



© СС © Коллектив авторов, 2020
УДК 616-006.81 : 577.112]-092.4
DOI: 10.24884/1607-4181-2020-27-4-46-52

Е. М. Франциянц, И. В. Нескубина*, Н. Д. Черярина, Е. И. Сурикова, Л. А. Немашкалова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия

ВЛИЯНИЕ ВАРИАНТА РАЗВИТИЯ МЕЛАНОМЫ B16/F10 НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМА С В МИТОХОНДРИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ САМОК МЫШЕЙ

Поступила в редакцию 14.09.2020 г.; принята к печати 15.02.2021 г.

Резюме

Введение. Цитохром С в митохондриях переносит электроны от III к IV комплексу и является сигнальной молекулой в реализации апоптоза.

Цель — изучить уровень цитохрома С в митохондриях клеток различных органов мышей-самок при стандартном и стимулированном росте экспериментальной меланомы B16/F10.

Методы и материалы. В эксперименте использовали мышей-самок линии C57BL/6 ($n = 168$). Группы: интактная ($n = 21$); контрольная — модель хронической нейрогенной боли (ХНБ) ($n = 21$); группа М — стандартная трансплантация меланомы B16/F10 ($n = 63$); группа ХНБ + М — трансплантация меланомы B16/F10 через 3 недели после создания модели ХНБ ($n = 63$). Методом иммуноферментного анализа определяли уровень цитохрома С (нг/мг белка) (Bioscience, Austria). Статистический анализ результатов выполнен с помощью программы «Statistica 10.0».

Результаты. Через 1 неделю стандартного роста меланомы выявили повышение уровня цитохрома С в митохондриях мозга и печени в 2,7 и 1,7 раза, к 3-й неделе роста — снижение в печени и кожи в 1,7 раза. В митохондриях меланомы уровень цитохрома С был ниже интактных величин кожи: через 1 неделю — в 2,5 раза, 2 недели — в 4,5 раза, 3 недели — в 4,6 раза. Через 1 неделю стимулированного роста меланомы уровень цитохрома С снизился относительно контрольных величин: в мозге — в 2,2 раза, печени — в 1,9 раза, кожи — в 1,4 раза, к 3-й неделе в митохондриях мозга — в 4,8 раза, печени — в 4,7 раза, сердца — в 2,3 раза, кожи — в 1,9 раза. В митохондриях меланомы содержание цитохрома С было ниже значений в контрольной коже: через 1 неделю — в 15,3 раза, 2 недели — в 10,3 раза, 3 недели — в 8,8 раза.

Заключение. Установлено низкое содержание уровня цитохрома С в митохондриях меланомы при стандартном и стимулированном росте опухоли. Полученные данные возможно использовать в эксперименте и клинике по применению экзогенного цитохрома С как агента, способствующего замедлению злокачественного процесса.

Ключевые слова: митохондрии клеток, цитохром С, хроническая нейрогенная боль, экспериментальная меланома B16/F10, мыши-самки

Для цитирования: Франциянц Е. М., Нескубина И. В., Черярина Н. Д., Сурикова Е. И., Немашкалова Л. А. Влияние варианта развития меланомы B16/F10 на содержание цитохрома С в митохондриях различных органов самок мышей. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2020;27(4):46–52. DOI: 10.24884/1607-4181-2020-27-4-46-52.

* Автор для связи: Ирина Валерьевна Нескубина, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, 344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, д. 63. E-mail: nes Kubina.irina@mail.ru.

Elena M. Frantsiyants, Irina V. Neskubina*, Natalia D. Cheryarina, Ekaterina I. Surikova,
Lyudmila A. Nemashkalova

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

INFLUENCE OF B16/F10 MELANOMA GROWTH VARIANT ON THE LEVEL OF CYTOCHROME C IN MITOCHONDRIA IN VARIOUS ORGANS OF FEMALE MICE

Received 14.09.2020; accepted 15.02.2021

Summary

Introduction. Cytochrome C in mitochondria transfers electrons from complex III to complex IV, and it is a signaling molecule in the apoptosis realization.

The objective was to evaluate the level of cytochrome C in cell mitochondria in various organs of female mice with standard and stimulated growth of experimental B16/F10 melanoma.

