Южно-Российский онкологический журнал 2021, т.2, №3, с. 13-22
https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-3-2
CC BY 4.0

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ ПРОЦЕССЕ НА ФОНЕ КОМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

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

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучение показателей свободнорадикального окисления и дыхания митохондрий клеток сердца при злокачественном процессе на фоне сахарного диабета и хронической нейрогенной боли у экспериментальных животных.

Материалы и методы.Работа выполнена на нелинейных крысах-самках (*n*=32) и мышах-самках линии C57BL/6 (*n*=84). Экспериментальные группы крыс: интактная 1 (*n*=8), контрольная группа 1 (*n*=8) с сахарным диабетом (СД), группа сравнения 1 (*n*=8) – стандартная подкожная перевивка карциномы Герена, основная группа 1 (*n*=8) – через 1 неделю стойкой гипергликемии перевивали карциному Герена. Экспериментальные группы мышей: интактная 2 (*n*=21), контрольная 2 (*n*=21) – воспроизведение модели хронической нейрогенной боли (ХНБ), группа сравнения 2 (*n*=21) – стандартная подкожная перевивка меланомы (B16/F10), основная группа 2 (*n*=21) (ХНБ+B16/F10) – меланому перевивали через 3 недели после создания модели ХНБ. Митохондрии сердца получали методом дифференциального центрифугирования. В образцах митохондрий методом ИФА определяли концентрацию: цитохрома С (нг/мг белка), 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) (нг/мг белка), малонового диальдегида (МДА) (мкмоль/г белка). Статистический анализ – Statistica 10.0.

Результаты. Наличие СД у крыс способствовало повышению 8-OHdG в 6,3 раза, МДА в 1,9 раза (*p*=0,0000) и снижению цитохрома С в 1,5 раза (*p*=0,0053) в митохондриях клеток сердца по сравнению с интактными значениями. СД+карцинома Герена у крыс вызывало повышение уровня 8-OHdG в 14,0 раз, МДА в 1,7 раза (*p*=0,0000) и снижение цитохрома С в 1,5 раза (*p*=0,0093) по сравнению с интактными значениями. Присутствие ХНБ у мышей не повлияло на уровень изучаемых показателей в митохондриях сердца. ХНБ+меланома B16/F10 у мышей приводило к повышению уровня 8-OHdG в 7,1 раза, МДА в 1,6 раза (*p*=0,0000) и снижению уровня цитохрома С в 1,6 раза (*p*=0,0008).

Заключение. Коморбидная патология (сахарный диабет, хроническая нейрогенная боль), сопряженная со злокачественным процессом, усугубляет дисфункцию митохондрий клеток сердца с дестабилизацией дыхательной цепи, опосредованной процессами свободнорадикального окисления.

Ключевые слова:
митохондрии, сердце, экспериментальные животные, карцинома Герена, меланома B16/F10, цитохром С, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, малоновый диальдегид.

Для корреспонденции:
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.
Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, д. 63
E-mail: neskubina.irina@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7395-3086
SPIN: 3581-8531, AuthorID: 794688

Информация о финансировании: финансирование данной работы не проводилось.
Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:
Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Черярина Н.Д., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Бандовкина В.А., Немашкалова Л.А., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Качесова П.С., Котиева И.М., Морозова М.И., Погорелова Ю.А. Функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов при злокачественном процессе на фоне коморбидной патологии в эксперименте. Южно-Российский онкологический журнал. 2021; 2(3): 13-22. https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-3-2

Получено 08.06.2021, Рецензия (1) 08.07.2021, Рецензия (2) 28.07.2021, Опубликовано 09.09.2021

South Russian Journal of Cancer 2021, v.2, №3, p. 13-22
https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-3-2
ORIGINAL ARTICLE

FUNCTIONAL STATE OF CARDIOMYOCYTE MITOCHONDRIA IN MALIGNANT PROCESS IN PRESENCE OF COMORBID PATHOLOGY IN EXPERIMENT

E.M.Frantsiyants, I.V.Neskubina*, N.D.Cheryarina, E.I.Surikova, A.I.Shikhlyarova, V.A.Bandovkina, L.A.Nemashkalova, I.V.Kaplieva, L.K.Trepitaki, P.S.Kachesova, I.M.Kotieva, M.I.Morozova, Yu.A.Pogorelova

