



## СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ФАКТОРОВ АПОПТОЗА В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК КОЖИ И ОПУХОЛИ ПРИ СТАНДАРТНОМ И СТИМУЛИРОВАННОМ РОСТЕ МЕЛАНОМЫ В16/F10 У САМОК МЫШЕЙ C57BL/6

Е.М.Франциянц, И.В.Нескубина, Е.И.Сурикова\*, А.И.Шихлярова, И.В.Каплиева, Л.А.Немашкалова, Л.К.Трепитаки

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,  
344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

### Резюме

**Цель исследования.** Изучить динамику факторов апоптоза в митохондриях клеток кожи и опухоли самок мышей при стимуляции роста меланомы хронической нейрогенной болью (ХНБ).

**Материалы и методы.** Работа выполнена на самках мышей C57BL/6 ( $n=56$ ), которым воспроизводили модель ХНБ двусторонним лигированием седалищных нервов и перевивали меланому В16/F10. Через 1–3 нед. роста опухоли в митохондриях клеток опухоли и кожи, не затронутой опухолевым ростом, методом ИФА определяли концентрацию цитохрома С, каспазы-9 (Bioscience, Austria), Bcl-2 (Thermo Fisher Scientific, Austria), AIF (RayBiotech, USA); кальция ( $Ca^{2+}$ ) – методом с арсеназо III (Абрист, Россия).

**Результаты.** В состоянии ХНБ в митохондриях клеток кожи значительно возросло содержание  $Ca^{2+}$  – в 96,7 раза, AIF – в 1,4 раза и Bcl-2 – в 5,9 раза, а содержание каспазы-9 снижалось в 2,6 раза по сравнению с уровнем у интактных мышей. При стимулированном болью росте меланомы в митохондриях клеток кожи, не затронутой опухолевым ростом, наблюдалось снижение уровня всех показателей, кроме каспазы-9, – ее содержание возросло в 4,6 раза через 3 нед. роста опухоли. В митохондриях клеток опухоли в течение 1–3 нед. наблюдения снижался уровень  $Ca^{2+}$  соответственно в 37,2–96,1 раза, AIF – в 49,4–2,0 раза, Bcl-2 – в 3,0–1,5 раза, цитохрома С – в 15,3–8,8 раза и увеличивался уровень каспазы-9 в 1,7–4,4 раза по сравнению с уровнем у животных с болью.

**Заключение.** В целом при росте меланомы, стимулированном хронической болью, в митохондриях клеток кожи и опухоли наблюдалась противоположная динамика уровня факторов апоптоза, чем при обычном росте меланомы, исключение – цитохром С. Митохондрии клеток меланомы и неизменной кожи имеют схожую направленность изменения уровня факторов апоптоза, что, возможно, свидетельствует об их функционировании в условиях митохондриальной сети на уровне одного органа. При этом митохондрии клеток опухоли обеспечивают антиапоптотическое состояние самой опухоли и незатронутой злокачественным процессом кожи, вероятно, обусловленное стрессорным состоянием кожи.

### Ключевые слова:

меланома В16/F10, хроническая нейрогенная боль, мышцы, митохондрии, кожа, опухоль, регуляторы апоптоза, кальций, цитохром С, AIF, Bcl-2, каспаза 9.

### Для цитирования

Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Каплиева И.В., Немашкалова Л.А., Трепитаки Л.К. Состояние системы факторов апоптоза в митохондриях клеток кожи и опухоли при стандартном и стимулированном росте меланомы В16/F10 у самок мышей C57BL/6. Исследования и практика в медицине. 2021; 8(1): 8–19. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2021-8-1-1>

### Для корреспонденции

Сурикова Екатерина Игоревна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, д. 63

E-mail: sunsur2000@mail.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

SPIN: 2401-4115, AuthorID: 301537

**Информация о финансировании.** Финансирование данной работы не проводилось.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Получено 18.02.2020, Рецензия (1) 31.03.2020, Рецензия (2) 14.04.2020, Принята к печати 10.03.2021

## THE STATE OF APOPTOSIS FACTOR SYSTEM IN MITOCHONDRIA OF SKIN AND TUMOR CELLS IN STANDARD AND STIMULATED GROWTH OF B16/F10 MELANOMA IN FEMALE C57BL/6 MICE

E.M.Frantsiyants, I.V.Neskubina, E.I.Surikova\*, A.I.Shikhlyarova, I.V.Kaplieva, L.A.Nemashkalova, L.K.Trepitaki

National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia,  
63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

### Abstract

**Purpose of the study.** Studying the dynamics of factors of apoptosis in mitochondria of skin and tumors cells in female mice with melanoma growth stimulated by chronic neurogenic pain.

**Material and methods.** The study included female C57BL/6 mice ( $n=56$ ) with a model of chronic neurogenic pain (CNP) produced by the bilateral sciatic nerve ligation and with transplanted B16/F10 melanoma. After 1–3 weeks of the tumor growth, levels of cytochrome C, caspase-9 (Bioscience, Austria), Bcl-2 (Thermo Fisher Scientific, Austria), and AIF (RayBiotech, USA) were determined by ELISA, and levels of calcium ( $Ca^{2+}$ ) were determined by the Arsenazo III method (Abris+, Russia) in mitochondria of tumors cells and skin not affected by the tumor growth.

**Results.** In the CNP state, mitochondria of the skin cells showed a significant increase in  $Ca^{2+}$  by 96.7 times, AIF by 1.4 times and Bcl-2 by 5.9 times, while caspase-9 decreased by 2.6 times, compared to the levels in intact mice. In the CNP-stimulated melanoma growth, mitochondria of cells of the skin not affected by the tumor growth demonstrated a decrease in all studied indices, except caspase-9 – its levels increased by 4.6 times after 3 weeks of the tumor growth. In mitochondria of the tumor cells within 1–3 weeks, levels of  $Ca^{2+}$  decreased over time by 37.2–96.1 times, respectively, AIF by 49.4–2.0 times, Bcl-2 by 3.0–1.5 times, cytochrome C by 15.3–8.8 times, and caspase-9 increased by 1.7–4.4 times compared with the level in animals with pain.

**Conclusions.** In general, the growth of melanoma stimulated by chronic pain and the standard melanoma growth were characterized by the opposite dynamics of levels of apoptosis factor both in mitochondria of skin cells and in mitochondria of tumor cells, with the exception of cytochrome C. Mitochondria of melanoma cells and of the unchanged skin have a similar tendency to change the levels of apoptosis factors, which may indicate their functioning in the conditions of the mitochondrial network at the level of one organ. Mitochondria of tumor cells provide the anti-apoptotic state of the tumor itself and of the skin not affected by the malignant process, probably due to the stress state of the skin.

### Keywords:

B16/F10 melanoma, chronic neurogenic pain, mice, mitochondria, skin, tumor, apoptosis regulators, calcium, cytochrome C, AIF, Bcl-2, caspase 9.