Methods and materials. The experiment was performed on female C57BL/6 mice (n = 168). The groups were: intact animals (n = 21); controls with a model of chronic neurogenic pain (CNP) (n = 21); group M — standard B16/F10 melanoma transplantation (n = 63), group CNP + M — B16/F10 melanoma transplantation 3 weeks after CNP model creation (n = 63). The level of cytochrome C (ng / mg protein) were measured by ELISA (Bioscience, Austria). Statistical analysis of results was performed using the «Statistica 10.0» program.

Results. After 1 week of standard melanoma growth, an increase in the level of cytochrome C by 2.7 and 1.7 times was detected in mitochondria of the brain and liver; by the 3rd week, it decreased in the liver and skin by 1.7 times. In melanoma mitochondria, the level of cytochrome C was lower than in the skin of intact animals: by 2.5 times after week 1, by 4.5 times after week 2, and by 4.6 times after week 3. After 1 week of stimulated melanoma growth, the level of cytochrome C decreased compared control values: by 2.2 times in the brain, by 1.9 times in the liver, by 1.4 times in the skin; by week 3, it decreased by 4.8 times in mitochondria of the brain, by 4.7 times — in the liver, by 2.3 times — in the heart, by 1.9 times — in the skin. In melanoma mitochondria, the level of cytochrome C was lower than in the skin of intact animals: by 15.3 times after week 1, by 10.3 times after week 2, and by 8.8 times after week 3.

Conclusion. Low level of cytochrome C were found in melanoma mitochondria in standard and stimulated tumor growth. The data can be used in the experiment and in clinic for using exogenous cytochrome C as an agent slowing down the malignant process.

Keywords: cell mitochondria, cytochrome C, chronic neurogenic pain, experimental B16/F10 melanoma, female mice

For citation: Frantsiyants E. M., Neskubina I. V., Cheryarina N. D., Surikova E. I., Nemashkalova L. A. Influence of B16/F10 melanoma growth variant on the level of cytochrome C in mitochondria in various organs of female mice. *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2020;27(4):46 – 52. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2020-27-4-46-52.

* **Corresponding author:** Irina V. Neskubina, National Medical Research Centre for Oncology, 63, 14 liniya str., Rostov-on-Don, 344037, Russia. E-mail: nes kubina.irina@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром С — это небольшой, глобулярный, высококонсервативный белок с ковалентно присоединенной гемовой группой, который играет ключевую роль в митохондриальной цепи переноса электронов (ЕТС) и является ключевым регулятором апоптоза. В митохондриальной ЕТС цитохром С переносит электроны от комплекса III к комплексу IV [1]. Функция ЕТС полностью зависит от присутствия цитохрома С [2]. В апоптозе цитохром С действует как сигнальная молекула и выделяется из митохондрий в цитозоль во время клеточного стресса. В цитозоле он взаимодействует с фактором, инициирующим апоптоз (Araf-1), что приводит к образованию гептамерной апоптосомы, которая активизирует каспазы и инициирует путь гибели клеток. Известно, что на ранних стадиях апоптоза цитохром С функционирует как пероксидаза кардиолипина, специфичного для митохондрий липида. Это взаимодействие приводит к конформационным изменениям вокруг гемовой группы, превращая цитохром С в пентакоординированную структуру из ее нативной гексакоординированной формы [3]. Такое превращение повышает активность кардиолипинпероксидазы цитохром С в присутствии H_2O_2 . Это проапоптотическое событие способствует диссоциации цитохром С от внешней части внутренней митохондриальной мембраны и его высвобождению в цитозоль с индукцией апоптоза [4].

Развитие науки позволяет более детально изучать патогенез злокачественных опухолей, тем не менее остаются открытыми вопросы, связанные с течением данного заболевания. Говоря о патогенетическом значении нарушений митохондрий клеток, следует помнить, что роль этих органелл

не ограничивается простым обеспечением клеток переносчиками энергии [5]. Кроме того, «ответная реакция» митохондрий каждого органа на патологический процесс будет специфична, поскольку различные метаболически активные органы, такие как печень, мозг, сердечная и скелетная мышцы, содержат до нескольких тысяч митохондрий на клетку, а ткани с низкой потребностью энергии, например, желудка, содержат всего несколько десятков митохондрий [6]. Ранее нами найдена стимуляция роста меланомы под действием хронической нейрогенной боли [7], в связи с этим полагаем, что митохондриальная дисфункция при стимулированном росте меланомы может быть иной по сравнению со стандартным ростом опухоли.