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. An analysis of indices of free radical oxidation and respiration of mitochondria of heart cells in a malignant process in presence of diabetes mellitus and chronic neurogenic pain in experimental animals.
Materials and methods. The study included outbred female rats (*n*=32) and C57BL/6 female mice (*n*=84). Experimental groups of rats were: intact group 1 (*n*=8), control group 1 (*n*=8) with diabetes mellitus (DM), comparison group 1 (*n*=8) with standard subcutaneous transplantation of Guerin's carcinoma, main group 1 (*n*=8) with Guerin's carcinoma transplanted after 1 week of persistent hyperglycemia. Experimental groups of mice were: intact group 2 (*n*=21), control group 2 (*n*=21) with a model of chronic neurogenic pain (CNP), comparison group 2 (*n*=21) with standard subcutaneous transplantation of melanoma (B16/F10), main group 2 (*n*=21) (CNP+B16/F10) with melanoma transplanted 3 weeks after the CNP model creation. Heart mitochondria were isolated by differential centrifugation. Levels of cytochrome C (ng/mg of protein), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) (ng/mg of protein), and malondialdehyde (MDA) (μmol/g of protein) were measured in mitochondrial samples by ELISA. Statistical analysis was performed using the Statistica 10.0 program.
Results. DM in rats upregulated 8-OHdG by 6.3 times and MDA by 1.9 times (*p*=0.0000) and downregulated cytochrome C by 1.5 times (*p*=0.0053) in heart cell mitochondria, compared to intact values. DM+Guerin's carcinoma in rats increased 8-OHdG by 14.0 times and MDA by 1.7 times (*p*=0.0000) and decreased cytochrome C by 1.5 times (*p*=0.0000), compared to intact values. CNP in mice did not affect the studied parameters in mitochondria of the heart. CNP+B16/F10 in mice increased 8-OHdG by 7.1 times and MDA by 1.6 times (*p*=0.0000) and decreased cytochrome C by 1.6 times (*p*=0.0008).
Conclusions. Comorbidity (diabetes mellitus, chronic neurogenic pain) together with malignant pathology aggravates mitochondrial dysfunction of heart cells with destabilization of the respiratory chain mediated by free radical oxidation processes.

Keywords:
mitochondria, heart, experimental animals, Guerin's carcinoma, B16/F10 melanoma, cytochrome C, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, malondialdehyde.

For correspondence:
Irina V. Neskubina – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher at the laboratory for the study of the pathogenesis of malignant tumors 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: neskubina.irina@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7395-3086
SPIN: 3581-8531, AuthorID: 794688

Information about funding: no funding of this work has been held.
Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:
Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Cheryarina N.D., Surikova E.I., Shikhlyarova A.I., Bandovkina V.A., Nemashkalova L.A., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Kachesova P.S., Kotieva I.M., Morozova M.I., Pogorelova Yu.A. Functional state of cardiomyocyte mitochondria in malignant process in presence of comorbid pathology in experiment. South Russian Journal of Cancer. 2021; 2(3): 13-22. https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-3-2

Received 08.06.2021, Review (1) 08.07.2021, Review (2) 28.07.2021, Published 09.09.2021

АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время активно развивается новое мультидисциплинарное направление – кардиоонкология, основанное на комплексном персонализированном подходе к профилактике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у онкологических больных. Достижения в онкологии привели к увеличению выживаемости, что в свою очередь увеличило количество пациентов, доживающих до развития отдаленных кардиологических осложнений [1]. В целом, такие осложнения нередки и могут возникнуть практически у каждого онкологического больного [2]. Причинами являются не только кардиотоксические эффекты противоопухолевой терапии, но и то, что само онкологическое заболевание провоцирует появление сердечно-сосудистых проблем, особенно у пациентов, имеющих к этому предпосылки, а также ССЗ могут быть связаны с декомпенсацией хронической коморбидной патологии, существующей у онкологического больного. Присоединение кардиологического заболевания снижает качество жизни, а иногда делает невозможной продолжение специального лечения.

Помимо кардиологической патологии зачастую злокачественный процесс сопровождается другими коморбидными заболеваниями. Известна связь сахарного диабета со злокачественным процессом, нередко у больных со злокачественными опухолями присутствует диабет [3]. Боль достаточно часто является сопровождающим компонентом опухолевого процесса и присутствует у 30-50 % онкологических больных после проведения противоопухолевой терапии, у 65-90 % пациентов в связи с прогрессированием заболевания, 33 % пациентов страдают от боли после окончания противоопухолевого лечения [4]. Происхождение боли у онкологических больных, как правило многофакторное: сопутствующие заболевания, прямые и косвенные эффекты роста опухоли, побочное действие противоопухолевой терапии [4].

