши подавление АIF приводит к серьезному снижению активности комплекса I дыхательной цепи. Дальнейшие исследования показали, что без АIF происходит снижение активности комплекса I дыхательной цепи, т.е. АIF необходим для нормального процесса окислительного фосфорилирования [32].

Печень является органом детоксикации, кровотока, продуцентом факторов роста, местом метаболизации гормонов, центром синтеза белков. Функция печени регулируется как во времени, так и в пространстве: циркадные ритмы и потребление пищи, вместе с высоко структурно и функционально организованной архитектурой печени, разделение функций между типами клеток печени и половой диморфизм – все это вносит свой вклад в физиологию печени [33]. Поэтому полагаем, что через системы биологических путей или молекул происходит взаимодействие опухоли с печенью, что отражается на функционировании субклеточных структур печени и это можно отнести к патогенетическим характеристикам развития злокачественного процесса. С другой стороны, А. Fu и соавт. [2] установили, что здоровые митохондрии печени изменяют патогенез меланомы у мышей. Авторы исследовали влияние «нормальных» митохондрий печени, введенных внутривенно, на аномальный метаболизм опухоли у мышей с метастазами меланомы в легких. Результаты показали, что митохондрии здоровой печени значительно замедляли рост опухоли и увеличивали продолжительность жизни животных. Противоопухолевый эффект митохондрий был связан с изменением нарушенного метаболизма опухолевых клеток, таким как снижение гликолиза и образование «окислительной» внутриклеточной среды, а также с усилением апоптоза, некроза и митофагией клеток опухоли.

Заключение

Согласно полученным данным, по изменению изучаемых показателей (Bc1-2, АIF, цитохром С, каспаза 9, кальций) в митохондриях клеток печени при самостоятельном и сопряженном с коморбидной патологией (ХНБ) ростом меланомы полагаем, что в митохондриях печени показатели, относящиеся

к факторам апоптоза выполняют несколько иные функции, которыми данные факторы обладают помимо осуществления программы апоптоза. Эти функции связаны с прямым или опосредованным участием в функционировании электронно-транспортной цепи митохондрий. В данном эксперименте было обнаружено, что у митохондрий клеток печени заблокирована способность поглощать кальций из цитозоля. Блокировка поглощения кальция в случае стандартного роста меланомы возникает на терминальном этапе (3-я нед) развития меланомы, а при росте меланомы на фоне коморбидной патологии неспособность митохондрий поглощать кальций возникает на 1 нед раньше – на этапе логарифмического роста опухоли (2-я нед). Снижение не только уровня кальция, но и АIF, и цитохрома С может свидетельствовать о нарушении в функционировании электронно-транспортной цепи митохондрий клеток печени, которое возникает в случае стандартного роста меланомы на терминальном этапе, а при сочетании коморбидной патологии и опухолевого процесса на более раннем сроке развития опухоли, начиная с 1-й нед. Накопление каспазы 9 и стабильный уровень Bc1-2 в митохондриях печени при всех исследуемых патологических процессах, по всей видимости, свидетельствует об отсутствии активации апоптоза вследствие закрытого состояния пор во внешней митохондриальной мембране. В результате эксперимента было выявлено, что наличие коморбидной патологии при опухолевом процессе способствует более раннему возникновению нарушений в электронно-транспортной цепи митохондрий клеток печени.

Литература

(п.п. 1-7; 12-32 см. References)

- Франциянц Е.М., Сидоренко Ю.С., Розенко Л.Я. *Перекисное окисление липидов в патогенезе опухолевой болезни*. Ростов-на-Дону; 1995.
- Егорова М.В., Афанасьев С.А. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: Современные методические приемы. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26(1-1): 22-8.
- Розенко Д.А., Шихлярова А.И., Попова Н.Н., Вереникина Е.В., Меньшенина А.П., Арджа А.Ю. и др. Оценка эффективности купирования послеоперационной боли и нормализация адаптационного статуса у пациенток с онкопатологией репродуктивной системы. *Южно-Российский онкологический журнал*. 2021; 2(1): 14-25. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-1-2>
- Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трешитки Л.К., Бандовкина В.А. и др. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы в16/f10 у самок мышей. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки*. 2019; 1(201): 106-11.