Целью исследования было изучение уровня цитохрома С в митохондриях клеток различных органов мышей-самок при стандартном и стимулированном росте экспериментальной меланомы B16/F10.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Исследование выполнено на мышах-самках линии C57BL/6 (n = 168), 8-недельного возраста с массой тела 21 – 22 г. Животных распределяли методом случайной выборки на экспериментальные группы: интактная (n = 21); контрольная (Кб) — воспроизведение модели хронической нейрогенной боли (ХНБ) (n = 21); группа М — стандартная подкожная трансплантация меланомы B16/F10 (n = 63); группа ХНБ + М — меланому B16/F10 трансплантировали через 3 недели после создания ХНБ (n = 63).

Экспериментальных животных получали из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (филиал «Андреевка», Московская

область), также использовали штамм мышинной меланомы B16/F10 из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Меланому B16/F10 животным трансплантировали подкожно под правую лопатку в объеме 0,5 мл взвеси клеток в разведении 1:10 в физиологическом растворе. Модель ХНБ [7] воспроизводили наложением лигатуры на седалищный нерв двух задних лап животного под ксила-золетиловым наркозом: премедикация — Ксилазин (препарат Ксила) внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела (по инструкции), затем через 10 мин Золетил-50 в дозе 10 мг на 100 г массы. Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики.

Животных групп М и ХНБ + М декапитировали на гильотине после трансплантации меланомы B16/F10 в следующие сроки: 1-я неделя, 2-я неделя и 3-я неделя роста меланомы. Животных с ХНБ декапитировали через 3 недели после воспроизведения модели ХНБ, одновременно декапитировали интактных животных. У животных иссекали кожу (на максимально удаленном расстоянии от опухолевого узла) и опухоль. Извлекали мозг, печень, почки, сердце. Митохондрии выделяли с применением хладагентов и дифференциального центрифугирования на высокоскоростной рефрижераторной центрифуге Avanti J-E (BECMAN COULTER, USA) [8]. Ткани промывали ледяным 0,9 %-м 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 сахараза, 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, 2-е и 3-е центрифугирование осуществляется при 20 000 g, 20 мин, температура — 0–2 °С. Между центрифугированием проводили процедуру ресуспендирования осадка митохондрий в среде выделения. Митохондрии дополнительно очищали от лизосом, пероксисом, меланосом и т. п., центрифугируя в 23 %-м градиенте Перколл. Суспензию субклеточных структур наслаивали на градиент Перколл, центрифугировали 15 мин при 21 000 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 15 000 g, температура — 0–2 °С. Митохондриальные образцы (концентрация белка — 4–6 г/л) до анализа хранили при –80 °С в среде выделения, далее методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли концентрацию цитохрома С (нг/мг белка)

(Bioscience, Austria) и биуретовым методом концентрацию белка (мг/мл) («Ольвекс Диагностикум», Россия) на анализаторе ChemWell (Awareness Technology INC, USA).

Статистика: программа «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 ($M \pm m$), где M — среднее арифметическое значение, m — стандартная ошибка среднего, за уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$. Полученные результаты статистически обрабатывали с соблюдением общих рекомендаций для медицинских исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что ХНБ вызывает повышение уровня цитохрома С в митохондриях мозга — 1,9 раза и печени — 1,4 раза ($p < 0,05$). Не найдено изменения показателя под влиянием ХНБ в митохондриях сердца, почек и кожи (таблица).