Сердце – орган, потребляющий много энергии, и его функция в значительной степени зависит от АТФ (аденозинтрифосфорная кислота), вырабатываемого митохондриями. Хорошо известно, что митохондрии обеспечивают функционирование различных органов в условиях нормы и патологии [5-7]. Дисфункция митохондрий является одной из основных причин различных сердечных заболеваний, требующая пристального изучения и понимания механизмов ремоделирования митохондрий в сердце [5, 8, 9]. Наиболее известная роль митохондрий – производство энергии, что имеет первостепенное значение для органов с высоким уровнем метаболизма, таких как сердце. Более того, митохондрии опосредуют судьбу клеток, включая пролиферацию, дифференцировку и жизнеспособность, а также могут изменять нормальное развитие организма [10]. Доказано, что митохондрии кардиомиоцитов являются крупнейшими продуцентами активных форм кислорода (АФК), а гидроксильные радикалы повреждают митохондриальные белки, митохондриальную ДНК (мтДНК) и липиды мембран. Последнее, называемое перекисным окислением липидов, способно нарушать функции митохондрий, включая окисление жирных кислот (ЖК) [11] и продукцию АТФ, что в свою очередь может потенциально вызвать систолическую дисфункцию [12, 13]. Значительное окислительное повреждение, обнаруженное в митохондриях, может, таким образом, способствовать их функциональному дефициту в сердце [5].

Сахарный диабет возникает при нарушении толерантности к глюкозе из-за инсулинорезистентности. В патогенезе и прогрессировании сахарного диабета взаимодействуют разные факторы [14]. Диабетическая кардиомиопатия – основная причина сердечной недостаточности и смерти пациентов с диабетом [15].

Хроническая нейропатическая боль определяется как «боль, возникающая вследствие прямого поражения или заболевания периферических или центральных нейронов, которое влияет на соматосенсорную систему» [16] и связана с нарушением структурных и функциональных связей мозга [17, 18]. На данный момент вопрос влияния болевого синдрома на сердечно-сосудистую систему изучен недостаточно полно, поэтому является областью науки, требующей более пристального исследования.

В связи с вышесказанным, весьма актуальным представляется изучение влияния коморбидных заболеваний, сопровождающих злокачественный процесс и выявление дисфункциональных параметров на субклеточном уровне в органах, не затронутых злокачественным процессом.

Цель исследования: изучение показателей свободнорадикального окисления и дыхания митохондрий клеток сердца при злокачественном процессе на фоне сахарного диабета и хронической нейрогенной боли у экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на нелинейных крысах-самках (*n*=32) 180-220 г и мышах-самках линии C57BL/6 (*n*=84) 8 недельного возраста с начальной массой 21-22 г. Животные были получены из ФГБУ МНИЦ Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышиной меланомы B16/F10 и штамм карциномы Герена. Опухолевые штаммы получены 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/EEC) 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 г., был одобрен протокол исследования (протокол этического комитета № 2) по работе с мышами линии C57BL/6 и по работе с нелинейными крысами от 01.09.2020 г., протокол этического комитета № 21/99. Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики.

Крысы-самки (*n*=32) были распределены методом случайной выборки на следующие экспериментальные группы: интактная группа 1 (*n*=8), контрольная группа 1 с диабетом (*n*=8), группа сравнения 1 (*n*=8) – крысы со стандартной подкожной трансплантацией карциномы Герена, основная группа 1 (*n*=8) – крысы, которым сначала воспроизводили сахарный диабет (СД) (однократно, внутрибрюшинно вводили аллоксан в дозе 150 мг/кг веса) и через 1 неделю стойкой гипергликемии трансплантировали карциному Герена по 0,5 мл взвеси клеток опухоли в физиологическом растворе в разведении 1:5. На момент трансплантации карциномы Герена у животных основной группы 1 (*n*=8) средние показатели глюкозы в крови составили 25,4±1,2 мМоль/л, тогда как в группе интактных животных 1 (*n*=8) – 5,2±0,3 мМоль/л. Декапитацию животных производили на гильотине через 14 дней после трансплантации карциномы Герена и через 21 день воспроизведения экспериментального СД.

Мышей-самок линии C57BL/6 (*n*=84) распределяли методом случайной выборки на следующие экспериментальные группы: интактная группа 2 (*n*=21), контрольная группа 2 (*n*=21) – воспроизведение модели хронической нейрогенной боли (ХНБ) [19]. Группа сравнения 2 (*n*=21) – мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы (B16/F10), основная группа 2 (*n*=21) (ХНБ+B16/F10) – мыши, которым меланому перевивали через 3 недели после создания модели ХНБ.

Мышам-самкам основной группы 2 (ХНБ+B16/F10) осуществляли перевязку седалищных нервов с 2-х сторон под ксила-золетиловым наркозом: ксилазин (препарат Ксила) внутримышечно, в дозе 0,05 мл/кг (по инструкции), через 10 мин. вводили Золетил-50 в дозе 10 мг/100 г. Через 3 недели после заживления операционной раны 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 воспроизведения модели хронической боли. Декапитировали мышей на гильотине. Животных из основной группы 2 и группы сравнения 2 декапитировали через 14 дней после трансплантации экспериментальной меланомы B16/F10.

