



© О.И. Кит, Е.М. Франциянц, А.И. Шихлярова, И.В. Нескубина,
Д.С. Кутилин

Свойство митохондрий меланомы В16 индуцировать канцерогенез. Морфологическое обоснование феномена

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

© Oleg I. Kit, Elena M. Frantsiyants, Alla I. Shikhlyarova, Irina V. Neskubina,
Denis S. Kutilin

The Ability of B16 Melanoma Mitochondria to Induce Carcinogenesis. Morphological Confirmation of the Phenomenon

National Medical Research Center for Oncology, Rostov-on-Don the Russian Federation

Введение. Меланома представляет все больший интерес для исследований, особенно по мере выяснения конкретных биологических путей ее развития и прогрессирования. Важную роль в процессах развития меланомы играет митохондриальный метаболизм, перестройки которого влияют на выживаемость злокачественных клеток.

Цель. Изучение способности митохондрий, изолированных из меланомы, образовывать опухолевые структуры в организме животных.

Материалы и методы. В эксперименте использовали 17 самцов мышей линии C57BL/6 и штамм меланомы кожи B16/F10. Из меланомы кожи B16/F10, взятой от самцов-доноров мышей линии C57BL/6 ($n = 3$), выделяли митохондрии методом дифференциального центрифугирования. Мышам линии C57BL/6 ($n = 7$) в мышцу однократно трансплантировали свежееизолированные митохондрии меланомы B16/F10. Контролем служили мыши-самцы линии C57BL/6 ($n = 7$), которым однократно в мышцу вводили 0,4 мл физиологического раствора. Осуществляли морфологический контроль срезов внутренних органов и очагов меланомы B16/F10 после стандартной проводки, заливки в парафин и окраски препаратов гематоксилин-эозином с последующей микроскопией на Axiovert (Carl Zeiss, Германия) на основе программы визуализации изображений Axiovision 4 (Carl Zeiss, Германия). Срезы исследовали и фотографировали с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL Inc., Япония), оснащенный системой Quemesa CCD (OSIS, Германия) и работающий на 100 кВ.

Результаты. Спустя 2 недели, при вскрытии животных в брюшной полости обнаружены множественные узлы меланомы с диссеминацией по брюшине, в брыжейке, толстой и тонкой кишке, печени. Морфологическое исследование крупного опухолевого узла, спаянного с почкой, а также небольшого узла на семенном канатике, подтвердило меланоцитарную природу клеток.

Заключение. Полученный феномен отмечен впервые и требует дальнейшего изучения механизмов реализации митохондриальной программы злокачественной трансформации.

Ключевые слова: митохондрии; экспериментальная меланома B16/F10; мыши

Для цитирования: Кит О.И., Франциянц Е.М., Шихлярова А.И., Нескубина И.В., Кутилин Д.С. Свойство мито-

Introduction. Melanoma is an area of increasing research interest, particularly in the identification of specific biological pathways involved in its development and progression. Mitochondrial metabolism plays an important role in the development of melanoma, as its rearrangements affect the survival of malignant cells.

Aim. To investigate the ability of mitochondria isolated from melanoma to form tumor structures in animals.

Materials and methods. The experiment was performed on 17 male C57BL/6 mice, using the B16/F10 cutaneous melanoma strain. Mitochondria were isolated by differential centrifugation from cutaneous B16/F10 melanomas obtained from male donor C57BL/6 mice ($n = 3$). Mice of the C57BL/6 strain ($n = 7$) were given a single transplant of freshly isolated B16/F10 melanoma mitochondria into the muscle. C57BL/6 males ($n = 7$) with a single injection of 0.4 ml saline served as the control. Sections of internal organs and B16/F10 melanoma foci were morphologically checked after processing, paraffin embedding and hematoxylin and eosin staining with the following microscopy on the Axiovert microscope (Carl Zeiss, Germany) based on the Axiovision 4 image visualization program (Carl Zeiss, Germany). Sections were examined and photographed using a JEM-1400 electron microscope (JEOL Inc., Japan) equipped with a Quemesa CCD system (OSIS, Germany) and operated at 100 kV.

Results. After 2 weeks, autopsy of the animals revealed multiple melanoma nodules in the abdominal cavity with dissemination to the peritoneum, mesentery, large and small intestine and liver. Morphological examination of a large tumor node adjacent to the kidney and a small node on the spermatic cord confirmed the melanocytic nature of the cells.

Conclusion. This is the first time that such a phenomenon has been observed, and it requires further study of the mechanisms of the mitochondrial program of malignant transformation.