Через 1 неделю стандартного роста меланомы B16/F10 обнаружено повышение уровня цитохрома С в митохондриях мозга и печени в 2,7 и 1,7 раза ($p < 0,05$). Уровень цитохрома С в митохондриях сердца, почек и кожи в этот срок исследования статистически значимо не изменялся. Через 2 недели стандартного опухолевого роста в митохондриях мозга и печени уровень цитохрома С снизился относительно предыдущего срока исследования в 3 и 2,2 раза и в обоих случаях был на уровне интактных величин. В митохондриях сердца, почек и кожи в этот срок исследования показатель статистически значимо не изменялся. Через 3 недели стандартного роста меланомы в митохондриях печени и кожи уровень цитохрома С был ниже интактных значений в среднем в 1,7 раза ($p < 0,05$). В митохондриях мозга, сердца и почек значения цитохрома С статистически значимо не менялись.

В митохондриях меланомы на протяжении всего стандартного роста опухоли уровень цитохрома С был ниже интактных величин кожи: через 1 неделю — в 2,5 раза, через 2 недели — в 4,5 раза, через 3 недели — в 4,6 раза соответственно.

При стимулированном росте меланомы (ХНБ + М) в митохондриях мозга уровень цитохрома С был ниже соответствующего контроля (Кб) через 1 неделю — в 2,2 раза, через 2 недели — в 3,2 раза, через 3 недели — в 4,8 раза соответственно. В митохондриях печени уровень цитохрома С через 1 и 2 недели опыта был в среднем в 1,9 раза ниже соответствующего показателя Кб, а через 3 недели — в 4,7 раза. В митохондриях сердца первые

Динамика уровня цитохрома С (нг/мг белка) в митохондриях органов самок мышей при стандартном и стимулированном росте меланомы B16/F10

Dynamics of cytochrome C levels (ng / mg protein) in cell mitochondria in various organs of female mice with standard and stimulated B16/F10 melanoma growth

Группа	Мозг	Печень	Сердце	Почки	Кожа	Опухоль
Интактная	(5,05±0,33)	(8,458±0,47)	(4,611±0,57)	(14,59±0,67)	(13,196±1,06)	—
ХНБ (Кб)	(9,72±0,36) ¹ ; p ¹ =0,0000	(11,775±0,56) ¹ ; p ¹ =0,0007	(6,18±0,59)	(14,98±0,74)	(14,24±1,21)	—
М 1-я неделя	(13,698±0,83) ¹ ; p ¹ =0,0000	(14,748±0,75) ¹ ; p ¹ =0,0000	(5,11±0,59)	(15,13±0,74)	(14,61±1,38)	(5,24±0,75) ¹ ; p ¹ =0,0000
М 2-я неделя	(4,495±0,56) ³ ; p ³ =0,0000	(6,587±0,61) ³ ; p ³ =0,0000	(3,81±0,47)	(15,29±0,70)	(13,613±1,34)	(2,92±0,3) ^{1,3} ; p ¹ =0,0000; p ³ =0,0138
М 3-я неделя	(5,613±0,43)	(4,96±0,37) ¹ ; p ¹ =0,0000	(4,924±0,43)	(11,62±0,54)	(7,676±0,66) ^{1,3} ; p ¹ =0,0008; p ³ =0,0018	(2,85±0,26) ¹ ; p ¹ =0,0000
ХНБ + М 1-я неделя	(4,334±0,45) ² ; p ² =0,0000	(6,017±0,33) ² ; p ² =0,0000	(7,62±0,47)	(14,88±0,77)	(9,89±0,69) ² ; p ² =0,0000	(0,93±0,05) ² ; p ² =0,0000
ХНБ + М 2-я неделя	(3,01±0,37) ² ; p ² =0,0000	(6,42±0,64) ² ; p ² =0,0000	(2,934±0,47) ^{2,3} ; p ² =0,0010 p ³ =0,0000	(13,23±0,68)	(12,51±1,02)	(1,38±0,08) ^{2,3} ; p ² =0,0000; p ³ =0,0006
ХНБ + М 3-я неделя	(2,022±0,28) ² ; p ² =0,0000	(2,513±0,49) ^{2,3} ; p ² =0,0000; p ³ =0,0004	(2,742±0,36) ² ; p ² =0,0003	(13,213±0,67)	(7,56±0,72) ^{2,3} ; p ² =0,0004; p ³ =0,0018	(1,61±0,14) ² ; p ² =0,0000

¹ — статистически значимо по отношению к показателю в интактной группе; ² — статистически значимо по отношению к показателю в контрольной группе; ³ — статистически значимо по отношению к показателю на предыдущем сроке исследования.