### For citation

Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Shikhlyarova A.I., Kaplieva I.V., Nemashkalova L.A., Trepitaki L.K. The state of apoptosis factor system in mitochondria of skin and tumor cells in standard and stimulated growth of B16/F10 melanoma in female C57BL/6 mice. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2021; 8(1): 8-19. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2021-8-1-1>

### For correspondence

Ekaterina I. Surikova – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher of the laboratory for the study of pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: [sunsur2000@mail.ru](mailto:sunsur2000@mail.ru)

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

SPIN: 2401-4115, AuthorID: 301537

**Information about funding.** No funding of this work has been held.

**Conflict of interest.** Authors report no conflict of interest.

Received 18.02.2020, Review (1) 31.03.2020, Review (2) 14.04.2020, Accepted 10.03.2021

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Многочисленные функции митохондрий определяют их ключевую роль в клеточной жизни эукариот – продукция аденозинтрифосфата (АТФ), участие в синтезе гема, метаболизме аминокислот, регуляции окислительно-восстановительного состояния клеток [1]. Кроме того, митохондрии играют центральную роль в процессе индукции апоптоза – генетически контролируемой формы гибели клеток, тесно связанной с развитием злокачественных опухолей. Они содержат цитохром С, эндонуклеазу G и апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), активирующие апоптоз [2]. Высвобождение цитохрома С в цитозоль приводит к его ассоциации с активирующим апоптоз фактором 1 (APAF-1) и каспазой-9, в конечном итоге образуя апоптосому, которая активирует каспазу-3 и запускает апоптоз [3]. Напротив, апоптоз, вызванный AIF, не зависит от каспазы и действует через конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК [4]. Важнейшим функциональным индикатором активации процесса является снижение трансмембранного потенциала, выход цитохрома С и  $Ca^{2+}$  – эти эндогенные сигналы детерминируют дальнейший алгоритм реализации программы апоптоза [5]. Различия между митохондриями в злокачественных и незлокачественных клетках определяются способностью осуществлять высвобождение проапоптотических факторов для индукции апоптоза избирательно в раковых клетках [2].

Существует представление о том, что в основе развития ряда заболеваний, в том числе онкологии, и развития нейропатической боли, наряду с воспалением, лежит митохондриальная дисфункция [6, 7]. Травматическое повреждение периферического нерва приводит к формированию постоянной митохондриальной биоэнергетической дисфункции, способствующей усилению генерации активных форм кислорода и дисбалансу  $Ca^{2+}$ -механизмов [6]. Окислительный стресс и дисфункция митохондрий согласуются с гипотезой этиопатогенеза хронической нейрогенной боли (ХНБ): Favero G. et al. (2019) оценили патофизиологическую корреляцию между этими факторами, изучая некоторые белки, участвующие в митохондриальном гомеостазе [8].

Ранее нами было показано, что у самок мышей развитие перевивной меланомы B16/F10 на фоне хронической нейропатической боли характеризовалось усилением агрессивности опухоли: более ранний выход опухоли, ее двухфокусный рост, более раннее 100% метастазирование, кроме типичных мест (в печень, селезенку, легкие), еще и в нетипичные (сердце, матку), сокращение сроков жизни животных (средняя продолжительность жизни в основной

группе составила  $19,17 \pm 1,35$  дня, в группе сравнения первая смерть наступила на 24-е сутки, а средняя продолжительность жизни составила  $30,25 \pm 1,67$  дня) [9]. При формировании опухоли митохондриальная дисфункция приводит к активации проонкогенных сигнальных путей, регулирующих ангиогенез, метастазирование, выживание опухолевых клеток, приводя к прогрессированию опухоли. Помимо этого, митохондриальная дисфункция приводит к изменению регуляции белков, связанных с апоптозом, что может быть значимым показателем прогрессирования опухоли [10].

**Цель исследования:** изучить динамику факторов апоптоза в митохондриях клеток кожи и опухоли самок мышей линии C57BL/6 при самостоятельном росте меланомы B16/F10 и при действии стимулирующего фактора – ХНБ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 ( $n=56$ ) 8-недельного возраста с начальной массой 21–22 г. Животные были получены из ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (филиал «Андреевка», Московская область). В работе использовали штамм мышинной меланомы B16/F10, полученный из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России. Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Экспериментальное исследование проводили 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». Протокол исследования был одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (протокол № 2 от 31.05.2018).

Животные были распределены методом случайной выборки на следующие экспериментальные группы: интактная группа ( $n=7$ ), контрольная группа ( $n=7$ ) – воспроизведение модели ХНБ двусторонним лигированием седалищных нервов под ксила-золетилловым наркозом [9], группа сравнения ( $n=21$ ) – мыши стандартной подкожной перевивкой меланомы B16/F10, основная группа ( $n=21$ ) – мыши, которым воспроизводили модель ХНБ и через 3 нед. после этого перевивали меланому B16/F10. Материал для перевивки получали от мышей-доноров на 12–16-е сутки роста опухоли. Перевивка меланомы состояла в подкожном введении под правую лопатку 0,5 мл взвеси опухолевых клеток меланомы в физиологическом растворе в разведении 1:10. При стандартной перевивке опухоль появляется в 100% случаев,

быстро растет и на 12–16-е сутки роста метастазирует преимущественно гематогенно в легкие (60–90%), реже – в печень и селезенку. Все манипуляции с животными производили в боксе. Инструменты, посуду, руки дезинфицировали общепринятым способом.

Декапитацию животных производили на гильотине, в основной и в группе сравнения в сроки: 1-я неделя – 7-й день роста меланомы, 2-я неделя – 14-й день роста меланомы и 3-я неделя – 21-й день роста меланомы. После декапитации у животных на льду быстро иссекали кожу и опухоль, митохондрии выделяли по методу Егоровой М.В., Афанасьева С.А. [11]. Кожу, не затронутую злокачественным ростом, брали со стороны, противоположной опухолевому очагу. Полученные митохондриальные образцы до анализа хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Перед проведением анализа образцы разводили до концентрации белка 6 г/л [11]. Методом ИФА определяли концентрации: цитохрома С, каспазы-9 (Bioscience, Austria), Bcl-2 (Thermo Fisher Scientific, Austria), AIF (RayBiotech, USA); концентрацию кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) определяли методом с арсеназо III (Абрис+, Россия), белка – биуретовым методом («Ольвекс Диагностикум», Россия).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6. Сравнение количественных данных в четырех группах (независимые выборки) проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса (множественные сравнения), апостериорные парные сравнения – критерия Манна–Уитни (с учетом критического уровня значимости  $p=0,0085$ ). Данные таблиц представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения содержания факторов апоптоза в митохондриях клеток кожи, не затронутой злокачественным процессом, в динамике самостоятельного роста меланомы у мышей представлены в таблице 1. Прежде всего, представляло интерес изучить показатели апоптоза в митохондриях не затронутой злокачественным процессом кожи после перевивки меланомы. Найдено, что через 1 нед. после перевивки опухоли в митохондриях клеток кожи был повышен уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в 83,7 раза и Bcl-2 – в 8,9 раза. При этом уровень каспазы-9 и цитохрома С не изменялся.

Через 2 нед. после перевивки в митохондриях кожи, не затронутой злокачественным процессом, уровень  $\text{Ca}^{2+}$  снизился относительно предыдущего срока исследования в 1,9 раза, но оставался в 45,2 раза выше, чем в митохондриях интактной кожи. Уровень AIF в этот срок снизился относительно показателя на 1-й неделе в 3,8 раза и стал в 2,3 раза ниже

показателя в митохондриях интактной кожи. Содержание Bcl-2 снизилось относительно предыдущего срока исследования в 3,2 раза, но оставалось в 2,8 раза выше показателя в митохондриях интактной кожи. В этот срок не обнаружено изменения уровня цитохрома С, при этом каспаза-9 снизилась как по сравнению со значениями на 1-й неделе опухолевого роста в 1,6 раза, так и относительно значения в интактной коже в 1,7 раза.