Keywords: mitochondria; experimental B16/F10 melanoma; mice

For Citation: Oleg I. Kit, Elena M. Frantsiyants, Alla I. Shikhlyarova, Irina V. Neskubina, Denis S. Kutilin. The ability

хондрий меланомы B16 индуцировать канцерогенез. Морфологическое обоснование феномена. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(6): 1199-1208.-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-6-1199-1208

✉ Контакты: Шихлярова Алла Ивановна, shikhliarova.a@mail.ru

Введение

В настоящее время принято считать, что метастатическая диссеминация характеризуется отделением клеток от первичной опухолевой массы, дальнейшей миграцией по кровеносным и лимфатическим сосудам и колонизацией различных тканей. Метастатический каскад можно разделить на различные стадии, включая локальную инвазию, интравазацию, выживание в кровотоке, экстравазацию, выживание во втором месте-мишени и, наконец, разрастание в этом месте-мишени. Известно, что эпителиально- мезенхимальный переход (EMT) расценивается как биологическое явление, которое возникает во время эмбрионального развития, но также связано и с метастазированием рака [1]. Меланома представляет все больший интерес для исследований, особенно по мере выяснения конкретных биологических путей ее развития и прогрессирования. Важную роль в процессах развития меланомы играет митохондриальный метаболизм, перестройки которого влияют на выживаемость злокачественных клеток [2, 3]. Высокий уровень самоорганизации митохондрий детерминирует процессы образования и распространение опухолей через различные механизмы, включая регуляцию окислительно-восстановительного статуса, регуляторную сигнализацию и пути гибели клеток. В недавних публикациях были освещены вопросы о существовании сложного взаимодействия между функциями и пространственным состоянием митохондрий, их разделением или слиянием с образованием сетевых структур [4]. В свою очередь на экспериментальном материале была установлена связь терапевтического эффекта интактных митохондрий с их способностью к тканевому перемещению [5, 6]. По-видимому, митохондриальная «динамика» глубоко вовлечена в регуляцию различных функций митохондрий, связанных с инвазией и метастазированием раковых клеток, однако этот вопрос остается весьма спорным, а механизмы, связывающие «динамику» митохондрий с развитием метастазирования, остаются малоизученными [4]. Кроме того, для успешной борьбы со злокачественным процессом следует учитывать адаптивную гибкость митохондрий, позволяющую раковым клеткам приспособиваться к изменяющейся среде и стрессам. Таким образом, лучшее понимание процессов, регулируемых митохондриями, и их сложного вза-

of B16 melanoma mitochondria to induce carcinogenesis. Morphological confirmation of the phenomenon. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(6): 1199-1208. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-6-1199-1208

имодействия с митохондриальным биогенезом является основой для новых перспективных терапевтических подходов лечения рака [4].

Н. Nagase и соавт. (2021) [7] исследовали влияние митохондрий на метастатический потенциал при злокачественном процессе и обнаружили, что процесс ядерного и цитоплазматического обмена между митохондриями высоко метастатических опухолей с мутацией G13997A и митохондриями низко метастатических злокачественных опухолей с мтДНК дикого типа, может привести к замещению митохондрий. Такой процесс замещения митохондрий в низко метастатических клетках на митохондрии из высоко метастатических клеток приводит к увеличению метастатического потенциала. И наоборот, не наблюдалось признаков метастазирования в высоко метастатических клетках, которые включали митохондрии из клеток с низким уровнем метастазирования. Было показано, что митохондрии могут переноситься из стромальных клеток костного мозга в лейкозные бласты для усиления их пролиферации *in vitro* и *in vivo* посредством механизма, который увеличивает ОХРНOS в лейкозных бластах [8]. Таким образом, опираясь на общепринятую регуляторную метаболическую, пролиферационную и миграционную функцию митохондрий, возникает предположение, что в самих злокачественных опухолях развитие дисфункции митохондрий формирует триггерный механизм проонкогенного действия, т. е. митохондрии и являются одними из целевых носителей злокачественной информации. И если данное предположение правомочно, то возможность такого злокачественного переноса может быть связана только с изолированными из опухоли митохондриальными ультраструктурами, а не самими опухолевыми клетками. Иными словами, становится актуальным исследование ранее неизвестного свойства митохондрий злокачественных клеток формировать в организме опухолевые структуры. Целью настоящего исследования явилось изучение свойств митохондрий, изолированных из меланомы, образующих опухолевые структуры в организме животных. Для достижения цели необходимо было решить задачи молекулярной и электронной валидации митохондриальной фракции, контроля за внешними признаками деформации тела и болевого поведения животных, ревизии их брюшной полости, световой и электронной микроскопии новообразований.

Материалы и методы

В эксперименте использовали 17 самцов мышей линии C57BL/6 и штамм меланомы кожи B16/F10. Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 17.01.2022 был одобрен протокол исследования (протокол этического комитета № 2/201). Из меланомы кожи B16/F10, взятой от самцов-доноров мышей линии C57BL/6 ($n = 3$), выделяли митохондрии по методу М.В. Егоровой и С.А. Афанасьева (2011) [9] и А.П. Гуреева и соавт. (2015) [10].

Молекулярная валидация митохондриальной фракции. Экстракция образцов ДНК из фракции митохондрий и тканевого гомогената (контроль) была выполнена с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия) по инструкции производителя.

Определение методом ПЦР в режиме реального времени соотношения количества копий митохондриальной ДНК относительно генов клеточного ядра использовали для оценки качества митохондриальной фракции.

Для определения количества копий генов были разработаны последовательности 2 пар синтетических олигонуклеотидов, включая пары для митохондриального локуса *mt-Rnr2* (16S ribosomal RNA, *Mus musculus*) и ядерного гена *GAPDH* (*gapMus*, *Mus musculus*) (табл. 1). Для дизайна праймеров использовали собственный скрипт на языке R и базу данных NCBI GenBank. Количество копий генов определяли методом RT-qPCR в трех технических повторах с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве красителя использовали EvaGreen®Dye (Biotium, США). Соотношение количества копий митохондриальной ДНК относительно генов клеточного ядра проводили по формуле $rC_{mt} = 2^{-(G(C_{mt}) - G(C_{N}))}$, где G — среднее геометрическое C_{mt} (митохондриальных локусов) или C_{N} (ядерных локусов) [11].