После декапитации у животных с использованием хладагентов быстро извлекали сердце и выделяли митохондрии по методу Егоровой М. В., Афанасьева С.А. (2011) [20] с применением дифференциального центрифугирования на высокоскоростной рефрижераторной центрифуге Avanti J-E, BECMAN COULTER, USA. 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, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ TRIS-HCL, 10 мМ HEPES, pH 7,4). Ткани гомогенизировали и центрифугировали первый раз 10 мин. при скорости 1000 g, температура 0-2 °С, второе и третье центрифугирование осуществляется при 20000 g, 20 мин., температура 0-2 °С. Между центрифугированием проводили процедуру ресуспендирования осадка митохондрий в среде выделения. Фракцию митохондрий дополнительно очищали от лизосом,

пероксисом, меланосом и т.п., центрифугируя в 23 % градиенте Перколла. Суспензию субклеточных структур наслаивали на градиент Перколла, центрифугировали 15 мин. при 21000 g, после этого наблюдалось разделение на 3 фазы, оставляли нижний слой митохондрий и ресуспендировали средой выделения. Следующую промывку митохондрий осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 15000 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 всех групп с помощью тест-систем на ИФА-анализаторе (Infinite F50 Tecan, Austria) определяли концентрацию: цитохрома С (нг/мг белка) (Bioscience, Austria), 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) (нг/мг белка) (Enzo Life Sciences, Switzerland), малонового диальдегида (МДА) (мкмоль/г белка) (BlueGene Biotech, China); биохимическим методом – количество белка (мг/мл) – биуретовый метод (Ольвекс Диагностикум, Россия) на автоматическом анализаторе ChemWell (Awareness Technology INC, USA).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Полученные данные подвергали анализу на соответствие распределения признаков нормальному закону распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка (для малых выборок). Сравнение количественных данных в группах (независимые выборки) проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса (множественные сравнения). Данные таблиц представлены в виде M±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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе экспериментальных данных, полученных при использовании модели сахарного диабета и росте карциномы Герена необходимо было установить влияние сахарного диабета (контрольная группа 1) на митохондрии клеток сердца крыс-самок. Так, по сравнению с значениями в интактной группе 1 обнаружили повышение 8-OHdG в 6,3 раза, МДА в 1,9 раза ($p<0,05$) и снижение цитохрома С в 1,5 раза ($p<0,05$) (табл. 1).

В группе сравнения 1 значимых изменений не обнаружено. Сочетание двух патологических процессов в организме животного – сахарного диабета и злокачественной опухоли – вызывало следующие изменения изучаемых показателей: уровень 8-OHdG увеличился в 14,0 раз, МДА в 1,7 раза ($p<0,05$), а цитохрома С снизился в 1,5 раза ($p<0,05$) по сравнению с значениями в интактной группе 1. Статистически значимые различия между группами животных определялись только в уровне 8-OHdG, данный показатель при сравнении между контрольной 1 и основной 1 группами был в 2,2 раза выше в основной, а при сопоставлении со значениями в группе сравнения оказался выше в 17,4 раза в основной 1. Уровень МДА в основной группе 1 превышал значения в группе сравнения 1 в 1,5 раза ($p<0,05$).

Таким образом, наиболее выраженные изменения в уровне изучаемых показателей (8-OHdG,

Таблица 1. Изменение показателей свободнорадикального окисления и дыхания митохондрий клеток сердца крыс-самок при сахарном диабете и карциноме Герена

	8-OHdG нг/мг белка	МДА мкмоль/г белка	Цитохром С нг/мг белка
Интактная группа 1 (n=8)	0,927±0,048	14,912±1,110	1,382±0,137
Контрольная группа 1 – сахарный диабет (n=8)	5,890±0,529[1] p^1=0,0000	27,866±0,813[1] p^1=0,0000	0,900±0,048[1] p^1=0,0053
Группа сравнения 1– карцинома Герена (n=8)	0,748±0,058	16,992±0,599	1,215±0,101
Основная группа 1 – сахарный диабет + карцинома Герена (n=8)	13,050±0,942[1,2,3] p^1=0,0000 p^2=0,0000 p^3=0,0000	26,092±0,642[1,3] p^1=0,0000 p^3=0,0000	0,949±0,041[1] p^1=0,0093

Примечание: p^1 – статистически значимые различия по сравнению со значениями в интактной группе; p^2 – статистически значимые различия по сравнению со значениями в контрольной группе; p^3 – статистически значимые различия по отношению к значениям в группе сравнения.