Через 3 недели после перевивки меланомы в митохондриях клеток кожи, не затронутой злокачественным процессом, отмечено дальнейшее снижение содержания  $\text{Ca}^{2+}$ , AIF, Bcl-2, а также цитохрома С. В этот срок уровень кальция не имел статистически значимых отличий от значений в митохондриях интактной кожи. Уровень AIF снизился относительно показателей на предыдущих сроках исследования в 8,3 раза и 2,2 раза ( $p=0,0088$ ) и стал в 5,1 раза ниже, чем показатель в интактной коже. Уровень Bcl-2 прогрессивно снижался и стал в 36,6 раза и 11,4 раза ниже относительно показателей на 1-й и 2-й неделях опухолевого роста соответственно, при этом его значение было в 4,1 раза ниже значения в митохондриях клеток интактной кожи. В этот срок исследования найдено снижение уровня цитохрома С относительно предыдущих сроков и показателя в митохондриях клеток интактной кожи в среднем в 1,8 раза.

Далее мы изучили влияние ХНБ на содержание факторов апоптоза в митохондриях клеток кожи животных с ХНБ без злокачественного процесса в организме (контрольная группа). Установлено повышение уровня трех изученных показателей:  $\text{Ca}^{2+}$  – в 96,7 раза, AIF – в 1,4 раза и Bcl-2 – в 5,9 раза. При этом уровень каспазы-9 был снижен в 2,6 раза, а уровень цитохрома С не изменялся (см. табл. 1).

В митохондриях клеток кожи мышей основной группы (ХНБ + рост меланомы) динамика уровня некоторых факторов апоптоза отличалась от динамики показателей в аналогичных образцах митондрий клеток кожи в группе сравнения (только рост меланомы) (см. табл. 1). Так, уровень  $\text{Ca}^{2+}$  через 1 нед. после перевивки был снижен относительно показателя у контрольных животных с ХНБ в 5,6 раза, а относительно показателя у животных при самостоятельном росте меланомы – в 4,8 раза ( $p=0,0017$ ). В дальнейшем через 2 и 3 нед. после перевивки уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях клеток кожи мышей основной группы снижался до значений в коже интактных животных. В группе сравнения это происходило только через 3 нед. Уровень AIF в митохондриях мышей основной группы снижался через 1 нед. в 3,7 раза относительно показателя в контрольной группе и был ниже, чем в группе сравнения в 4,1 раза ( $p=0,0018$ ). Через 2 нед. после перевивки опухоли уровень AIF в митохондриях

клеток кожи поднимался до значений в контрольной группе и был выше, чем в группе сравнения в 3,4 раза ( $p=0,0017$ ). Через 3 нед. этот показатель снижался до уровня на 1-й неделе, оставаясь, однако, выше, чем в группе сравнения в 2,2 раза ( $p=0,0088$ ). Уровень Vcl-2 в митохондриях клеток кожи мышей основной группы прогрессивно снижался относительно показателей в контроле в 1,7 раза и 2,2 раза соответственно через 2 и 3 нед. после перевивки, в отличие от группы сравнения, где снижение Vcl-2 относительно значений в митохондриях интактных мышей после его подъема отмечено только через 3 нед. Содержание цитохрома С в митохондриях клеток кожи снижалось через 3 нед. после перевивки опухоли в 1,9 раза. Через 1 нед. после перевивки содержание каспазы-9 в митохондриях клеток кожи поднялось относительно показателя в контрольной группе в 2,7 раза и было повышенным на протяжении всего срока исследования.

Далее мы изучили содержание факторов апоптоза в митохондриях клеток меланомы в динамике ее самостоятельного роста (табл. 2). Было установлено, что через 1 нед. после перевивки в митохондриях ткани опухоли уровень  $Ca^{2+}$  вырос относительно показателя в интактной коже в 57,5 раза и практически

не изменился через 2 и 3 нед, оставаясь на таком же высоком уровне. Содержание AIF через 1 нед. после перевивки было снижено в 6,5 раза, через 2 нед. оно продолжало снижаться, и достигло уровня в 1,3 раза ниже, чем на предыдущем сроке эксперимента. Через 3 нед. после перевивки уровень AIF увеличился в 1,8 раза и в 2,5 раза относительно значений на 1-й и 2-й неделях соответственно, но оставался в 3,5 раза ниже значения в интактной коже. Уровень Vcl-2 в митохондриях клеток опухоли после 1-й недели роста меланомы был выше значений в интактной коже в 4,3 раза, после 2-й недели находился на таком же высоком уровне и был в 5,1 раза выше уровня в интактной коже, а через 3 нед. и снизился практически в 2 раза, оставаясь, однако, выше значений в митохондриях интактной кожи в 2,5 раза. Уровень цитохрома С в митохондриях клеток опухоли прогрессивно снижался, начиная с 1-й недели после перевивки меланомы: через 1 нед. – в 2,5 раза относительно показателя в митохондриях клеток интактной кожи, через 2 и 3 нед. в среднем в 1,8 раза относительно уровня на 1-й неделе ( $p=0,0127$ ) и в 4,6 раза относительно значений в интактной коже. Уровень каспазы-9 в митохондриях меланомы через 1 нед. снизился в 2,7 раза, однако через 2 нед., отмечен подъем его уровня в 1,5 раза

**Таблица 1. Концентрация факторов апоптоза в митохондриях клеток кожи в динамике роста меланомы B16/F10 у самок мышей на фоне хронической нейрогенной боли**  
**Table 1. Concentration of apoptosis factors in the mitochondria of skin cells in the dynamics of B16/F10 melanoma growth in female mice against the background of chronic neurogenic pain**

| Группы животных /<br>Animal groups   | $Ca^{2+}$ ,<br>ммоль/г белка /<br>$Ca^{2+}$ ,<br>mmol/g protein | AIF,<br>нг/мг белка /<br>AIF,<br>ng/mg of protein | Vcl-2,<br>нг/мг белка /<br>Vcl-2,<br>ng/mg of protein | Цитохром С,<br>нг/мг белка /<br>Cytochrome C,<br>ng/mg protein | Каспаза 9,<br>нг/мг белка /<br>Caspase 9,<br>ng/mg of protein |
|--|---|---|---|--|---|
| Интактная / Intact   | 0,01±0,001  | 399,2±7,9   | 5,56±0,203  | 13,2±1,06  | 0,241±0,016   |
| Контрольная / Control  | 0,967±0,01 <sup>1</sup>   | 577,9±15,5 <sup>1</sup>                           | 32,69±1,37 <sup>1</sup>                               | 14,24±1,21   | 0,094±0,006 <sup>1</sup>                                      |
| Группа сравнения – рост меланомы B16/F10 / The comparison group-growth of melanoma B16/F10         |   |   |   |  |   |
| 1 неделя / the 1 <sup>st</sup> week  | 0,837±0,162 <sup>1</sup>  | 645,2±108,8                                       | 49,61±1,71 <sup>1</sup>                               | 14,61±1,38   | 0,264±0,011   |
| 2 неделя / the 2 <sup>nd</sup> week  | 0,453±0,113 <sup>1,3</sup>                                      | 171,4±25,2 <sup>1,3</sup>                         | 15,46±1,41 <sup>1,3</sup>                             | 13,61±1,34   | 0,148±0,007 <sup>1,3</sup>                                    |
| 3 неделя / the 3 <sup>rd</sup> week  | 0,010±0,001 <sup>3,4</sup>                                      | 78,08±12,7 <sup>1,4</sup>                         | 1,35±0,11 <sup>1,3,4</sup>                            | 7,68±0,66 <sup>1,3,4</sup>                                     | 0,242±0,016 <sup>3</sup>                                      |
| Основная группа – ХНБ + рост меланомы B16/F10 / The main group of CNP + growth of melanoma B16/F10 |   |   |   |  |   |
| 1 неделя / the 1 <sup>st</sup> week  | 0,173±0,034 <sup>2</sup>  | 157,6±27,1 <sup>2</sup>                           | 27,28±1,77  | 9,89±0,69  | 0,255±0,015 <sup>2</sup>                                      |
| 2 неделя / the 2 <sup>nd</sup> week  | 0,010±0,001 <sup>2,3</sup>                                      | 584,3±25,3 <sup>3</sup>                           | 19,08±1,38 <sup>2</sup>                               | 12,51±1,02   | 0,285±0,014 <sup>2</sup>                                      |
| 3 неделя / the 3 <sup>rd</sup> week  | 0,010±0,001 <sup>2,4</sup>                                      | 169,0±26,6 <sup>2,3</sup>                         | 14,92±1,38 <sup>2,4</sup>                             | 7,56±0,72 <sup>2,3</sup>                                       | 0,433±0,040 <sup>2,4</sup>                                    |