изменения отмечены через 2 недели — в 2,1 раза ниже значений Кб и через 3 недели — в 2,3 раза. В митохондриях кожи уровень цитохрома С через 1 неделю роста меланомы был снижен в 1,4 раза (p<0,05), а через 3 недели — в 1,9 раза. В процессе стимулированного роста меланомы не обнаружено изменения уровня маркера в митохондриях почек.

При стимулированном росте опухоли в митохондриях меланомы отмечен низкий уровень цитохрома С на протяжении всего опыта: через 1 неделю — ниже величин Кб в коже в 15,3 раза, через 2 недели — в 10,3 раза, через 3 недели — в 8,8 раза соответственно.

Таким образом, обнаружена различная динамика цитохрома С при стандартном и стимулированном росте меланомы B16/F10 в митохондриях мозга, печени, сердца и однонаправленная в митохондриях меланомы.

Цитохром С участвует в балансе клеточных функций, связанных с жизнью и смертью. Обе основные функции цитохрома С — дыхание, приводящее к выработке энергии, и апоптоз, способствующий гибели клеток, — регулируются для удовлетворения специфических потребностей тканей и органов [9]. Поэтому цитохром С имеет тканеспецифические сайты фосфорилирования, координирующие дыхание, апоптоз, а также выработку и удаление АФК.

Определены разнонаправленные изменения уровня цитохрома С в митохондриях исследованных органов мышей при стандартном росте меланомы. В начале развития неоплазмы митохондрии

мозга и печени отреагировали повышением уровня маркера и дальнейшим снижением до интактных величин и ниже. Не найдено изменения уровня цитохрома С в митохондриях сердца и почек на протяжении всего срока исследования при стандартном росте меланомы. В коже падение маркера отмечено только на терминальном этапе стандартного роста меланомы. Мы не склонны в данном случае связывать найденные изменения уровня цитохрома С в митохондриях с его ролью в апоптозе. Скорее всего, эти колебания отражают изменение дыхания, приводящее к выработке энергии. Например, специфичное для печени фосфорилирование тирозином 48 (Tyr48) блокирует апоптоз, который является «разумным», учитывая, что клетки печени подвергаются воздействию токсичных молекул, главным образом в результате поглощения пищи [10]. Следовательно, эти клетки имеют более высокий порог устойчивости к апоптозу, подтверждая концепцию, что Tyr48 является важным регуляторным сайтом для апоптоза [11]. Напротив, фосфорилирование треонином 28 (Thr28), наблюдаемое в почках, приводит к тому же уровню апоптотической активности, что и цитохром С, предполагая, что механизм подавления апоптоза не требуется в этом органе [12]. Тем не менее фосфорилирование Thr28 и специфическое для сердца и мозга Tyr97 косвенно защищают ткани от повреждения АФК путем снижения митохондриального дыхания. Однако во время клеточного стресса, который обнаруживается при патологических состояниях во многих органах, включая сердце, почки и

мозг, цитохром С становится дефосфорилированным, что приводит к гиперполяризации мембраны и последующему взрыву АФК, увеличивая повреждение ткани [9, 13].

Хроническую нейрогенную боль можно рассматривать как мощный стрессорный фактор, приводящий к изменению как метаболизма организма, так и скорости развития злокачественного процесса [7]. В настоящем исследовании показано, что ХНБ вызывала увеличение уровня цитохрома С в митохондриях мозга, печени и сердца. Сердце и мозг являются высокоаэробными тканями и полностью зависят от энергии, выделяемой при окислительном фосфорилировании [9]. Следовательно, изменение уровня цитохрома С в митохондриях этих органов отражает усиление функции дыхания и фосфорилирования. Вместе с тем интересен тот факт, что при стимулированном росте меланомы произошло прогрессивное падение уровня цитохрома С в митохондриях всех органов, за исключением почек.

