

*О.И. Кит, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, И.В. Каплиева, И.М. Котиева,
Л.К. Трештаки, Ю.С. Сидоренко*

Влияние хронической нейрогенной боли на нейромедиаторные системы головного мозга у самцов мышей в динамике роста злокачественной меланомы

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

Известно, что биогенные амины (БА) участвуют в злокачественном росте, их уровень изменяется в ЦНС при болевом воздействии, однако исследований о сочетанном влиянии хронической боли (ХБ) и онкопатологии на динамику БА в головном мозге не проводилось.

Цель: изучить особенности БА баланса в коре головного мозга в динамике роста меланомы, воспроизведенной на фоне хронической нейрогенной боли.

Материалы и методы. Работа выполнена на 64 самцах мышей линии C57Bl/6, весом 22-24 гр. Животным основной группы переносили меланому B16/F10 под кожу спины через 2 недели после перевязки седалищных нервов. Группой сравнения служили мыши с меланомой без хронической боли. Уровни БА: адреналина, норадреналина, дофамина (ДА), серотонина (5-НТ), гистамина, а также 5-ОИУК определяли методом ИФА.

Результаты. У мышей с хронической нейрогенной болью (ХНБ) в мозге происходит изменение уровня адреналина. Рост и развитие меланомы у самцов мышей сопровождается увеличением в мозге содержания адреналина и норадреналина и снижением дофамина и серотонина. При этом имеется сходство в направленность сдвигов нейромедиаторного фона при развитии меланомы на фоне ХНБ и без неё.

Заключение. Вероятно, одним из факторов, усиливающих агрессивность течения перевивной меланомы B16/F10 у самцов основной группы, является влияние ХНБ на нейротрансмиттерный баланс в ЦНС.

Ключевые слова: меланома B16/F10, хроническая боль; мозг; серотонин, гистамин, дофамин, норадреналин, адреналин, мыши линии C57Bl/6

Введение

Нейротрансмиттерная передача сигналов в ЦНС является одним из способов координации поведения клеток всего организма на тканевом

уровне [1]. Пролиферация, дифференцировка, миграция, апоптоз и другие функции клеток обычно регулируются с помощью информационных сигналов из разных областей мозга [2]. Одно из представлений о раке заключается в том, что — это нарушение координации сложных сигнальных путей, которые обычно удерживают клетки от онкогенеза и направляют к правильной анатомической структуре [3]. Рак можно понимать как нарушение связи клеток с регулирующими структурами, либо потому, что сигналы перестают поступать из мозга, либо потому, что клетки становятся невосприимчивыми к его информационному влиянию. Восстановление правильных морфогенетических сигналов и форсирование клеточной коммуникации с помощью набора сигналов может стать путем для нормализации / перепрограммирования опухоли [4]. Меланома кожи — чрезвычайно агрессивная опухоль, развивающаяся из меланоцитов кожи, имеющих эктодермальное происхождение из нервного гребня, аналогично клеткам головного и спинного мозга, мозгового вещества надпочечников, радужной оболочке глаза [5]. Клетки кожи, а также меланомы, способны к синтезу и метаболизму практически полного спектра нейротрансмиттеров, аналогично нейронам мозга [6]. Известна важная роль биогенных аминов в реализации хронической нейрогенной боли (ХНБ). Так, ХНБ после лигирования седалищного нерва вызывает неадекватную нейротрансмиссию серотонина (5-НТ) в головном мозге, увеличивает экспрессию серотонинового транспортера (SERT), уменьшает продукцию 5-НТ и изменяет экспрессию серотониновых рецепторов [7]. Нейротрансмиттеры, такие как серотонин, катехоламины и другие являются мощными митогенами и оказывают множество других эффектов на транскрипцию, цитоскелет и клеточный метаболизм. Таким образом, динамика нейротрансмиттеров через клеточные мембраны является важной связью между биоэлектрическими состояниями и поведением клеток, которые они контролируют. Недавние работы показали, что эта связь верна и за пределами

ЦНС [8]. Передача сигналов нейротрансмиттеров в биологии рака привлекла внимание к таким молекулам, как глутамат, глицин, ацетилхолин, ГАМК и дофамин [9, 10]. Некоторые из наиболее интересных данных касаются серотонина [11, 12]. В настоящее время существуют данные, свидетельствующие о том, что хроническая нейрогенная боль, независимо от причины, связана с изменениями функции мозга, особенно в отношении восприятия боли и другой сенсорной информации [13].