Трансплантация митохондрий, изолированных из меланомы. Мышам линии C57BL/6 ($n = 7$) в мышцу однократно трансплантировали свежееизолированные митохондрии меланомы B16/F10 из расчета 5,2 мг белка на 1 животное в 0,4 мл физиологического раствора.

Контролем служили мыши-самцы линии C57BL/6 ($n = 7$), которым однократно в мышцу вводили 0,4 мл физиологического раствора.

Всех животных умерщвляли путем декапитации на гильотине через 2 нед. после парентеральной трансплантации митохондрий, изолированных из меланомы. Осуществляли морфологический контроль срезов внутренних органов и очагов меланомы B16/F10 после проводки, заливки в парафин и окраски препаратов гематоксилин-эозином с последующей микроскопией на Axiovert (Carl 44 Zeiss, Германия) на основе программы визуализации изображений Axiovision 4 (Carl Zeiss, Германия).

Просвечивающая электронная микроскопия. Ткань инкубировали в течение ночи при 4 °C в фиксирующем растворе, содержащем 2 % формальдегида и 2 % глутарового альдегида в разделительном буфере (поставляется с набором для выделения митохондрий). Затем образец трижды промывали 100 мМ какодилата натрия и фиксировали в течение 60 мин. 1 % тетроксидом осмия в 100 мМ какодилата натрия при 4 °C. Дегидратацию проводили следующим образом: 50 % этанол (три смены, по 15 мин. каждая), 70 % этанол (две смены), 96 % этанол (две смены) и безводный ацетон (три смены). Образец пропитывали увеличивающейся серией смесей ацетон–смола, затем следуют две замены чистого Epon-812 при 37 °C. Наконец, образец помещали в чистую смолу Epon-812 (SPI Inc., США) и отверждали в течение 72 ч. при 70 °C. Ультратонкие 90-нм срезы получали с помощью ультрамикротомы Reichert-Jung Ultracut E (Reichert-Jung, Австрия), оснащенного алмазным ножом. Срезы монтировали на медные щелевые решетки с покрытием formvar (Ted Pella, США) и подвергали контрастированию 2 %-ным водным раствором уранилацетата в течение 40 мин. и цитратом свинца в течение 2 мин. Срезы исследовали и фотографировали с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL Inc., Япония), оснащенный системой Quemesa CCD (OSIS, Германия) и работающий на 100 кВ.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку результатов выполняли

Таблица 1. Панель праймеров для определения относительной копийности митохондриальных и ядерных генов

Table 1. Set of primers for determining the relative copy number of mitochondrial and nuclear genes

| Генетические локусы | | Последовательность нуклеотидов | |
|---------------------|---|--------------------------------|----------------------|
| 1. Митохондриальные | | Прямой праймер | |
| | | Обратный праймер | |
| | <i>mt-Rnr2</i> (16S ribosomal RNA <i>Mus musculus</i>) | TGACCGTGCAAAGGTAGCAT | ATTCTCCGAGGTCACCCCAA |
| 2. Ядерные | | | |
| | <i>GAPDH</i> (<i>gap Mus musculus</i>) | ACTCATGCCCTGGGAAGTTT | CTCACGCTGACCTTTAGCCT |

в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения показателей в каждой из сравниваемых групп оценивали с помощью критерия Шапиро – Уилка (при $n < 50$). Оценку различий проводили с использованием критерия Манна – Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты

Результаты валидации митохондриальной фракции. Определение количества копий митохондриальных и ядерных генов в 6 образцах (3 образца свежеизолированных митохондрий меланомы B16/F10, взятой от самцов-доноров мышей линии C57BL/6, и 3 образца меланомы B16/F10, взятой от этих же доноров) показало, что соотношение количества копий гена *mt-Rnr2* (рассчитанное относительно гена *GAPDH*) в 8,6 раза, 14,6 раза и 10,3 раза выше в митохондриальной фракции относительно тканевых гомогенатов меланомы (рис. 1). Соответственно, значение медианы количества копий гена *mt-Rnr2* в

митохондриальной фракции превышало в 10,3 раза ($p = 0,049535$) это значение тканевых гомогенатов меланомы.

Ультраструктурное исследование митохондрий, изолированных из меланомы B16 для трансплантации животным, свидетельствовало о наличии в субстрате множества жизнеспособных органоидов неправильной овальной или вытянутой формы с четкой электронноплотной упаковкой крист, хаотично расположенных в митохондриальном матриксе (рис. 2).