Примечание: статистически значимые различия ( $p<0,0085$ ): <sup>1</sup> – по отношению к уровню в интактной коже; <sup>2</sup> – по отношению к уровню в контроле; <sup>3</sup> – по отношению к уровню на предыдущем сроке исследования; <sup>4</sup> – по отношению к уровню на 1-й неделе.

Note: statistically significant differences ( $p<0,0085$ ): <sup>1</sup> – relative to the level in the intact skin; <sup>2</sup> – relative to the level in the control; <sup>3</sup> – relative to the level at the previous study period; <sup>4</sup> – relative to the level at 1 week.

( $p=0,0127$ ), который сохранялся и через 3 нед., однако был ниже значений в митохондриях интактной кожи в 1,7 раза.

Состояние ХНБ также внесло коррективы в содержание факторов апоптоза в митохондриях клеток опухоли основной группы, где найдены изменения, отличные от изменений в аналогичных образцах митохондрий клеток опухоли у мышей из группы сравнения (табл. 2). Так, уровень  $Ca^{2+}$  в митохондриях клеток опухоли основной группы уже через 1 нед. после перевивки снизился в 37,1 раза относительно показателя в контрольной группе и был в 22,1 раза ниже ( $p=0,0017$ ), чем в группе сравнения. Через 2 и 3 нед. уровень  $Ca^{2+}$  снизился и стал сопоставим со значениями в митохондриях клеток интактной кожи, тогда как в группе сравнения на протяжении всего срока исследования он оставался высоким. Изменение уровня AIF в митохондриях клеток опухоли в основной группе имело такую же направленность, как в группе сравнения: через 1 нед. показатель снижался относительно значений в контроле в 49,3 раза, через 2 нед. он был ниже в 16,6 раза, а через 3 нед. – только в 2 раза, поднявшись по сравнению с предыдущим сроком исследования в 8,4 раза. Реципрокно уровню кальция изменялось содержание Bcl-2 в митохондриях клеток

опухоли мышей основной группы: через 1 нед. ю этот показатель был ниже значений в контроле в 3 раза, через 2 и 3 нед. – в среднем в 1,5 раза. Уровень цитохрома С в митохондриях клеток опухоли изменялся аналогично показателю в группе сравнения, однако был существенно ниже. Так, через 1 нед. содержание цитохрома С было ниже показателя в контроле в 15,3 раза и ниже показателя в группе сравнения в 5,6 раза ( $p=0,0017$ ), через 2 и 3 нед. – ниже в среднем 9,5 раза относительно уровня в контроле и практически в 2 раза ниже ( $p=0,0017$ ) значения в группе сравнения. Динамика концентрации каспазы-9 в митохондриях клеток опухоли основной группы была другой, чем в группе сравнения. Отличия заключались в том, что в основной группе уровень каспазы-9 повышался относительно соответствующего контроля (кожа ХНБ), а в митохондриях группы сравнения, напротив, снижался (относительно интактной кожи). Так, через 1 нед. в митохондриях клеток опухоли основной группы ее уровень повышался относительно контрольных величин в 1,7 раза, через 2 нед. – в 7,1 раза, через 3 нед. – в 4,4 раза.

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что в митохондриях клеток кожи на начальном этапе опухолевого роста происходило значительное

**Таблица 2. Концентрация факторов апоптоза в митохондриях клеток опухоли в динамике роста меланомы B16/F10 у самок мышей на фоне хронической нейрогенной боли**  
**Table 2. Concentration of apoptosis factors in the mitochondria of tumor cells in the dynamics of B16/F10 melanoma growth in female mice against the background of chronic neurogenic pain**

| Группы животных /<br>Animal groups   | $Ca^{2+}$ ,<br>ммоль/г белка /<br>$Ca^{2+}$ ,<br>mmol/g protein | AIF,<br>нг/мг белка /<br>AIF,<br>ng/mg of protein | Bcl-2,<br>нг/мг белка /<br>Bcl-2,<br>ng/mg of protein | Цитохром С,<br>нг/мг белка /<br>Cytochrome C,<br>ng/mg protein | Каспаза 9,<br>нг/мг белка /<br>Caspase 9,<br>ng/mg of protein |
|--|---|---|---|--|---|
| Интактная (кожа) /<br>Intact (skin)  | 0,01±0,001  | 399,2±7,9   | 5,56±0,20   | 13,2±1,06  | 0,241±0,016   |
| Контрольная (кожа) /<br>Control (skin)   | 0,967±0,01 <sup>1</sup>   | 577,9±15,5 <sup>1</sup>                           | 32,69±1,37 <sup>1</sup>                               | 14,24±1,21   | 0,094±0,006 <sup>1</sup>                                      |
| Группа сравнения – рост меланомы B16/F10 / The comparison group – growth of melanoma B16/F10       |   |   |   |  |   |
| 1 неделя / the 1 <sup>st</sup> week  | 0,575±0,018 <sup>1</sup>  | 61,16±1,84 <sup>1</sup>                           | 24,22±1,51 <sup>1</sup>                               | 5,24±0,75 <sup>1</sup>   | 0,093±0,007 <sup>1</sup>                                      |
| 2 неделя / the 2 <sup>nd</sup> week  | 0,675±0,052 <sup>1</sup>  | 45,69±2,14 <sup>1,3</sup>                         | 28,58±1,95 <sup>1</sup>                               | 2,92±0,3 <sup>1</sup>  | 0,132±0,009 <sup>1</sup>                                      |
| 3 неделя / the 3 <sup>rd</sup> week  | 0,561±0,046 <sup>1</sup>  | 112,67±2,8 <sup>1,3,4</sup>                       | 13,88±1,36 <sup>1,3,4</sup>                           | 2,85±0,26 <sup>1</sup>   | 0,144±0,01 <sup>1,4</sup>                                     |
| Основная группа – ХНБ + рост меланомы B16/F10 / The main group of CNP + growth of melanoma B16/F10 |   |   |   |  |   |
| 1 неделя / the 1 <sup>st</sup> week  | 0,026±0,002 <sup>2</sup>  | 11,72±1,08 <sup>2</sup>                           | 11,02±1,18 <sup>2</sup>                               | 0,93±0,05 <sup>2</sup>   | 0,161±0,01 <sup>2</sup>                                       |
| 2 неделя / the 2 <sup>nd</sup> week  | 0,01±0,001 <sup>2,3</sup>                                       | 34,84±1,86 <sup>2,3</sup>                         | 20,83±1,42 <sup>2,3</sup>                             | 1,38±0,08 <sup>2,3</sup>                                       | 0,668±0,067 <sup>2,3</sup>                                    |
| 3 неделя / the 3 <sup>rd</sup> week  | 0,01±0,001 <sup>2,4</sup>                                       | 290,98±10,62 <sup>2,3,4</sup>                     | 21,65±1,68 <sup>2,4</sup>                             | 1,61±0,14 <sup>2,4</sup>                                       | 0,412±0,077 <sup>2,4</sup>                                    |