References

- Léveillé M., Estall J.L. Mitochondrial Dysfunction in the Transition from NASH to HCC. *Metabolites*. 2019; 9(10): 233. <https://doi.org/10.3390/metabo9100233>
- Fu A., Hou Y., Yu Z., Zhao Z., Liu Z. Healthy mitochondria inhibit the metastatic melanoma in lungs. *International journal of biological sciences*. 2019; 15(12): 2707–18. <https://doi.org/10.7150/ijbs.38104>
- Shi X., Zhao M., Fu C., Fu A. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 2017; 34: 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.02.005>
- Robicsek O., Ene H.M., Karry R., et al. Isolated mitochondria transfer improves neuronal differentiation of schizophrenia-derived induced pluripotent stem cells and rescues deficits in a rat model of the disorder. *Schizophrenia Bull.* 2018; 44: 432–42. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx077>
- Friedman J.R., Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014; 505: 335–43. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- Vekshin N., Kovalev V., Chaplygina A. Germinal proto-mitochondria from rat liver. *Biochemistry and biophysics reports*. 2019; 20: 100710. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100710>
- Degli Esposti D., Hamelin J., Bosselut N., Saffroy R., Sebah M., Pommier A., et al. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. *Biochem. Res. Int.* 2012; 2012: 387626. <https://doi.org/10.1155/2012/387626>
- Frantsyants E.M., Sidorenko Yu.S., Rosenko L.Ya. *Lipid peroxidation in the pathogenesis of tumor disease. [Perekisnoe okislenie lipidov v patogeneze opukholevoy bolezni]*. Rostov-on-Don; 1995. (in Russian)
- Egorova M.V., Afanasyev S.A. Isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and human: modern methodical approaches. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 26(1-1): 22-8. (in Russian)
- Rozenko D.A., Shikhlyarova A.I., Popova N.N., Verenikina E.V., Menshenina A.P., Ardzha A.Yu., et al. Efficiency mark postoperative pain management and normalization of adaptation status in patients with reproductive system oncopathology. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal*. 2021; 2(1): 14-25. (in Russian). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-1-2>
- Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., et al. *Influence of chronic neuropathic pain on the course of malignant 16/f10 melanoma in male mice. Byulletin of higher educational institutions. North Caucasus region. Natural sciences. [Severo-Kavkazskiy region. Seriya: Estestvennye nauki]*. 2019; 1(201): 106-11. (in Russian)
- Jan C.I., Tsai M.H., Chiu C.F., et al. Fenofibrate suppresses oral tumorigenesis via reprogramming metabolic processes: potential drug repurposing for oral cancer. *Int J Biol Sci*. 2016; 12: 786–98. <https://doi.org/10.7150/ijbs.13851>
- Ullmann P., Nurmik M., Begaj R., et al. Hypoxia- and microRNA-induced metabolic reprogramming of tumor-initiating cells. *Cells*. 2019; 8: E528. <https://doi.org/10.3390/cells8060528>
- Nikoletopoulou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Cross-talk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833: 3448-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
- Kamer K.J., Mootha V.K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat. Rev. Mol Cell Biol*. 2015; 16: 545-53. <https://doi.org/10.1038/nrm4039>
- Rambold A.S., Pearce E.L. Mitochondrial dynamics at the interface of immune cell metabolism and function. *Trends Immunol*. 2018; 39: 6-18. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.006>
- Tilokani L., Nagashima S., Paupe V., Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018; 62: 341-60. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Rizzuto R. De Stefan, D.i, Raffaello A., Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2012; 13: 566-78. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Pallafacchina G., Zanin S., Rizzuto R. Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake. *F1000Res. Faculty Rev-1858. eCollection*. 2018. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15723.1>
- Belosludtsev K.N., Dubinin M.V., Belosludtseva N.V., Mironova G.D. Mitochondrial Ca²⁺ transport: Mechanisms, molecular structures, and role in cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2019; 84: 593–607. <https://doi.org/10.1134/S0006297919060026>
- Gilbert J.A., Parekh A.B. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca²⁺ current I (CRAC). *EMBO J*. 2000; 19: 6401–7. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6401>
- Giorgi C., Marchi S., Pinton P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat. Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19: 713–30. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
- Belosludtsev N.K., V Dubinin M., Yu Talanov E., S Starinets, V., S Tenkov K., M Zakharova, N., et al. Transport of Ca²⁺ and Ca²⁺-Dependent Permeability Transition in the Liver and Heart Mitochondria of Rats with Different Tolerance to Acute Hypoxia. *Biomolecules*. 2020; 10(1): 114. <https://doi.org/10.3390/biom10010114>
- Paillard M., Csordás G., Szanda G., Golenár T., Debattisti V., Bartok A., et al. Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca²⁺ Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell reports*. 2017; 18(10): 2291–300. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.032>
- Dai H., Meng X.W., Kaufmann S.H. Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics. *F1000Res*. 2016; 5: 2804. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9629.1>
- Sarosiek K.A., Letai A. Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics - recent successes, current challenges and future promise. *FEBS J*. 2016; 283: 3523–33. <https://doi.org/10.1111/febs.13714>
- Strasser A., Vaux D.L. Viewing BCL2 and cell death control from an evolutionary perspective. *Cell Death Differ*. 2018; 25: 13–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.145>
- Mehrbod P., Ande S.R., Alizadeh J., Rahimizadeh S., Shariati A., Malek H., et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence*. 2019; 10(1): 376–413. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1605803>
- Sochalska M., Tuzlak S., Egle A., et al. Lessons from gain- and loss-of-function models of pro-survival Bcl2 family proteins: implications for targeted therapy. *FEBS J*. 2015; 282: 834–49. <https://doi.org/10.1111/febs.13188>
- Wan J., Kalpage H. A., Vaishnav A., Liu J., Lee I., Mahapatra G., et al. Regulation of Respiration and Apoptosis by Cytochrome c Threonine 58 Phosphorylation. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 15815. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105704>
- Hangen E., Féraud O., Lachkar S., Mou H., Doti N., Fimia G.M., et al. Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Mol. Cell*. 2015; 58: 1001–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.020>