Морфологическое и ультраструктурное исследование опухолевых узлов. Через две недели после внутримышечной трансплантации митохондрий меланомы B16/F10 была проведена декапитация и диссекция животных. Основанием для декапитации животных послужили данные об увеличении брюшной части тела, при пальпации животных присутствовал явный болезненный компонент, проявляющийся писканием, кроме того, у всех животных фиксировали снижение общей двигательной активности, деформацию движений в виде подтягивания задних конечностей

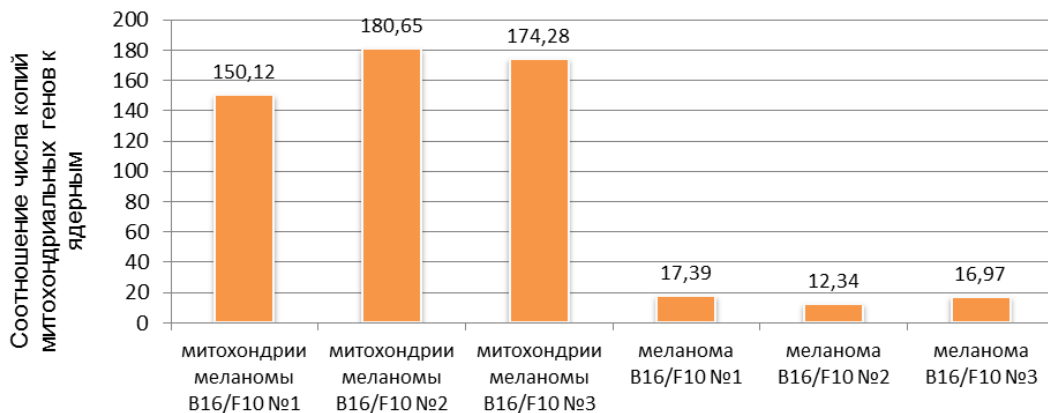


Рис. 1. Количество копий митохондриальной ДНК относительно ядерных локусов
Fig. 1. Mitochondrial DNA copy number relative to nuclear loci

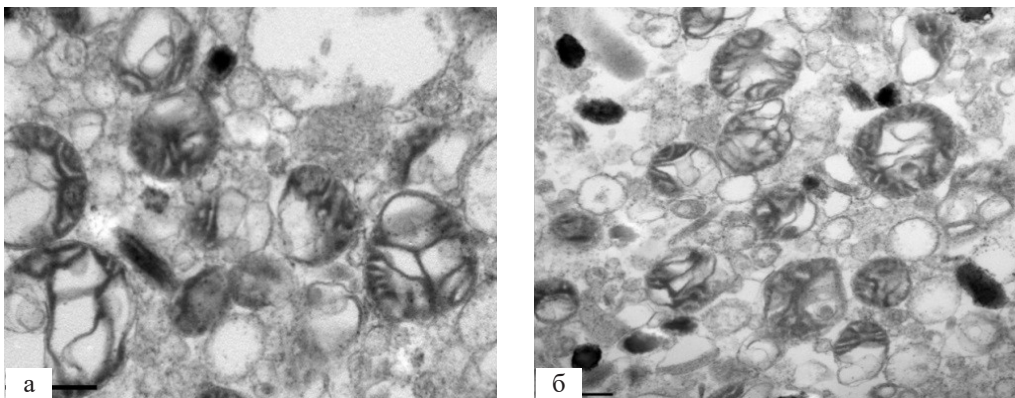


Рис. 2. Митохондрии, изолированные из меланомы B16/F10, трансплантированные мышам C57BL/6: а) скопление жизнеспособных митохондрий с различной электронной плотностью матрикса и хаотичным расположением четко контрастированных крист; б) большее разнообразие патологически измененных форм митохондрий с аномальной упаковкой крист. Электронограмма. Ув. 50 000
Fig. 2. Mitochondria isolated from B16/F10 melanoma transplanted into C57BL/6 mice: а) cluster of viable mitochondria with different electron density of matrix and chaotic arrangement of clearly contrasting cristae; б) greater variety of pathologically altered forms of mitochondria with abnormal packaging of cristae. Electronogram. $\times 50\ 000$.

стей и тревожность. В ходе ревизии брюшной полости животных, макроскопически фиксировали очаги опухоли у 100 % мышей-самцов. Очаги опухоли имели разный размер и расположение, но цветовой оттенок опухолевых структур был характерен для меланомы B16/F10.

Примеры развития опухолевых очагов при внутримышечной трансплантации митохондрий, изолированных из меланомы, мышам линии C57BL/6 представлены на фото (рис. 3). Так, у 2-х самцов отмечен рост опухолевого узла в брюшной полости, плотно спаянный с правой почкой, опухолевый отсев в семенном канатике и жировой клетчатке. У 5 животных отмечена диссеминация по брюшине, опухолевые узлы в брыжейке тонкой и толстой кишки, печени.