Особо следует остановиться на содержании цитохрома С в митохондриях меланомы. Показано крайне низкое содержание маркера при стандартном росте опухоли и еще более низкое — при стимулированном. Вероятно, такое состояние митохондрий косвенно свидетельствовало о защите ткани опухоли от повреждения АФК путем снижения митохондриального дыхания. И с этих позиций применение экзогенного цитохрома С в эксперименте и клинике для замедления развития злокачественной опухоли представляется целесообразным [14, 15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стандартный рост опухоли на начальном этапе способствует активации митохондриального дыхания в мозге и печени через накопление цитохрома С, а терминальный этап характеризуется подавлением митохондриального дыхания в печени и коже. Митохондрии сердца и почек проявляют определенную стабильность в отношении процессов митохондриального дыхания при стандартном росте опухоли в организме, поскольку уровень цитохрома С не меняется на всем протяжении эксперимента, соответственно, и функция митохондриального дыхания по данному показателю достаточно стабильна. В митохондриях клеток меланомы на всех этапах стандартного роста опухоли низкий уровень цитохрома С указывает на устойчивое подавление процессов дыхания. Еще большее подавление процессов дыхания за счет снижения уровня цитохрома С в митохондриях меланомы определяется при стимулированном росте опухоли посредством хронической нейрогенной боли. Кроме того, в митохондриях всех изучаемых органов на этапах стимулированного роста опухоли изменения уровня цитохрома С всегда были направлены в сторону снижения митохондриального дыхания. Следовательно, стимулированный

хронической нейрогенной болью злокачественный процесс подавляет митохондриальное дыхание через цитохром С не только в опухоли, но и во внутренних органах. Данный факт позволяет рассмотреть возможность применения экзогенного цитохрома С в эксперименте и клинике на любых этапах развития опухоли, а также при сопутствующей хронической нейрогенной боли.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов. Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено на заседании Биоэтического комитета по работе с животными ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 31.05.2018 г., протокол Этического комитета № 2. Все авторы — участники исследования подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information. Animal studies were performed in compliance with humanity principles set in the European Community Council Directive (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki, as well as in the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals and order of the Ministry of Health of Russia dated June 19, 2003 No. 267 «On the approval of the rules of laboratory practice». The study was approved by the bioethics committee for animal use at National Medical Research Centre for Oncology on May 31, 2018, ethics committee protocol No. 2. All participating authors gave their written informed consent for the study.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wan J., Kalpage H. A., Vaishnav A., Liu J. et al. Regulation of Respiration and Apoptosis by Cytochrome c Threonine 58 Phosphorylation // *Scientific reports*. — 2019. — Vol. 9, № 1. — P. 15815. Doi: 10.1038/s41598-019-52101-z.
2. Li K., Li Y., Shelton J. M. et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis // *Cell*. — 2000. — Vol. 101. — P. 389–399. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)80849-1.
3. Kagan V. E., Bayir H. A., Belikova N. A. et al. Cytochrome c/cardiophilin relations in mitochondria: a kiss of death // *Free Radic. Biol. Med.* — 2009. — Vol. 46, № 11. — P. 1439–53. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.

4. Rajagopal B. S., Edzuma A. N., Hough M. A. et al. The hydrogen-peroxide-induced radical behaviour in human cytochrome c-phospholipid complexes: implications for the enhanced pro-apoptotic activity of the G41S mutant // *Biochem. J.* – 2013. – Vol. 456, № 3. – P. 441–452. Doi: 10.1042/BJ20130758.

5. Josephine S. Modica-Napolitano, Keshav K. Singh. Mitochondrial dysfunction in cancer // *Mitochondrion*. – 2004. – Vol. 45, № 6. – P. 755–762. Doi: 10.1016/j.mito.2004.07.027.

6. Elena Herbers, Nina J Kekäläinen, Anu Hangan et al. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression // *Mitochondrion*. – 2019. – Vol. 44. – P. 85–92. Doi: 10.1016/j.mito.2018.01.004.

7. Кит О. И., Котиева И. М., Франциянц Е. М. и др. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы в16/f10 у самцов мышей // *Известия высших учеб. завед. Северо-Кавказ. регион. Сер.: Естеств. науки.* – 2019. – Т. 201. – С. 106–111.