Примечание: статистически значимые различия ( $p<0,0085$ ): <sup>1</sup> – по отношению к уровню в интактной коже; <sup>2</sup> – по отношению к уровню в контроле (в коже ХНБ); <sup>3</sup> – по отношению к уровню на предыдущем сроке исследования; <sup>4</sup> – по отношению к уровню на 1-й неделе.

Note: statistically significant differences ( $p<0,0085$ ): <sup>1</sup> – relative to the level in the intact skin; <sup>2</sup> – relative to the level in the control (in the CNP skin);

<sup>3</sup> – relative to the level at the previous study period; <sup>4</sup> – relative to the level at 1 week.

увеличение содержания  $Ca^{2+}$  и Bcl-2 по сравнению с уровнем в интактной коже, а содержание цитохрома С и каспазы-9 не отличалось от него. На 3-й неделе роста опухоли содержание в митохондриях клеток кожи  $Ca^{2+}$  возвращалось к уровню в интактной коже, а содержание AIF, Bcl-2 и цитохрома С снижалось до уровня ниже интактного. Содержание каспазы-9 изменялось только на 2-й неделе роста меланомы. В митохондриях клеток опухоли на протяжении 3 нед. ее роста сохранялось более высокое, чем в интактной коже, содержание  $Ca^{2+}$  и Bcl-2 и более низкое – AIF, цитохрома С и каспазы-9. Однако содержание AIF и каспазы-9 на 3-й неделе роста опухоли было выше, чем на 1-й неделе.

В состоянии ХНБ в митохондриях клеток кожи самок мышей значительно возрастало содержание  $Ca^{2+}$ , AIF и Bcl-2, а содержание каспазы-9 снижалось по сравнению с уровнем в митохондриях клеток интактной кожи. При росте меланомы, стимулированном хронической болью, в митохондриях клеток кожи, не затронутой опухолевым ростом, наблюдалось снижение уровня всех изученных показателей, кроме каспазы-9 – ее содержание было выше, чем в митохондриях клеток кожи в состоянии ХНБ и еще возрастало через 3 нед. роста опухоли. В митохондриях клеток опухоли мы наблюдали снижение содержания  $Ca^{2+}$ , AIF, Bcl-2 и цитохрома С и увеличение каспазы-9. Таким образом, в целом при росте меланомы, стимулированном хронической болью, как в митохондриях клеток кожи, так и в митохондриях клеток опухоли наблюдалась динамика уровня изученных показателей, противоположная той, что была выявлена при обычном росте меланомы, за исключением динамики содержания цитохрома С.

Передача сигналов кальция имеет решающее значение для множества физиологических путей. Повышение концентрации кальция почти всегда свидетельствует о повышенном потреблении энергии в клетках. В соответствии с этим, кальциевые сигналы опосредуют ряд путей, которые в совокупности служат для поддержания баланса производства и расхода энергии. При патологических состояниях кальциевые сигналы могут спровоцировать повреждение митохондрий и гибель клеток, особенно в сочетании с истощением энергии и окислительным или нитрозативным стрессом [12]. Многие митохондриальные функции напрямую регулируются уровнем ионов  $Ca^{2+}$  внутри органелл. Контроль митохондриальной концентрации  $Ca^{2+}$  имеет первостепенное значение для клеточной физиологии: данные исследований свидетельствуют о том, что ее дисрегуляция имеет ключевое значение в создании патологических состояний. Приток  $Ca^{2+}$  в митохондрии необходим для активации митохондрий [13].

В нашем исследовании 2 нед. активного самостоятельного роста меланомы сопровождалась повышенным уровнем  $Ca^{2+}$  в митохондриях клеток не только опухоли, но и не поврежденной злокачественным процессом кожи. Через 3 нед. в митохондриях клеток опухоли поддерживался высокий уровень  $Ca^{2+}$ , а в митохондриях клеток кожи он снижался до уровня у интактных мышей. Однако наибольший интерес представляло повышение содержания кальция практически в 100 раз в митохондриях клеток кожи под влиянием хронической нейрогенной боли.

Результаты работы Umamoto T. et al. (2018) показывают, что регуляция клеточного цикла гемопоэтических стволовых клеток при стрессе зависит от пути  $Ca^{2+}$ -митохондрии [13]. Кроме того, путь  $Ca^{2+}$ -митохондрии сопровождается повышенным потенциалом поглощения глюкозы. Поскольку гликолиз связан с митохондриальным энергетическим метаболизмом, повышенный уровень гликолиза в стволовых клетках может также способствовать активации функций митохондрий для инициации деления клеток. Это исследование демонстрирует, что накопление  $Ca^{2+}$  в митохондриях предшествует делению гемопоэтических стволовых клеток при стрессе. Надлежащее подавление пути  $Ca^{2+}$ -митохондрии необходимо для самообновления гемопоэтических стволовых клеток [13].

Учитывая этот факт, можно предположить, что при самостоятельном росте меланомы в ней на протяжении всего срока исследования, а в коже, не затронутой злокачественным процессом, на протяжении 2 нед. происходит активная дифференцировка и деление стволовых клеток. Что касается роста меланомы на фоне ХНБ, то, вероятно, еще на этапе хронизации болевого воздействия произошла активная дифференцировка стволовых клеток в коже, и перевивка на этом фоне меланомы обусловила не только активный рост опухоли, но и ее обширное метастазирование. Поэтому уже в самой меланоме, растущей на фоне ХНБ, и в коже, не пораженной злокачественным процессом, снижение уровня  $Ca^{2+}$  в митохондриях обеспечивало самообновление стволовых клеток.

Прямым доказательством вклада митохондриальной дисрегуляции  $Ca^{2+}$  являются данные, показывающие, что фармакологическое вмешательство с агонистом митохондриального  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника, CGP-37157, замедляет рост клеток и повышает восприимчивость к апоптозу при злокачественной меланоме B16BL6 [14]. Клетки поддерживают динамический баланс основных внутриклеточных параметров, который постоянно нарушается внутренними и внешними факторами – «стрессорами». Ответ на стресс – это процесс, вызываемый стрессорами для восстановления гомеостаза [15]. Критическим аспек-

том всех молекулярных и физиологических систем реагирования на стресс является их потребность в энергии, обеспечиваемая митохондриями [16].

Очевидно, что полученные нами результаты можно трактовать с позиций стресса, связанного как с созданием в организме состояния ХНБ, так и с ростом меланомы в самостоятельном варианте и на фоне ХНБ.