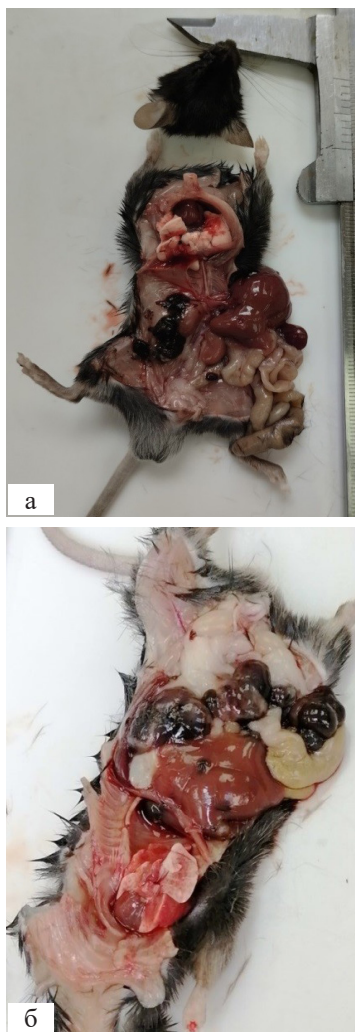


Рис. 3. Макрокартина поражения брюшной полости у мышей самцов линии C57BL/6 после внутримышечной трансплантации митохондрий, изолированных из меланомы B16/F10. Опухолевый узел, плотно спаянный с правой почкой, опухолевый отсев в семенной канатик и жировую клетчатку (а); диссеминация по брюшине, опухолевые узлы в брыжейке тонкой и толстой кишки, печени (б)

Fig. 3. Macroscopic view of abdominal lesions in male C57BL/6 mice after intramuscular transplantation of mitochondria isolated from a B16/F10 melanoma. Tumor nodule tightly fused with the right kidney, tumor sprouting into the seminal canal and adipose tissue (a); spread through the peritoneum, tumor nodules in the mesentery of the small and large intestine, liver (b)

При световой микроскопии гистологических препаратов, включая участок мышечной ткани, в которую производили инъекцию взвеси митохондрий меланомы (рис. 4, а), а также зоны рыхлой соединительной ткани паранефральной клетчатки у мышей самцов линии C57BL/6, наше внимание привлек наиболее крупный узел, рядом с которым были обнаружены новообразования в виде мелких узлов (рис. 4, б). На периферийной стороне крупного узла в участках кровоизлияния идентифицировались единичные и слитые в мелкие островки атипичные клетки, напоминающие меланому эпителиоидного типа. Клетки отличались по величине, включая гигантские, имели неправильную пластинчато-округлую или овоидную форму с крупными ядрами и ядрышками, отростчатой прозрачной цитоплазмой, содержащей грубые гранулы пигмента темно-коричневого оттенка, свойственного меланину (рис. 4, в, г). По краю узла, примыкающего к почке, отмечалась высокая пролиферативная активность с фигурами патологического митоза, выявлялись жировые вакуоли. На отдельных участках капсулы почки граница с опухолью была стерта из-за внедрения меланоцитов в структуру почки (рис. 4, д, е).

При исследовании семенного канатика, расположенного на значительном удалении от крупного опухолевого узла в паранефральной клетчатке, был выявлен небольшой по размеру практически черный узел, контрастирующий на фоне светлого пространства окружающей жировой клетчатки. Очевидная удаленность от места инокуляции митохондрий с развитием крупного конгломерата меланоцитов в рыхлой соединительной ткани, окружающей почку, указывала на возможность отдаленного метастазирования, благодаря свободной дислокации митохондрий и выраженной тропности к клетчатке, как строительному ресурсу для самоорганизации злокачественного новообразования (рис. 5, а).

На препаратах было четко видно формирование очага опухоли в окружении рекрутированных элементов рыхлой соединительной ткани с крупными жировыми капсулами (рис. 5, б). Отмечалось кровенаполнение сосудов и значительная лимфоцитарная инфильтрация. Клетки сохраняли свойства, присущие меланоме эпителиоидного типа: неправильную пластинчато-округлую или овоидную форму с отростчатой прозрачной цитоплазмой, содержащей грубые гранулы пигмента коричневого оттенка, свойственного меланину, различные размеры и инвагинацию ядра и ядрышек (рис. 5, в, г). Это позволяло идентифицировать меланоцитарную природу опухолевого очага.