МДА, цитохром С) в митохондриях клеток сердца крыс-самок были определены в группе животных, где злокачественный процесс развивался на фоне коморбидной патологии – сахарного диабета.

Следующий раздел работы был посвящен изучению влияния другой коморбидной патологии – хронической нейрогенной боли, сопровождающей рост меланомы B16/F10 у мышей-самок в митохондриях клеток сердца. Прежде всего, необходимо было оценить состояние свободнорадикальных процессов и дыхания митохондрий клеток сердца самок мышей, при влиянии ХНБ, в результате было определено, что значимых различий всех изучаемых показателей (8-OHdG, МДА, цитохром С) со значениями в интактной группе 2 не было (табл. 2).

При самостоятельном росте меланомы B16/F10 у мышей-самок, как и в случае с самостоятельным ростом карциномы Герена у крыс, не обнаружено значимых изменений по сравнению с уровнем в интактной группе 2.

Сопряжение двух патологических процессов (ХНБ+меланома B16/F10) в организме животного привело к изменению всех изучаемых биохимических показателей в митохондриях сердца мышей-самок. Так при росте меланомы на фоне хронической нейрогенной боли по сравнению со значениями в интактной группе 2 зафиксировано повышение уровня 8-OHdG в 7,1 раза, МДА – в 1,6 раза (p<0,05) и снижение уровня цитохрома С – в 1,6 раза (p<0,05). По сравнению со значениями в контрольной группе 2 было определено повышение уровня 8-OHdG в 6,6 раза, уровня МДА – в 2,0 раза, а уровень цитохрома С, напротив, снижался в 2,1 раза. При сравнении полученных результатов между основной группой 2 (ХНБ+меланома B16/F10) и группой сравнения 2 (меланома B16/F10) было определено, что уровень продуктов перекисного окисления – 8-OHdG и МДА превышали соответствующие показатели по группе сравнения 2 в 7,7 раза и 1,8 раза (p<0,05), а цитохром С был снижен в 1,3 раза (p<0,05).

Совокупность представленных изменений показателей 8-OHdG, МДА и цитохрома С в случае стандартного роста меланомы и при сопутствующей ХНБ у мышей-самок характеризует разную дисфункцию митохондрий в зависимости от присутствия коморбидной патологии – ХНБ. При этом более выраженные дисфункциональные изменения митохондрий клеток сердца мышей-самок отмечались при наложении на коморбидную патологию – ХНБ злокачественного процесса.

Среди наиболее важных биологических маркеров окислительного стресса можно выделить пурины: 8-OHdG или его окисленную форму – 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин (8-oxodG). Хотя все живые клетки развивают широкий спектр механизмов репарации ДНК, их ферментативная система репарации не всегда приводит к полному удалению всех модификаций ДНК. Следовательно, неправильно восстановленная ДНК представляет собой серьезную проблему для клеток, в основном из-за изменений генетической информации, а также связанных с ними мутагенеза и апоптоза клеток [21]. Модификации 8-OHdG и 8-oxodG возникают в результате взаимодействия гидроксильного или супероксидного радикалов и гуанина G в цепи ДНК. Свободные радикалы атакуют G цепи ДНК или свободный 2'-дезоксигуанозин, в результате чего образуются радикальные аддукты. Отрыв электро-

Таблица 2. Показатели свободнорадикальных процессов и дыхания митохондрий клеток сердца самок мышей при хронической нейрогенной боли и росте меланомы B16/F10

	8-OHdG нг/мг белка	МДА мкмоль/г белка	Цитохром С нг/мг белка
Интактная группа 2 (n=21)	1,525±0,078	3,728±0,189	4,611±0,57
Контрольная группа 2 – ХНБ (n=21)	1,63±0,082	2,909±0,254	6,18±0,59
Группа сравнения 2 – меланома B16/F10 (n=21)	1,399±0,101	3,254±0,227	3,81±0,47
Основная группа 2 – ХНБ+меланома B16/F10 (n=21)	10,785±0,387[1,2,3] p^1=0,0000 p^2=0,0000 p^3=0,0000	6,003±0,216[1,2,3] p^1=0,0000 p^2=0,0000 p^3=0,0000	2,934±0,47[1,2,3] p^1=0,0008 p^2=0,0010 p^3=0,0024

Примечание: p^1 – статистически значимые различия по сравнению со значениями в интактной группе; p^2 – статистически значимые различия по сравнению со значениями в контрольной группе; p^3 – статистически значимые различия по отношению к значениям в группе сравнения.

нов образует 8-OHdG, который в результате реакции, известной как кето-енольная таутомерия, превращается в основной окисленный продукт 8-oxodG [21].