32. Bano D., Prehn J. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*. 2018; 30: 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016>
33. Berthier A., Johanns M., Zummo F.P., Lefebvre P., Staels B. PPARs in liver physiology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021; 1867(5): 166097. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166097>

Сведения об авторах:

Франциянц Елена Михайловна, доктор биол. наук, проф., заместитель генерального директора по науке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: super.gormon@ya.ru, РИНЦ SPIN-код: 9427-9928;

Нескубина Ирина Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: neskubina.irina@mail.ru, РИНЦ SPIN-код: 3581-8531;

Сурикова Екатерина Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: sunsur2000@mail.ru, РИНЦ SPIN-код: 2401-4115;

Шихлярова Алла Ивановна, доктор биол. наук, проф., ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail shikhliarova.a@mail.ru, РИНЦ SPIN-код: 6271-0717;

Бандовкина Валерия Ахтямовна, ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, канд. биол. наук, e-mail: valerryana@yandex.ru;

Каплиева Ирина Викторовна, доктор мед. наук, зав. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: kaplirina@yandex.ru, РИНЦ SPIN-код: 5047-1541;

Немашкалова Людмила Анатольевна, науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: tilde09@rambler.ru, РИНЦ SPIN-код: 1355-8652;

Трепятаки Лидия Константиновна, мл. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: legolab69@yandex.ru, РИНЦ SPIN-код: 2052-1248;

Шейко Елена Александровна, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: esheiko@inbox.ru;

Качесова Полина Сергеевна, науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: vnp.kachesova@gmail.com;

Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: scalolas.92@yandex.ru