Учитывая широкую распространенность хронических болевых синдромов среди населения, данное коморбидное состояние становится важным и слабо изученным фактом, способным оказывать влияние на развитие различных злокачественных патологий, в том числе и меланому кожи, что практически не исследовано. Тот факт, что ХНБ является болезнью не только первичных сенсорных нейронов и спинного мозга, но и головного мозга, вызывая в нем функциональные и структурные изменения, а также влияя на другие функции, такие как эмоции, мотивация и память делает подобные исследования особенно актуальными [14, 15].

Целью исследования явилось изучение влияние хронической нейрогенной боли на содержание биогенных аминов и метаболита 5-НТ — 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) в коре головного мозга самцов мышей, в динамике роста экспериментальной меланомы B16/F10.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах мышей линии C57BL/6 ($n=64$) 8 недельного возраста с начальной массой 23-24 г, полученных из ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). Опухолевый штамм мышшиной меланомы B_{16}/F_{10} получен из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животные были распределены на группы: две контрольные — интактные мыши (7 шт.) и мыши с воспроизведением модели хронической боли (7 шт.), группу сравнения — мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы B_{16}/F_{10} (22 шт.) и основную группу — мыши, которым меланому B_{16}/F_{10} перевивали через 2 недели после создания модели хронической боли (28 шт.).

Мышам основной группы производили перевязку седалищного нерва с 2-х сторон под ксила-золетилловым наркозом, через 2 недели после заживления операционной раны животным основной и группы сравнения перевивали меланому по стандартной методике. Контрольными для основной группы животных служили мыши с 2-х сторонней перевязкой седалищного нерва без онкопроцесса, для группы сравнения — интактные мыши. Контрольных

животных, а также мышей из основной группы и группы сравнения через 1, 2 и 3 недели эксперимента декапитуировали на гильотине. Биогенные амины: адреналин (А), норадреналин (НА), ДА, 5-НТ, Г, и 5-ОИУК исследовали методом ИФА (IBLInternational, Germany).

Результаты и обсуждение

Ранее было показано модифицирующее влияние ХНБ на рост перевивной меланомы B16/F10 у мышей обоего пола, которое заключалось в меньшей продолжительности жизни, более раннем выходе опухоли и более активном метастазировании [16, 17]. При этом у самок установлено нарушение нейромедиаторного баланса мозга [18]. Результаты изучения уровня биогенных аминов в коре головного мозга самцов мышей с перевивной меланомой под влиянием ХНБ представлены в табл. 1.

Хроническая нейрогенная боль вызывала в коре головного мозга самцов мышей (контроль) статистически значимое снижение концентрации адреналина в 1,6 раза ($p<0,05$). На содержание 5НТ, 5ОИУК, норадреналина, гистамина и дофамина в коре мозга у самцов хроническая нейрогенная боль влияния не оказала. Однако, под влиянием хронической нейрогенной боли установлено нарушение в балансе адренергической и норадренергической трансмиссии в сторону повышения роли норадреналина, а также изменение баланса стрессреализующих и стресслимитирующих систем (табл. 2). Статистически значимо в 1,6 раза повысилось соотношение норадреналина к адреналину и снизилось в 1,7 раза отношение адреналина к серотонину ($p<0,05$).

В динамике роста меланомы у самцов основной группы на фоне хронической нейрогенной боли отмечено статистически значимое увеличение относительно соответствующего контроля уровня адреналина через 1-2 недели в 2 раза, а к концу эксперимента снижение в 1,4 раза по сравнению с предыдущим этапом, оставаясь выше контроля в 1,4 раза ($p<0,05$). Кроме того только через 1 неделю у самцов основной группы в мозге повысилось содержание норадреналина в 1,3 раза ($p<0,05$), на остальных этапах его уровень не отличался от контроля, и только через 3 недели — снизилось в 1,3 раза ($p<0,05$) содержание дофамина. Что касается гистамина, то его уровень в мозге самцов основной группы через 2 недели повысился в 1,7 раза, а через 3 недели снизился в 1,7 раза по сравнению с соответствующим контролем. Уровень серотонина в мозге у самцов основной группы статистически значимо снизился через 1 и 3 недели в 1,6 раза и в 2 раза соответственно на фоне некоторого падения активности метаболизма, что выражалось в понижении

Таблица 1. Уровень биогенных аминов и 5-ОИУК в мозге самцов мышей с меланомой В16/ F10 и меланомой, сочетанной с хронической болью