Многочисленные экспериментальные данные подчеркивают прямую связь между окислительным стрессом и диабетом посредством измерения биомаркеров окислительного стресса как у пациентов с диабетом, так и у экспериментальных животных с воспроизведенным сахарным диабетом [15, 22, 23]. Гипергликемическое состояние может привести к увеличению уровней маркеров повреждения ДНК, вызванных окислительным стрессом, таких как 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин; продукты перекисного окисления липидов, измеряемые как вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (TBARS); продукты окисления белков, такие как уровень нитротирозина и карбонила, а также снижают активность антиоксидантных ферментов [15].

В представленном исследовании на экспериментальных животных было подтверждено усиление процессов перекисного окисления липидов по нарастанию продуктов окисления 8-OHdG, МДА и снижению компонента дыхательной цепи – цитохрома С при сахарном диабете в митохондриях клеток сердца.

Один из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – МДА. Образование МДА происходит в результате свободно-радикального окисления полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран активными формами кислорода [24]. В местах присоединения перекисных радикалов жирные кислоты разрываются на фрагменты, на краях которых расположены альдегидные группы, обладающие высокой реакционной способностью. Если разрыв произошел с двух сторон, образуется МДА. Реагируя с SH- и CH3-группами белков, МДА подавляет активность ферментов: цитохромоксидазы, гидроксилазы и т.д. МДА – высокотоксическое соединение, вызывающее полимеризацию белков, разрушение ДНК, сульфгидрильных антиоксидантов, модификацию липидного слоя клеточных мембран. Как следствие, происходит подавление генерации высокоэнергетических соединений митохондриями, в частности, аденозинтрифосфата, необходимого для обеспечения жизнедеятельности клеток, темпов роста, развития целостного организма. МДА считается наиболее мутагенным продуктом перекисного окисления липидов [24].

Полагаем, что выявленные изменения МДА и 8-OHdG в эксперименте на грызунах при использовании модели сахарного диабета и хронической нейрогенной боли сочетанными с двумя штаммами злокачественной опухоли (карцинома Герена, меланома B16/F10) могут указывать на способность МДА повреждать ДНК, через повышение биомаркера окислительного стресса – 8-OHdG.

Цитохром С «чрезвычайно многофункциональный» белок [25]. Он опосредует перенос электронов в дыхательной цепи и действует как детоксифицирующий агент для избавления от АФК. Кроме того, цитохром С, участвует в апоптозе клеток как предшественник внутреннего апоптоза, опосредованного митохондриями [25, 26]. Как белок периферической мембраны митохондрий, цитохром С действует между внутренней и внешней митохондриальной мембраной здоровых клеток, где он опосредует перенос электронов между комплексами III и IV дыхательной цепи [25].

В рамках данного эксперимента показано, что уровень цитохрома С в митохондриях сердца при стандартном росте карциномы Герена и меланомы B16/F10 не имел статистически значимых изменений, тогда как при карциноме Герена и росте меланомы на фоне коморбидной патологии – сахарный диабет и ХНБ отмечено его падение.

В данной работе, используя две модели коморбидной патологии (сахарный диабет, хроническая нейрогенная боль) и два штамма злокачественной опухоли (карцинома Герена, меланома B16/F10) на разных экспериментальных животных (крысы, мыши) были продемонстрированы как общие дисфункциональные изменения митохондий клеток сердца, так и принципиальные отличия. В результате были выявлены отличия между двумя коморбидными патологиями, так при сахарном диабете было выявлено нарастание свободно-радикального окисления с подавлением митохондриального дыхания, а при хронической нейрогенной боли митохондрии клеток сердца были стабильны. Стоит отметить, что самостоятельное развитие опухолевого процесса – карциномы Герена и меланомы B16/F10 – в организме крыс-самок и мышей-самок не повлияло на функциональное состояние митохондрий клеток сердца. Общие дисфункциональные нарушения в митохондриях клеток сердца фиксировали при сочетании коморбидных патологий и злокачественного процесса, что выразилось в нарастании всех продуктов перекисного окисления липидов и пода-

влении цитохрома С.