В ходе развития опухоли раковые клетки сталкиваются с различными стрессовыми факторами микроокружения, включая гипоксию и недостаток питательных веществ [17]. Когда клетки ощущают внутриклеточные или внеклеточные стрессовые факторы, возникает активация внутреннего апоптотического пути [18]. Стрессорные стимулы запускают каскад передачи сигналов проапоптотическими членами семейства Bcl-2, чья экспрессия и активация в конечном итоге приводят к нарушению митохондриальной функции через проницаемость митохондриальной наружной мембраны [19]. Лучшее всего охарактеризованной функцией белков семейства Bcl-2 является контроль проницаемости наружной митохондриальной мембраны для высвобождения индуцирующих апоптоз факторов в цитозоль во время апоптоза. Тем не менее растущее количество доказательств выявило альтернативные «несмертельные» роли для многих белков, связанных с Bcl-2, в регуляции митохондриальной динамики, аутофагии, митохондриальной энергетики, а также кривизны мембран и активности каналов [20]. Известно, что повышенная экспрессия антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в раковых клетках необходима для подавления проапоптотического эффекта онкогенной трансформации и нестабильности генома [21].

В нашем исследовании при самостоятельном росте меланомы в митохондриях клеток опухоли и в митохондриях клеток кожи, не затронутой злокачественным процессом, динамика уровня Bcl-2 совпадала с динамикой уровня кальция. Этот факт можно рассматривать как контроль проницаемости наружной митохондриальной мембраны для регулирования уровня кальция и активации митохондрий в результате стресса, вызванного опухолевым ростом. Вместе с тем в митохондриях клеток опухоли, растущей на фоне хронической боли, была несколько иная динамика уровня Bcl-2, похожая на динамику уровня каспазы-9.

Также нами было установлено, что уровень Bcl-2 митохондрий на основных этапах самостоятельного роста меланомы и роста меланомы на фоне ХНБ находился в реципрокных взаимоотношениях с уровнем AIF в опухоли и частично в неизменной коже, хотя в митохондриях клеток кожи мышей только с хронической болью отмечено однонаправленное изменение уровня указанных факторов.

Апоптоз-индуцирующий фактор (AIF) – это митохондриальная оксидоредуктаза, которая участвует в программах гибели клеток [22]. Однако роль AIF как эволюционно консервативного «палача» была недостаточной для объяснения некоторых фенотипов, наблюдаемых у мышей с дефицитом этого фактора. Другой взгляд на функцию AIF пришел из характеристики модели мыши-мутанта Harlequin и того факта, что некоторые из фенотипов не могут быть просто согласованы как следствие абберрантных программ гибели клеток. Было установлено, что AIF имеет дополнительные функции, помимо установленного вклада в процессы гибели клеток. В подтверждение этой гипотезы была проведена серия исследований на моделях клеточных культур, указывающих на вспомогательную роль AIF в дыхании митохондрий, которая имеет ключевое значение для выживания клеток [23]. Авторы обнаружили, что клетки человека или мыши, лишенные AIF, демонстрируют высокую продукцию лактата и повышенную зависимость от образования гликолитического АТФ из-за существенного снижения активности комплекса I дыхательной цепи. Хотя сам AIF не является частью комплекса I, AIF-дефицитные клетки демонстрируют пониженное содержание комплекса I и его компонентов, что указывает на роль AIF в биогенезе и/или поддержании этого полипротеинового комплекса. Дальнейшие исследования в клетках и тканях без AIF показали, что первичным митохондриальным дефектом является потеря субъединиц респираторного комплекса, причем комплекс I несет наиболее серьезное повреждение. Таким образом, строительные блоки апоптотического механизма митохондрий имеют нормальные функции, не связанные со смертью клеток. Это относится к AIF, двуликой молекуле с апоптогенными свойствами, которая, кроме того, требуется для нормального процесса окислительного фосфорилирования [22].

С этих позиций полученные нами результаты изучения уровня AIF в митохондриях клеток опухоли и не затронутой злокачественным процессом кожи при росте меланомы в самостоятельном варианте и при стимуляции роста хронической болью можно трактовать как снижение дыхательной функции и активности окислительного фосфорилирования, необходимые для роста и развития злокачественной опухоли. Имеются данные, свидетельствующие о том, что эффективное митохондриальное дыхание предотвращает рак [24]. Кроме того, дефицит AIF приводит к большей чувствительности к окислительному стрессу [22]. Важно отметить, что дефицит AIF приводит к тяжелой митохондриальной дисфункции, вызывающей мышечную атрофию и нейродегенерацию у модельных организмов, а также у людей.

Вместе с тем мы не можем однозначно объяснить снижение уровня AIF в митохондриях изученных образцов. Это может быть как снижение его синтеза как белка, так и выход из митохондрий через увеличенные поры внешней митохондриальной мембраны и накопление его в цитозоле клеток.

Известно, что умеренная и сильная экспрессия AIF в цитозоле опухолевых клеток коррелировала с менее благоприятным прогнозом у больных с меланомой. Конфокальная микроскопия подтвердила локализацию AIF с митохондриальным маркером в опухолевых клетках. Повышенная экспрессия белка AIF выглядит как новый негативный прогностический фактор, прогнозирующий 5-летнюю выживаемость [25].

Цитохром С, так же как AIF, выполняет ключевые функции в поддержании функционирования митохондрий и в выполнении программы гибели клетки. Цитохром С является важным компонентом дыхательной цепи митохондрий, ответственным за перенос электронов из комплекса III в IV [26]. Цитохром С играет важную регуляторную роль в окислительном фосфорилировании благодаря его высоко динамичным взаимодействиям с окислительно-восстановительными мишенями и демонстрирует быструю смену во время цикла обмена электронов. Применение цитохрома С в эксперименте и клинической практике оказало положительное влияние на течение опухолевого процесса [27, 28].

Многообещающим направлением исследований является изучение прямого или косвенного действия  $Ca^{2+}$  на фосфорилирование цитохрома С. Предполагается, что кальций является самым сильным сигналом для активации митохондрий и играет ключевую роль в условиях клеточного стресса, приводя к гиперактивности комплексов электронно-транспортной цепи и усилению поляризации наружной митохондриальной

мембраны, что способствует чрезмерному производству активных форм кислорода. Это может влиять на цитохром С через изменения в состоянии фосфорилирования [29]. Цитохром С может быть целью фосфорилирования по двум причинам: поскольку фосфорилирование цитохрома С приводит к ингибированию дыхания, и повышенное фосфорилирование будет способствовать эффекту Варбурга, а также фосфорилирование цитохрома С может влиять на апоптоз, как это было предположено в исследованиях с фосфомиметическим цитохромом С, который не смог вызвать какую-либо измеримую активацию каспазы-9 [30]. Поскольку злокачественным новообразованиям удастся избежать апоптоза, повышенное фосфорилирование цитохрома С может обеспечить механизм подавления апоптоза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные, на наш взгляд, показывают, что длительный хронический болевой синдром может приводить к изменению системы регуляторов апоптоза в митохондриях кожи, что вносит свой вклад в стимуляцию роста меланомы на клеточном уровне.

Анализируя результаты, можно заключить:

1. в условиях роста опухоли в организме митохондрии клеток меланомы и неизменной кожи имеют схожую направленность изменения уровня факторов апоптоза, что, возможно, свидетельствует об их функционировании в условиях митохондриальной сети, во всяком случае, на уровне одного органа;
2. митохондрии клеток опухоли обеспечивают антиапоптотическое состояние самой опухоли и не затронутой злокачественным процессом кожи мышей, вероятно, обусловленное стрессорным состоянием кожи, вызванным ростом опухоли и особенно ростом опухоли на фоне ХНБ.