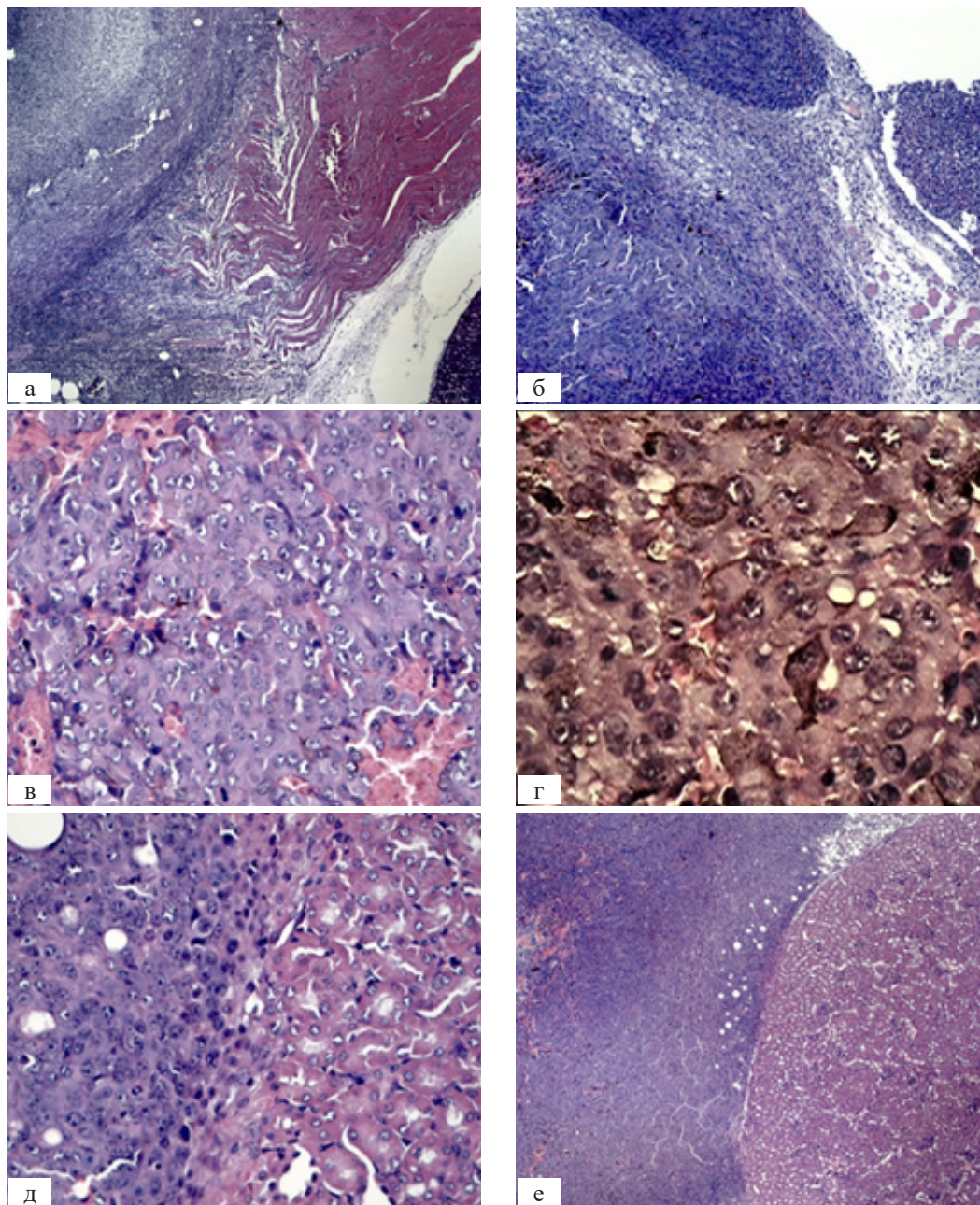


Рис. 4. Общий вид опухолевого конгломерата в паранефральной жировой клетчатке мышей самцов линии C57BL/6 после внутримышечной трансплантации митохондрий, изолированных из меланомы B16/F10: а, б — массиванный выход митохондрий и опухолевая трансформация рыхлой соединительной ткани (ув. об. 5, 10); в, г — крупные очаги кровоизлияния по периферии опухолевого узла, островки атипичных клеток округлой или овальной формы, включая гигантские с отростчатой цитоплазмой и крупными гранулами меланина (ув. об. 40, 100); д, е — плотный рост опухоли, участки прорастания меланоцитов через капсулу почки (ув. об. 40, 10). Окр. гематоксилин-эозином.

Fig. 4. General view of tumor conglomerate formed in the paranephral fatty tissue of male C57BL/6 mice after intramuscular transplantation of mitochondria isolated from B16/F10 melanoma: а, б — massive mitochondria exit and tumor transformation into loose connective tissue (eq. volume $\times 5$, $\times 10$); в, г — large foci of hemorrhages on the periphery of the tumor node, islets of atypical cells of round or ovoid shape, including giant cells with overgrown cytoplasm and large melanin granules; д, е — dense tumor growth, areas of melanocyte sprouting through the kidney capsule (e, f, g, $\times 40$, $\times 10$). Hematoxylin-eosin staining.

Мы провели сравнительный анализ электронограмм исходных образцов меланомы B16 и опухолевых очагов, полученных в результате трансплантации изолированных митохондрий, в т. ч. очагов в паранефральной клетчатке и семенном канатике. Электронная микроскопия подтвердила сходную ультраструктуру меланомы B16/F10 и индуцированных митохондриями опухолевых очагов с характерным плотным расположением

опухолевых клеток с крупными полиморфными ядрами и глубокими инвагинациями ядерной оболочки (рис. 6, а–г). Внутри ядер было отмечено однотипное распределение ядерного хроматина, собранного в хаотичном порядке в виде крупных глыбок различной формы. В обоих случаях цитоплазма содержала значительное количество крупных зерен пигмента меланина, рассеянного по всей клетке с характерным коричневым оттенком.