Группы животных	гистамин нг/г ткани	адреналин нг/г ткани	норадрена-лин нг/г ткани	дофамин нг/г ткани	серотонин нг/г ткани	5ОИУК мг/г ткани
интактные животные						
Интактные	27,64±2,3	5,1±0,6	17,68±1,9	32,7±2,8	0,62±0,05	0,45±0,08
контроль	27,5±2,9	3,13±0,31	17,0±1,4	33,8±3,2	0,65±0,06	0,42±0,04
1 неделя роста меланомы						
группа сравнения	25,3±2,6	2,4±0,32	18,1±1,7	16,6±1,92	0,47±0,052	0,28±0,032
основная группа	33,2±3,13	6,5±0,82,3	22,2±2,42	30,6±3,23	0,39±0,042	0,30±0,042
2 неделя роста меланомы						
группа сравнения	18,7±1,62	14,6±1,52	52,3±5,42	25,6±2,72	0,69±0,07	0,59±0,06
основная группа	46,13±3,92,3	6,3±0,72,3	16,86±1,33	27,96±3,9	0,65±0,06	0,31±0,032,3
3 неделя роста меланомы						
группа сравнения	25,4±2,3	21,1±1,92	37,2±3,32	4,0±0,52	0,42±0,042	0,17±0,022
основная группа	16,5±1,42,3	4,47±0,63	20,7±1,83	26,6±2,72,3	0,33±0,032,3	0,35±0,043

Примечание: ¹ — достоверные отличия между контрольными группами; ² — достоверные отличия относительно соответствующего контроля; ³ — достоверные отличия по отношению к показателям группы сравнения

Таблица 2. Соотношение биогенных аминов в мозге самцов мышей с меланомой В16/F10 и меланомой, сочетанной с хронической болью

Группы	НА/А	НА/ДА	А/С
интактные животные			
интактная ткань	3,47±0,4	0,54±0,6	8,23±0,9
контроль с болью	5,43±0,51	0,50±0,05	4,82±0,51
1 неделя роста меланомы			
группа сравнения	7,54±0,82	1,1±0,22	5,1±0,72
основная группа	5,14±0,63	1,1±0,32	16,7±1,52,3
2 неделя роста меланомы			
группа сравнения	3,58±0,44	2,04±0,22,4	21,2±1,92,4
основная группа	2,68±0,32,3,4	0,60±0,073,4	9,69±1,12,3,4
3 неделя роста меланомы			
группа сравнения	1,76±0,22,4	9,3±0,72,4	50,2±4,32,4
основная группа	4,63±0,53,4	0,78±0,082,3	13,5±1,62,3,4

Примечание: ¹ — достоверные отличия между контрольными группами; ² — достоверные отличия относительно соответствующего контроля; ³ — достоверные отличия по отношению к показателям группы сравнения

уровня 5ОИУК через 1 и 2 недели в среднем в 1,4 раза. При этом на этапе через 2 недели концентрация серотонина в мозге самцов основной группы не отличалась от показателей контроля и нормы. Коэффициент соотношения норадреналина к адреналину снижался в 2 раза только через 2 недели, тогда как НА/ДА оказался повышенным через 1 и 3 недели в 2,2 и 1,6 раза соответственно, демонстрируя активацию норадренергических процессов. На всех этапах эксперимента соотношение адреналина к серотонину превышало показатели контроля: через 1 неделю в 3,5 раза, через две недели в 2 раза и через три недели в 2,8 раза, что соответствовало снижению активности серотонинергической системы в мозге самцов основной группы в динамике роста меланомы на фоне ХНБ.

У самцов группы сравнения уровень гистамина в мозге снизился в 1,5 раза только в момент выхода опухоли, через 2 недели на остальных этапах оставаясь в норме. В тоже время через 2-3 недели уровень адреналина и норадреналина в мозге возрос: А в 2,9 раза и в 4,1 раза соответственно, норадреналина в 3 раза и 2,1 раза соответственно, содержание же дофамина, напротив, снизилось через 1 неделю в 2 раза, через 2 недели в 1,3 раза и через 3 недели в 8,2 раза. В результате соотношение НА/А повышалось в 2,2 раза по сравнению с показателями у интактных животных, нормализуясь через 2 недели и снижаясь только через 3 недели в 2 раза. Коэффициент соотношения НА/ДА, повышался, по сравнению с показателями нормы: через 1-2 недели в 2 и 3,8 раза, через 3 недели

в 17,2 раза по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$).