### Участие авторов:

Франциянц Е.М. – разработка концепции и дизайна работы, анализ и интерпретация результатов, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Нескубина И.В. – проведение эксперимента, анализ и интерпретация результатов, подготовка и редактирование рукописи.

Сурикова Е.И. – выполнение биохимических и ИФА исследований, подготовка и редактирование рукописи.

Шихлырова А.И. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Каплиева И.В. – разработка концепции и дизайна эксперимента.

Немашкалова Л.А. – выполнение биохимических и ИФА исследований.

Трепитики Л.К. – проведение эксперимента.

### Authors contribution:

Frantsiyants E.M. – development of the concept and design of the work, analysis and interpretation of the results, final approval for publication of the manuscript.

Neskubina I.V. – conducting the experiment, analyzing and interpreting the results, preparing and editing the manuscript.

Surikova I.E. – implementation of biochemical and ELISA studies, drafting and editing of the manuscript.

Shikhlyarova A.I. – check critically for important intellectual content, final approval for publishing the manuscript.

Kaplieva I.V. – development of the concept and design of the experiment.

Nemashkalova L.A. – execution of biochemical and ELISA studies.

Trepitaki L.K. – experiment.

## Список литературы

1. Austad SN. The Comparative Biology of Mitochondrial Function and the Rate of Aging. *Integr. Comp. Biol.* 2018;58(3):559–566. <https://doi.org/10.1093/icb/icy068>
2. Nguyen C, Pandey S. Exploiting Mitochondrial Vulnerabilities to Trigger Apoptosis Selectively in Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 29;11(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11070916>
3. Vaughn AE, Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome C. *Nat. Cell Biol.* 2008 Dec;10(12):1477–1483. <https://doi.org/10.1038/ncb1807>
4. Schindler A, Foley E. Hexokinase 1 blocks apoptotic signals at the mitochondria. *Cell Signal.* 2013 Dec;25(12):2685–2692. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.035>
5. Деев Р.В., Билялова А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели. *Гены и клетки.* 2018;1:6–19. <https://doi.org/10.23868/201805001>
6. Lim TKY, Rone MB, Lee S, Antel JP, Zhang J. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in trauma-induced painful peripheral neuropathy. *Mol Pain.* 2015 Sep 17;11:58. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0057-7>
7. Chiu HY, Tay EXY, Ong DST, Taneja R. Mitochondrial Dysfunction at the Center of Cancer Therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2020 Feb 10;32(5):309–330. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7898>
8. Favero G, Bonomini F, Franco C, Rezzani R. Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle of a Fibromyalgia Model: The Potential Benefits of Melatonin. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 11;20(3):765. <https://doi.org/10.3390/ijms20030765>
9. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А. и др. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Российский журнал боли.* 2017;2(53):14–20.
10. Hou X-S, Wang H-S, Mugaka BP, Yang G-J, Ding Y. Mitochondria: promising organelle targets for cancer diagnosis and treatment. *Biomater Sci.* 2018 Nov 1;6(11):2786–2797. <https://doi.org/10.1039/c8bm00673c>
11. 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):22–28.
12. Bhosale G, Sharpe JA, Sundier SY, Duchon MR. Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Sep;1350:107–116. <https://doi.org/10.1111/nyas.12885>
13. Umemoto T, Hashimoto M, Matsumura T, Nakamura-Ishizu A, Suda T. Ca<sup>2+</sup>-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2018 Aug 6;215(8):2097–2113. <https://doi.org/10.1084/jem.20180421>
14. Fedida-Metula S, Feldman B, Koshelev V, Levin-Gromiko U, Voronov E, Fishman D. Lipid rafts couple store-operated Ca<sup>2+</sup> entry to constitutive activation of PKB/Akt in a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-, Src- and PP2A-mediated pathway and promote melanoma tumor growth. *Carcinogenesis.* 2012 Apr;33(4):740–750. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs021>
15. Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol.* 2018 Jul;20(7):755–765. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0133-0>
16. Picard M, McEwen BS, Epel ES, Sandi C. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol.* 2018 Apr;49:72–85. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.001>
17. Dey S, Sayers CM, Verginadis II, Lehman SL, Cheng Y, Cerniglia GJ, et al. ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J Clin Invest.* 2015 Jul 1;125(7):2592–2608. <https://doi.org/10.1172/JCI78031>
18. Rogers C, Alnemri ES. Gasdermins in Apoptosis: New players in an Old Game. *Yale J Biol Med.* 2019 Dec;92(4):603–617.
19. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
20. Aouacheria A, Baghdiguian S, Lamb HM, Huska JD, Pineda FJ, Hardwick JM. Connecting mitochondrial dynamics and life-or-death events via Bcl-2 family proteins. *Neurochem Int.* 2017 Oct;109:141–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.04.009>
21. Gilmore A, King L. Emerging approaches to target mitochondrial apoptosis in cancer cells. *F1000Res.* 2019 Oct 24;8:F1000 Faculty Rev-1793. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18872.1>
22. Bano D, Prehn JHM. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine.* 2018 Apr;30:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016>
23. Vahsen N, Candé C, Brière J-J, Bénit P, Joza N, Larochette N, et al. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 2004 Nov 24;23(23):4679–4689. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600461>
24. Seyfried TN. Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:43. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00043>
25. Krasnik V, Furdova A, Svetlosakova Z, Kobzova D, Gergisakova H, Feketeova L, et al. Prognostic value of apoptosis inducing factor in uveal melanoma. *Neoplasma.* 2017;64(2):262–268. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2017\\_213](https://doi.org/10.4149/neo_2017_213)
26. Pérez-Mejías G, Guerra-Castellano A, Díaz-Quintana A, De la Rosa MA, Díaz-Moreno I. Cytochrome C: Surfing Off of the Mitochondrial Membrane on the Tops of Complexes III and IV. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:654–660. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.05.002>
27. Сидоренко Ю.С., Карташов С.З., Франциянц Е.М. Способ лечения рака легкого. Патент RU № 2123342 C1, опубл. 20.12.1998 г.. Доступно по: [https://patents.s3.yandex.net/RU2123342C1\\_19981220.pdf](https://patents.s3.yandex.net/RU2123342C1_19981220.pdf)
28. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Канаев П.А., Шенгер А.А. и др. Способ предотвращения развития злокачественного процесса в эксперименте.