В последнее время митохондрии привлекли значительное внимание, как академических кругов, так и фармакологических концернов, поскольку митохондриальная дисфункция является признаком многих заболеваний, включая сердечную недостаточность. В целом, многие исследования подтверждают ведущую роль нарушения активности митохондриальной цепи транспорта электронов, окислительного стресса и т.д. в дисфункции кардиомиоцитов и, как следствие, в установлении или прогрессировании сердечной недостаточности [23, 27]. Почему же митохондрии играют такую центральную роль в сердечной недостаточности? Прежде всего, митохондрии – это электростанция клетки. Митохондрии составляют ~ 35 % объема кардиомиоцитов и образуют длинную, динамичную и хорошо организованную сеть, которая облегчает как физические, так и химические взаимодействия между митохондриями и другими внутриклеточными структурами. Недавние исследования, посвященные клеточным и молекулярным механизмам, участвующим в патофизиологии сердечной недостаточности и в области кардиоонкологии, указывают на митохондрии как на стратегические и динамические узлы, которые фактически влияют на каждый биохимический процесс в клетках сердца [23]. Дисфункциональная митохондриальная сеть кардиомиоцитов может быстро распространять повреждение внутри кардиомиоцитов при сердечной недостаточности [23]. Следовательно, выявление точек или маркеров дисфункционального состояния митохондрий можно рассматривать, как перспективное научное направление, результаты которого могут быть использованы для разработки различных новых терапевтических стратегий, включая малые молекулы и пептиды, нацеленные на различные митохондриальные аномалии способные улучшить функцию сердца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные результаты по всем использованным моделям коморбидной патологии (сахарный диабет, хроническая нейрогенная боль) и злокачественного процесса (карцинома Герена, меланома B16/F10) на грызунах, можно утверждать, что коморбидная патология, сопряженная со злокачественным процессом, усугубляет дисфункцию митохондрий клеток сердца с дестабилизацией дыхательной цепи, опосредованной процессами свободнорадикального окисления.

Участие авторов:
Франциянц Е.М. – концепция и дизайн исследования, написание текста, анализ и интерпретация данных.
Нескубина И.В. – сбор, анализ и интерпретация данных, техническое редактирование, оформление библиографии.
Черярина Н.Д. – техническое редактирование.
Сурикова Е.И. – техническое редактирование, обработка материала.
Шихлярова А.И. – научное редактирование.
Бандовкина В.А. – ассистенция на операциях, подготовка статьи.
Немашкалова Л.А. – техническое редактирование.
Каплиева И.В. – научное редактирование.
Трепитаки Л.К. – ассистенция на операциях.
Качесова П.С. – оформление библиографии.
Котиева И.М. – научное редактирование.
Морозова М.И. – анализ и интерпретация результатов.
Погорелова Ю.А. – ассистенция на операциях.

Список литературы

1. Coughlin SS, Ayyala D, Majeed B, Cortes L, Kapuku G. Cardiovascular Disease among Breast Cancer Survivors. Cardiovasc Disord Med. 2020;2(1).
https://doi.org/10.31487/j.cdm.2020.01.01
2. Каприн А.Д., Мацкеплишвили С.Т., Потиевская В.И., Поповкина О.Е., Болотина Л.В., Шкляева А.В., Полуэктова М.В. Сердечно-сосудистые заболевания у онкологических больных. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2019;8(2):139–147.
https://doi.org/10.17116/onkolog20198021139
3. Cignarelli A, Genchi VA, Caruso I, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, et al. Diabetes and cancer: Pathophysiological fun-