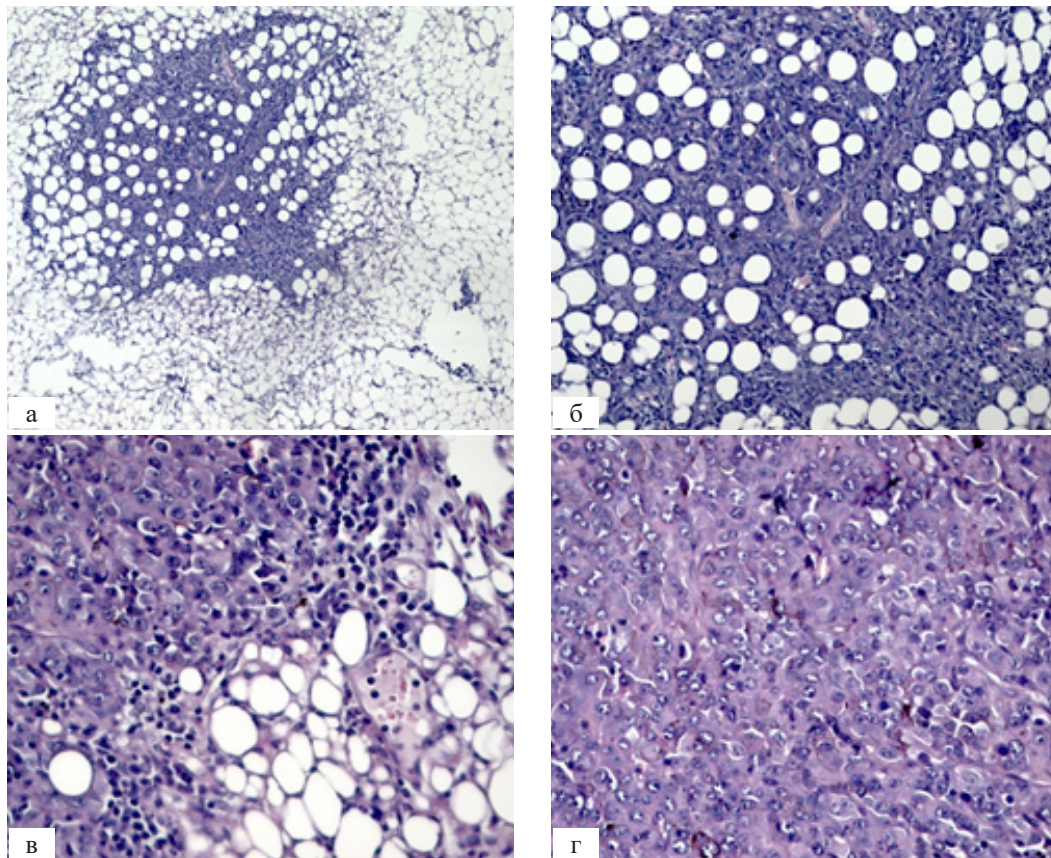


Рис. 5. Опухолевый узел в клетчатке семенного канатика мышей самцов линии C57BL/6 после внутримышечной трансплантации митохондрий, изолированных из меланомы B16/F10: а, б — рост опухоли в межкапсульных перегородках жировой соединительной ткани; в, г — плотная компановка клеток неправильной округлой формы с фигурами патологического митоза и крупными ядрышками, значительным содержанием гранул меланина. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. об. 10, 20, 40

Fig. 5. Tumor nodule in the spermatic cord of male C57BL/6 mice after intramuscular transplantation of mitochondria isolated from B16/F10 melanoma: а, б - tumor growth in intercapsular septa of adipose connective tissue; в, г - dense cluster of cells of irregular round shape with figures of pathological mitosis and large nuclei, significant content of melanin granules. Hematoxylin-eosin staining (eq. volume $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$)

Кроме того, на электронограммах меланомы B16/F10 и опухолевых очагов, полученных в результате трансплантации изолированных митохондрий, были зафиксированы скопления в цитоплазме множества свободных митохондрий неправильной округлой и вытянутой формы (рис. 6, д) с элементами фрагментации и патологическими формами крист, неравномерным наполнением матрикса продуктами метаболизма (рис. 6, е). Среди сходной ультраструктурной картины опухолевых узлов после трансплантации изолированных митохондрий меланомы B16, зачастую встречались безъядерные формы клеток со скоплением митохондриальных ассоциатов — митохондрии, включающие развитый аппарат Гольджи и крупные кристаллизованные гранулы меланина.

Обсуждение

Анализируя результаты проведенных исследований в рамках механизмов прогрессии и метастазирования меланомы, мы попытались преодолеть неоспоримость приоритета клеточного звена и рассмотреть скрытую стратегию

митохондриальной субстанции, наделенной информационным и энергетическим влиянием на все аспекты клеточной жизни и смерти.

Предпринятая нами попытка оценить возможности целевого носительства злокачественной информации митохондрий меланомы B16 с помощью доступного метода ПЦР, позволила выявить многократное превышение соотношения количества копий гена *mt-Rnr2* относительно гена *GAPDH* в митохондриальной фракции относительно тканевых гомогенатов меланомы. Молекулярно-генетическая валидация была подкреплена электронным исследованием субстрата жизнеспособных митохондрий, выделенных по принятым в мире стандартам, что сводило к минимуму попадание единичных клеток меланомы.