Уровень серотонина в мозге самцов группы сравнения оказался снижен в 1,3 раза и в 1,5 раза через 1 и 3 недели, несмотря на низкий метаболизм — концентрация 5ОИУК в мозге оказалась ниже нормы в 1,6 раза и в 2,6 раза соответственно. На этапе через 2 недели, уровень 5НТ возрос до нормы, кроме того, повысилось содержание и 5ОИУК, что продемонстрировало явную активизацию серотонинергических процессов мозга. Коэффициент соотношения адреналина к серотонину у самцов группы сравнения, в отличие от основной группы, повышался только начиная со второй недели, через 1 неделю установлено статистически значимое снижение в 1,6 раза, по сравнению с нормой. Через 2-3 недели эксперимента соотношение А/5НТ в мозге самцов группы сравнения повышалось в 2,6 раза и в 6,1 раза соответственно.

Обсуждение

В целом можно сказать, что хроническая нейрогенная боль, так же как и перевивка меланомы В16/Ф10, оказала стрессорное влияние. Сочетанное воздействие ХНБ и перевивки меланомы В16/Ф10 на нейромедиаторный фон мозга заключалось в том, что через 1 неделю после перевивки меланомы, на этапе «выхода» опухоли, по сравнению с контролем, возрастало содержание адреналина и норадреналина, снижался уровень серотонина и 5ОИУК, но отсутствовало изменение концентрации гистамина и дофамина. Известно, что моноаминовый путь, особенно НА-ергическая и серотонинергическая передача, является основным компонентом системы эндогенной антиноцицептивной системы [19]. У самцов основной группы в динамике роста меланомы не установлена активация норадренергической системы и выявлено угнетение серотонинергического звена. Истощение моноаминов в ЦНС усиливает восприятие боли за счет уменьшения эффективности эндогенной антиноцицептивной системы [20]. Изменения содержания нейротрансмиттеров, в ответ на различные эндогенные и экзогенные факторы, способны модулировать биологическое поведение новообразования [21, 22]. Вероятно, одним из факторов, усиливающим агрессивность течения перевивной меланомы В16/Ф10 у самцов основной группы является влияние ХНБ на нейротрансмиттерный баланс в ЦНС.

Конфликт интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reisoli E., De Lucchini S., Nardi I., Ori M. Serotonin 2B receptor signaling is required for craniofacial morphogenesis and jaw joint formation in *Xenopus* // *Development*. – 2010.- v 137.- p. 2927–2937. Doi.10.1242/dev.041079.
2. Levin M. Morphogenetic fields in embryogenesis, regeneration, and cancer: Non-local control of complex patterning // *Biosystems*. – 2012.- v109. — p. 243–261. Doi.10.1016/biosystems.2012.04.005.
3. Chernet B, Levin M. Endogenous voltage potentials and the microenvironment: bioelectric signals that reveal, induce and normalize cancer // *J Clin Exp Oncol*. – 2013.- Suppl 1. — pii: S1-002. Doi 10.4172/2324-9110.S1-002.
4. Tuszyński, J., Tilli, T. M., & Levin, M. (2017). Ion Channel and Neurotransmitter Modulators as Electroceutical Approaches to the Control of Cancer // *Current pharmaceutical design*.- 23(32).- p.4827–4841. doi:10.2174/1381612823666170530105837.
5. Барабой В. А. Структура, биосинтез меланинов, их биологическая роль перспективы применения // *Успехи совр. биологии*. — 2001. — Т.121, № 1. — С.36-46. [Baraboj V. A. Structure, biosynthesis of melanins, their biological role, application prospects // *Uspekhi sovremennoj biologii* — 2001. — Т.121, № 1. — С.36-46. (In Russ)].
6. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system // *Adv Anat Embryol Cell Biol*. – 2012. — 212.- p. 1-115.
7. Franciane B., Ferreira Alarc n T. A., Cordova M. M., Dombroski P. A., da Cunha C., do Espiritu Santo C. K., Poli A., Wanderlei Pires R. G. Martins-Silva C., Sluka K. A., Soares Santos A. R. The role of brain serotonin in the analgesia produced by low intensity on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice // *Pain*. — 2015. — Vol. 156, №12. — P. 2595 — 2606.
8. Sullivan K.G., Levin M. Neurotransmitter signaling pathways required for normal development in *Xenopus laevis* embryos: A pharmacological survey screen // *J. Anat*. – 2016.- V229.- p. 483–502. Doi 10/1111/joa.12467.
9. Sachlos E., Risueno R.M., Laronde S., et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells // *Cell*. – 2012.- V149.- p.1284–1297. Doi. 10.1016/j.cell.2012.03.049.
10. Stepulak A., Rola R., Polberg K., Ikonomidou C. Glutamate and its receptors in cancer // *J. Neural Transm. (Vienna)*.- 2014.-v121.- p.933–944.
11. Grygier B., Arteta B., Kubera M., et al. Inhibitory effect of antidepressants on B16F10 melanoma tumor growth // *Pharmacol. Rep*. – 2013.- V.65.- p. 672–681.
12. Sarrouilhe D., Clarhaut J., Defamie N., Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link? // *Curr. Mol. Med*. – 2015.- V.15.- p.62–77.
13. Vachon-Presseau E., Centeno M.V., Ren W. Emotional brain as a harbinger and an enhancer of chronic pain // *J. Dent. Res*. — 2016. — Vol.95, №6. — P. 605-612. doi: 10.1177/0022034516638027.