8. Егорова М. В., Афанасьев С. А. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы // *Сибир. мед. журн.* – 2011. – Т. 26, № 1–1. – С. 22–28.

9. Kalpage H. A., Bazylianska V., Recanati M. A. et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2018. – Vol. 33, № 2. – P. 1540–1553. Doi: 10.1096/fj.201801417R.

10. García-Heredia J. M., Díaz-Quintana A., Salzano M. et al. Tyrosine phosphorylation turns alkaline transition into a biologically relevant process and makes human cytochrome c behave as an anti-apoptotic switch // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2011. – Vol. 16. – P. 1155–1168. Doi: 10.1007/s00775-011-0804-9.

11. Moreno-Beltrán B., Guerra-Castellano A., Díaz-Quintana A., Del Conte R., García-Mauriño S. M., Díaz-Moreno S., González-Arzola K., Santos-Ocaña C., Velázquez-Campoy A., De la Rosa M. A., Turano P., Díaz-Moreno I. Structural basis of mitochondrial dysfunction in response to cytochrome c phosphorylation at tyrosine 48 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2017. – Vol. 114, № 15. – P. 3041–3050. Doi: 10.1073/pnas.1618008114.

12. Mahapatra G., Varughese A., Ji Q. Phosphorylation of Cytochrome c Threonine 28 Regulates Electron Transport Chain Activity in Kidney. IMPLICATIONS FOR AMP KINASE // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 292, № 1. – P. 64–79. Doi: 10.1074/jbc.m116.744664.

13. Guerra-Castellano A., Díaz-Quintana A., Pérez-Mejías G. et al. Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2018. – Vol. 115, № 31. – P. 7955–7960. Doi: 10.1073/pnas.1806833115.

14. Патент RU № 2559086 C1: Способ предотвращения развития злокачественного процесса в эксперименте / О. И. Кит, Е. М. Франциянц, И. В. Каплиева и др. – 2015. – Опубл. 10.08.2015.

15. Патент RU № 2123342 C1: Способ лечения рака легкого / Ю. С. Сидоренко, С. З. Карташов, Е. М. Франциянц. – 1998. – Опубл. 20.12.1998.

REFERENCES

1. Wan J., Kalpage H. A., Vaishnav A., Liu J., Lee I., Mahapatra G., Turner A. A., Zurek M. P., Ji Q., Moraes C. T., Recanati M. A., Grossman L. I., Salomon A. R., Edwards B., Hüttemann M. Regulation of Respiration and Apoptosis by Cytochrome c Threonine 58 Phosphorylation. *Scientific reports*. 2019;9(1):15815. Doi: 10.1038/s41598-019-52101-z.

2. Li K., Li Y., Shelton J. M., Richardson J. A., Spencer E., Chen Z. J., Wang X., Williams R. S. Cytochrome c deficiency

causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis // *Cell*. 2000;(101):389–399. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)80849-1.

3. Kagan V. E., Bayir H. A., Belikova N. A., Kapralov O., Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Jiang J., Stoyanovsky D. A., Wipf P., Kochanek P. M., Greenberger J. S., Pitt B., Shvedova A. A., Borisenko G. Cytochrome c/cardioplipin relations in mitochondria: a kiss of death // *Free Radic Biol Med*. 2009;46(11):1439–1453. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.

4. Rajagopal B. S., Edzuma A. N., Hough M. A., Blundell K. L., Kagan V. E., Kapralov A. A., Fraser L. A., Butt J. N., Silkstone G. G., Wilson M. T., Svistunenko D. A., Worrall J. A. The hydrogen-peroxide-induced radical behaviour in human cytochrome c-phospholipid complexes: implications for the enhanced pro-apoptotic activity of the G41S mutant // *Biochem. J.* 2013;456(3):441–452. Doi: 10.1042/BJ20130758.

5. Josephine S. Modica-Napolitano, Keshav K. Singh. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*. 2004; 4(5–6):755–762. Doi: 10.1016/j.mito.2004.07.027.

6. Elena Herbers, Nina J Kekäläinen, Anu Hangan et al. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression // *Mitochondrion*. 2019;(44):85–92. Doi:10.1016/j.mito.2018.01.004.