damentals of a “dangerous affair.” Diabetes Res Clin Pract. 2018 Sep;143:378–388.
https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.04.002
4. Leppert W, Zajaczkowska R, Wordliczek J, Dobrogowski J, Woron J, Krzakowski M. Pathophysiology and clinical characteristics of pain in most common locations in cancer patients. J Physiol Pharmacol. 2016 Dec;67(6):787–799.
5. Louwagie EJ, Larsen TD, Wachal AL, Gandy TCT, Baack ML. Mitochondrial Transfer Improves Cardiomyocyte Bioenergetics and Viability in Male Rats Exposed to Pregestational Diabetes. Int J Mol Sci. 2021 Feb 27;22(5):2382.
https://doi.org/10.3390/ijms22052382
6. Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Каплиева И.В., Немашкалова Л.А. и др. Состояние системы факторов апоптоза в митохондриях клеток кожи и опухоли при стандартном и стимулированном росте меланомы B16/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
7. Кит О.И., Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Каплиева И.В., Бандовкина В.А. Влияние варианта развития меланомы B16/F10 на содержание кальция в митохондриях различных органов самок мышей. Исследования и практика в медицине. 2021;8(1):20–29. https://doi.org/10.17709/2409-2231-2021-8-1-2
8. Murphy E, Ardehali H, Balaban RS, DiLisa F, Dorn GW, Kitsis RN, et al. Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circ Res. 2016 Jun 10;118(12):1960–1991.
https://doi.org/10.1161/RES.0000000000000104
9. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. Antioxid Redox Signal. 2003 Dec;5(6):731–740. https://doi.org/10.1089/152308603770380034
10. Sun X, Alford J, Qiu H. Structural and Functional Remodeling of Mitochondria in Cardiac Diseases. Int J Mol Sci. 2021 Apr 17;22(8):4167.
https://doi.org/10.3390/ijms22084167
11. Murphy E, Ardehali H, Balaban RS, DiLisa F, Dorn GW, Kitsis RN, et al. Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circ Res. 2016 Jun 10;118(12):1960–1991.
https://doi.org/10.1161/RES.0000000000000104
12. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J. 2009 Jan 1;417(1):1–13.
https://doi.org/10.1042/BJ20081386
13. Mdaki KS, Larsen TD, Wachal AL, Schimelpfenig MD, Weaver LJ, Dooyema SDR, et al. Maternal high-fat diet impairs cardiac function in offspring of diabetic pregnancy through metabolic stress and mitochondrial dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016 Mar 15;310(6):H681–H692.
https://doi.org/10.1152/ajpheart.00795.2015
14. Münzel T, Gori T, Keaney JF, Maack C, Daiber A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. Eur Heart J. 2015 Oct 7;36(38):2555–2564.
https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv305
15. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2019;11(3):45–63.
16. Patti M-E, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. Endocr Rev. 2010 Jun;31(3):364–395. https://doi.org/10.1210/er.2009-0027
17. Treede R-D, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. Neurology. 2008 Apr 29;70(18):1630–1635.
https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59
18. Kuhner R, Flor H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. Nat Rev Neurosci. 2016 Dec 15;18(1):20–30.
https://doi.org/10.1038/nrn.2016.162
19. Кит О.И. Котиева И.М., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А. и др. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы B16/F10 у самцов мышей. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2019;(1(201)):106–111.
20. 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.
21. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2’-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2009 Apr;27(2):120–139.
https://doi.org/10.1080/10590500902885684
22. Frantsiyants EM, Neskubina IV, Shikhlyarova AI, Cheryarina ND, Kaplieva IV, Bandovkina VA, et al. The effect of diabetes mellitus under tumor growth on respiratory function and free radical processes in heart cell mitochondria in rats. Cardiometry. 2021;18:50–55.
https://doi.org/10.18137/cardiometry.2021.18.5055
23. Kiyuna LA, Albuquerque RPE, Chen C-H, Mochly-Rosen D, Ferreira JCB. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. Free Radic Biol Med. 2018 Dec;129:155–168.
https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.019
24. Voulgaridou G-P, Anestopoulos I, Franco R, Panayiotidis MI, Pappa A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: cur-

rent state of knowledge. Mutat Res. 2011 Jun 3;711(1–2):13–27. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.006

25. Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, Polticelli F, Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. Int J Biol Macromol. 2019 Sep 1;136:1237–1246. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.180

26. Kim-Campbell N., Gomez H., Bayir H. Chapter 20—Cell death pathways: Apoptosis and regulated necrosis. In: Ronco C., Bellomo R., Kellum J.A., Ricci Z., editors. Critical Care Nephrology. 3rd ed. Elsevier; Philadelphia, PA, USA. 2019:113–121. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00020-0

27. Frantsiyants EM, Neskubina IV, Shikhlyarova AI, Yengibaryan MA, Vashenko LN, Surikova EI, et al. Content of apoptosis factors and self-organization processes in the mitochondria of heart cells in female mice C57BL/6 under growth of melanoma B16/F10 linked with comorbid pathology. Cardiometry. 2021;18:121–130. https://doi.org/10.18137/cardiometry.2021.18.121130

Информация об авторах:

Франциянц Елена Михайловна – д.б.н., профессор, заместитель генерального директора по науке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: http://orcid.org/0000-0003-3618-6890, SPIN: 9427-9928, AuthorID: 462868, ResearcherID: Y-1491-2018, Scopus Author ID: 55890047700

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

Черярина Наталья Дмитриевна – врач-лаборант лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-3711-8155, SPIN: 2189-3404, AuthorID: 558243

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

Бандовкина Валерия Ахтямовна – д.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/0000-0002-2302-8271, SPIN: 8806-2641, AuthorID: 696989

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

Каплиева Ирина Викторовна – д.м.н., заведующая лабораторией 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

Трепитаки Лидия Константиновна – младший 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

Качесова Полина Сергеевна – научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6928-5014, SPIN: 5784-0475, AuthorID: 571595

Котиева Инга Мовлиевна – д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0252-4708, SPIN: 3478-5811, AuthorID: 637665

Морозова Мария Игоревна – врач-педиатр ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7640-6021, SPIN: 6030-8108, AuthorID: 1116725

Погорелова Юлия Александровна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории «Изучение патогенеза злокачественных опухолей», ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2674-9832, SPIN: 2168-8737, AuthorID: 558241