Патент RU № 2559086 C1, опубл. 10.08.2015. Доступно по: [https://patents.s3.yandex.net/RU2559086C1\\_20150810.pdf](https://patents.s3.yandex.net/RU2559086C1_20150810.pdf)  
29. Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. Phosphorylation of mammalian cytochrome C and cytochrome C oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:237–264. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_10)

## References

1. Austad SN. The Comparative Biology of Mitochondrial Function and the Rate of Aging. *Integr. Comp. Biol.* 2018;58(3):559–566. <https://doi.org/10.1093/icb/icy068>
2. Nguyen C, Pandey S. Exploiting Mitochondrial Vulnerabilities to Trigger Apoptosis Selectively in Cancer Cells. *Cancers (Basel).* 2019 Jun 29;11(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11070916>
3. Vaughn AE, Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome C. *Nat. Cell Biol.* 2008 Dec;10(12):1477–1483. <https://doi.org/10.1038/ncb1807>
4. Schindler A, Foley E. Hexokinase 1 blocks apoptotic signals at the mitochondria. *Cell Signal.* 2013 Dec;25(12):2685–2692. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.035>
5. Deev RV, Bilyalov AI, Zhampeisov TM. Modern ideas about cell death. *Genes & Cells.* 2018;1:6–19. (In Russian). <https://doi.org/10.23868/201805001>
6. Lim TKY, Rone MB, Lee S, Antel JP, Zhang J. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in trauma-induced painful peripheral neuropathy. *Mol Pain.* 2015 Sep 17;11:58. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0057-7>
7. Chiu HY, Tay EXY, Ong DST, Taneja R. Mitochondrial Dysfunction at the Center of Cancer Therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2020 Feb 10;32(5):309–330. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7898>
8. Favero G, Bonomini F, Franco C, Rezzani R. Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle of a Fibromyalgia Model: The Potential Benefits of Melatonin. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 11;20(3):765. <https://doi.org/10.3390/ijms20030765>
9. Kit OI, Frantsiyants EM, Kotieva IM, Kaplieva IV, Trepitaki LK, Bandovkina VA, 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 Russian).
10. Hou X-S, Wang H-S, Mugaka BP, Yang G-J, Ding Y. Mitochondria: promising organelle targets for cancer diagnosis and treatment. *Biomater Sci.* 2018 Nov 1;6(11):2786–2797. <https://doi.org/10.1039/c8bm00673c>
11. Egorova M.V., Afanasiev S.A. Isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and human: Modern methodical approaches. *Siberian Medical Journal.* 2011;26(1-1):22–28. (In Russian).
12. Bhosale G, Sharpe JA, Sundier SY, Duchon MR. Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Sep;1350:107–116. <https://doi.org/10.1111/nyas.12885>
13. Umamoto T, Hashimoto M, Matsumura T, Nakamura-Ishizu A, Suda T. Ca<sup>2+</sup>-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2018 Aug 6;215(8):2097–2113. <https://doi.org/10.1084/jem.20180421>
14. Fedida-Metula S, Feldman B, Koshelev V, Levin-Gromiko U, Voronov E, Fishman D. Lipid rafts couple store-operated Ca<sup>2+</sup> entry to constitutive activation of PKB/Akt in a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-, Src- and PP2A-mediated pathway and promote melanoma tumor growth. *Carcinogenesis.* 2012 Apr;33(4):740–750. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs021>
15. Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol.* 2018 Jul;20(7):755–765. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0133-0>
16. Picard M, McEwen BS, Epel ES, Sandi C. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol.* 2018 Apr;49:72–85. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.001>
17. Dey S, Sayers CM, Verginadis II, Lehman SL, Cheng Y, Cerniglia GJ, et al. ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J Clin Invest.* 2015 Jul 1;125(7):2592–2608. <https://doi.org/10.1172/JCI78031>
18. Rogers C, Alnemri ES. Gasdermins in Apoptosis: New players in an Old Game. *Yale J Biol Med.* 2019 Dec;92(4):603–617.
19. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
20. Aouacheria A, Baghdiguian S, Lamb HM, Huska JD, Pineda FJ, Hardwick JM. Connecting mitochondrial dynamics and life-or-death events via Bcl-2 family proteins. *Neurochem Int.* 2017 Oct;109:141–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.04.009>
21. Gilmore A, King L. Emerging approaches to target mitochondrial apoptosis in cancer cells. *F1000Res.* 2019 Oct 24;8:F1000 Faculty Rev-1793. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18872.1>
22. Bano D, Prehn JHM. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine.* 2018 Apr;30:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016>
23. Vahsen N, Candé C, Brière J-J, Bénit P, Joza N, Larochette N, et al. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 2004 Nov 24;23(23):4679–4689. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600461>

24. Seyfried TN. Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:43. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00043>
25. Krasnik V, Furdova A, Svetlosakova Z, Kobzova D, Gergisakova H, Feketeova L, et al. Prognostic value of apoptosis inducing factor in uveal melanoma. *Neoplasma.* 2017;64(2):262–268. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2017\\_213](https://doi.org/10.4149/neo_2017_213)
26. Pérez-Mejías G, Guerra-Castellano A, Díaz-Quintana A, De la Rosa MA, Díaz-Moreno I. Cytochrome C: Surfing Off of the Mitochondrial Membrane on the Tops of Complexes III and IV. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:654–660. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.05.002>
27. Sidorenko JuS, Kartashov SZ, Frantsiyants EM. Method of treatment of patients with lung cancer Patent RF № 2123342 C1, published 20.12.1998. (In Russian). Available at: [https://patents.s3.yandex.net/RU2123342C1\\_19981220.pdf](https://patents.s3.yandex.net/RU2123342C1_19981220.pdf)
28. Kit OI, Frantsiyants EM, Kaplieva IV, Trepitaki LK, Kanaev PA, Shenger AA, et al. Method for preventing malignant process development experimentally. Patent RF № 2559086 C1, published 10.08.2015. (In Russian). Available at: [https://patents.s3.yandex.net/RU2559086C1\\_20150810.pdf](https://patents.s3.yandex.net/RU2559086C1_20150810.pdf)
29. Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. Phosphorylation of mammalian cytochrome C and cytochrome C oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:237–264. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_10)
30. Pecina P, Borisenko GG, Belikova NA, Tyurina YY, Pecinova A, Lee I, et al. Phosphomimetic substitution of cytochrome C tyrosine 48 decreases respiration and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation. *Biochemistry.* 2010 Aug 10;49(31):6705–6714. <https://doi.org/10.1021/bi100486s>

#### Информация об авторах:

Франциянц Елена Михайловна – д.б.н., профессор, заместитель генерального директора по науке, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN: 9427-9928, AuthorID: 462868

Нескубина Ирина Валерьевна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>, SPIN: 3581-8531, AuthorID: 794688

Сурикова Екатерина Игоревна\* – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4318-7587>, SPIN: 2401-4115, AuthorID: 301537

Шихлярова Алла Ивановна – д.б.н., профессор, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>, SPIN: 6271-0717, AuthorID: 482103

Каплиева Ирина Викторовна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3972-2452>, SPIN: 5047-1541, AuthorID: 734116

Немашкалова Людмила Анатольевна – научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2713-8598>, SPIN: 1355-8652, AuthorID: 734146

Трепитакки Лидия Константиновна – научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9749-2747>, SPIN: 2052-1248, AuthorID: 734359

#### Information about authors:

Elena M. Frantsiyants – Dr. Sci. (Biol.), professor, deputy director general for science, head of the laboratory for the study of the pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN: 9427-9928, AuthorID: 462868

Irina V. Neskubina – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher of the laboratory for the study of pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>, SPIN: 3581-8531, AuthorID: 794688

Ekaterina I. Surikova\* – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher of the laboratory for the study of pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4318-7587>, SPIN: 2401-4115, AuthorID: 301537

Alla I. Shikhlyarova – Dr. Sci. (Biol.), senior researcher of the laboratory for the study of pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>, SPIN: 6271-0717, AuthorID: 482103

Irina V. Kaplieva – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher of the laboratory for the study of pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3972-2452>, SPIN: 5047-1541, AuthorID: 734116

Lyudmila A. Nemashkalova – researcher at the laboratory for the study of the pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2713-8598>, SPIN: 1355-8652, AuthorID: 734146

Lidiya K. Trepitaki – assistant researcher of the laboratory for the study of pathogenesis of malignant tumors of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9749-2747>, SPIN: 2052-1248, AuthorID: 734359