7. Кит О. И., Котиева И. М., Франциянц Е. М. et al. Influence of chronic neuropathic pain on the course of malignant b16/f10 melanoma in male mice // *Bulletin of higher educational institutions. North Caucasus region. Natural sciences. Severo-Kavkazskij region. Seriya: Estestvennye nauki*. 2019; 1(201):106–111. (In Russ.).

8. Egorova M. V., Afanasiev S. A. Isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and hupman: modern methodical approaches // *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal – Siberian Medical Journal*. 2011;26(1–1):22–28. (In Russ.).

9. Kalpage H. A., Bazylianska V., Recanati M. A. et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2018;33(2):1540–1553. Doi: 10.1096/fj.201801417R.

10. García-Heredia J. M., Díaz-Quintana A., Salzano M. et al. Tyrosine phosphorylation turns alkaline transition into a biologically relevant process and makes human cytochrome c behave as an anti-apoptotic switch // *J. Biol. Inorg. Chem*. 2011;(16):1155–1168. Doi: 10.1007/s00775-011-0804-9.

11. Moreno-Beltrán B., Guerra-Castellano A., Díaz-Quintana A. et al. Structural basis of mitochondrial dysfunction in response to cytochrome c phosphorylation at tyrosine 48 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017;114(15):3041–3050. Doi: 10.1073/pnas.1618008114.

12. Mahapatra G., Varughese A., Ji Q. et al. Phosphorylation of Cytochrome c Threonine 28 Regulates Electron Transport Chain Activity in Kidney. IMPLICATIONS FOR AMP KINASE // *J. Biol. Chem*. 2016;292(1):64–79. Doi: 10.1074/jbc.m116.744664.

13. Guerra-Castellano A., Díaz-Quintana A., Pérez-Mejías G. et al. Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115(31):7955–7960. Doi: 10.1073/pnas.1806833115.

14. Patent RU № 2559086 C1. Sposob predotvrashcheniya razvitiya zlokachestvennogo processa v eksperimente / Кит О. И., Франциянц Е. М., Каплиева И. В. et al. – 2015. Опубл. 10.08.2015. (In Russ.).

15. Patent RU № 2123342 C1. Sposob lecheniya raka legkogo / Sidorenko Yr. S., Kartashov S. Z., Franciyanc E. M. – 1998. Опубл. 20.12.1998. (In Russ.).

Информация об авторах

Франциянц Елена Михайловна, доктор биологических наук, профессор, заместитель генерального директора по научной работе, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии (г. Ростов-на-Дону, Россия) ORCID ID: 0000-0003-3618-6890; **Нескубина Ирина Валерьевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии (г. Ростов-на-Дону, Россия), ORCID: 0000-0002-7395-3086; **Черярина Наталья Дмитриевна**, врач-лаборант лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии (г. Ростов-на-Дону, Россия), ORCID: 0000-0002-3711-8155; **Сурикова Екатерина Игоревна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии (г. Ростов-на-Дону, Россия), ORCID: 0000-0002-4318-7587; **Немашкалова Людмила Анатольевна**, научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии (г. Ростов-на-Дону, Россия), ORCID: 0000-0003-2713-8598.

Information about authors

Frantsiyants Elena M., Dr. of Sci. (Biol.), Professor, Deputy General Director for Science, National Medical Research Centre for Oncology (Rostov-on-Don, Russia), ORCID: 0000-0003-3618-6890; **Neskubina Irina V.**, Cand. of Sci. (Biol.), Senior Research Fellow at the Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology (Rostov-on-Don, Russia), ORCID: 0000-0002-7395-3086; **Cheryarina Natalia D.**, Laboratory Doctor at the Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology (Rostov-on-Don, Russia), ORCID: 0000-0002-3711-8155; **Surikova Ekaterina I.**, Cand. of Sci. (Biol.), Senior Research Fellow at the Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology (Rostov-on-Don, Russia), ORCID: 0000-0002-4318-7587; **Nemashkalova Lyudmila A.**, Research Fellow at the Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology (Rostov-on-Don, Russia), ORCID: 0000-0003-2713-8598.