14. Costigan M., Scholz J., Wulf C. The mal adaptive response of the nervous system to damage // *AnnuRevNeurosci.* — 2009. — Vol. 32. — P. 1-32.
15. Karafin MS, Chen G, Wandersee NJ, Brandow AM, Hurley RW, Simpson P, Ward D, Li SJ, Field JJ Chronic pain in adults with sickle cell disease is associated with alterations in functional connectivity of the brain // *PLoS One.* — 2019.- May 20.-14(5). doi: 10.1371/journal.pone.0216994.
16. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей // *Российский журнал боли.* — 2017. — Т.53, №2. — С. 14-20. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M. 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 Russ)].
17. Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М. и др. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы B16/F10 у самок мышей // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* — 2019. — Т.199 (1). — С. 106-111. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M. 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 Russ)].
18. Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М. и др. Нейромедиаторные системы головного мозга самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы, воспроизведенной на фоне хронической боли // *Патогенез.* — 2017. — Т.15, №4. — С. 49-55. [Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M. et al. Neurotransmitter systems of female mouse brain during growth of malignant melanoma modeled on the background of chronic pain // *Patogenez.* — 2017. — V.15, N4. — P. 49-55. (In Russ)].
19. Zhao, X. Tan Z., Zhang X. Long non-coding RNA promotes neuropathic pain by silencing *Kcna2* in primary afferent neurons // *Nat. Neurosci.* — 2013. — №16. — P. 1024-1031.
20. Овсянников, В. Г., Бойченко А.Е., Алексеев В.В. Антиноцицептивная система // *Медицинский вестник Юга России.* — 2014. — №3. — С. 46 — 54. [Ovsyannikov V. G., Bojchenko A.E., Alekseev V.V. Antinociceptive system // *Medicinskij vestnik YUga Rossii.* — 2014. — N3. — P. 46 — 54. (In Russ)].
21. Schuller, H.M. Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy // *Anticancer Drugs.* — 2008. — Vol. 19, №7. — P. 655 — 671.
22. Li, S., Sun Y., Gao D. Role of the nervous system in cancer metastasis (Review) // *Oncol. Letters.* — 2013. — Vol.5, №4. — P. 1101–1111. doi: 10.3892/ol.2013.1168.

*O.I. Kit, E.M. Frantsiyants, V.A. Bandovkina,
I.V. Kaplieva, I.M. Kotieva, L.K. Trepitaki,
Yu.S. Sidorenko*

Influence of chronic neurogenic pain on brain neurotransmitter systems of male mice in dynamics of melanoma growth

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don

Biogenic amines (BA) are known to be involved in the malignant growth, and their levels change in the CNS when exposed to pain; however, the combined effect of chronic pain and cancer on the BA dynamics in the brain has not been studied. The aim of the study was to evaluate characteristics of BA balance in the brain cortex during melanoma growth with chronic neurogenic pain (CNP).

Material and methods. The study included 64 male C57Bl/6 mice weighing 22-24 g. B16/F10 melanoma was transplanted under the skin of the back to animals of the main group 2 weeks after the sciatic nerve ligation. Mice with melanoma without pain were the comparison group. Levels of BA: adrenaline, noradrenaline, dopamine (DA), serotonin (5-HT), histamine, and 5-HIAA were determined by ELISA.

Results. Changes in adrenaline levels were registered in the brain of mice with CNP. The growth of melanoma in males was accompanied by elevated brain levels of adrenaline and noradrenaline and decreased dopamine and serotonin. Similarities in the direction of shifts in the neurotransmitter profile were observed in melanoma development with and without CNP.

Conclusions. The influence of CNP on the neurotransmitter balance in the CNS was probably one of the factors that influenced the course of transplanted B16/F10 melanoma in males of the main group.

Key words: B16/F10 melanoma; chronic pain; brain; serotonin, histamine, dopamine, noradrenaline, adrenaline, C57Bl/6 mice

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.