Наблюдение за животными в течение 2-х недель после внутримышечной инокуляции митохондриальной взвеси не оставляло сомнений в развитии патологического процесса не только по внешним признакам деформации тела и болезного поведения животных, связанного с распространенностью опухолевого процесса в брюшной полости, но и при ревизии их брюшной полости. Были зафиксированы множественные

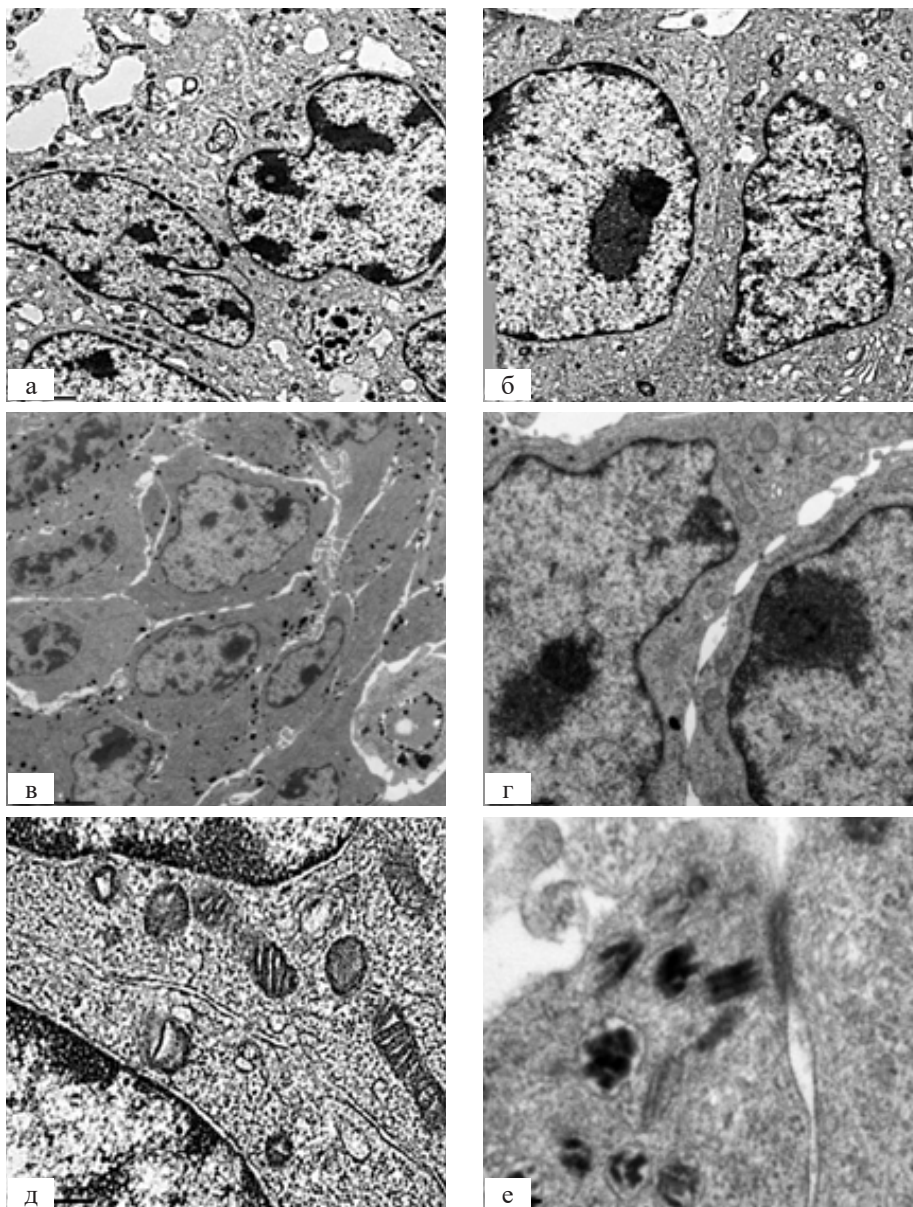


Рис. 6. Ультраструктура образцов меланомы В16 и опухолевых очагов, полученных в результате трансплантации изолированных митохондрий : а, б) плотное расположение клеток, полиморфизм ядер с инвагинацией ядерной оболочки, тесный контакт наружных мембран клеток; в, г) ультраструктура клеток после трансплантации изолированных митохондрий мышам C57BL/6 с типичной для меланомы В16/F10 плотностью расположения, межклеточными контактами, формой ядер и гранулами меланина; д) скопление жизнеспособных митохондрий с различной электронной плотностью матрикса и четко контрастированными кристами; е) ультраструктура клеток после трансплантации изолированных митохондрий мышам C57BL/6 с образованием упаковок кристаллов меланина. Электронограмма. Ув. 5 000, 10 000, 20 000, 40 000

Fig. 6. Ultrastructure of melanoma B16 samples and tumor foci obtained by transplantation of isolated mitochondria: a, б) dense arrangement of cells, polymorphism of nuclei with invagination of nuclear envelope, close contact of outer cell membranes; в, г) ultrastructure of cells after transplantation of isolated mitochondria to C57BL/6 mice with typical B16/F10 melanoma density, intercellular contacts, shape of nuclei and melanin granules; д) accumulation of viable mitochondria with different electronic density of matrix and clearly contrasted cristae; е) ultrastructure of cells after transplantation of isolated mitochondria to C57BL/6 mice with formation of melanin crystal packing. Electronogram. $\times 5\ 000$, $\times 10\ 000$, $\times 20\ 000$, $\times 40\ 000$

пигментированные новообразования, диссеминированные по брюшине и внутренним органам. Наиболее крупная и мелкая отдаленная конгломерации были подвержены гистологическим и электронно-микроскопическим исследованиям, подтвердившим меланоцитарную природу опухолевых узлов по критериям формы и размеров клеток, инвагинированной форме крупных ядер и множественности патологических митозов, наличию множества гранул меланина.

Морфологический контроль препаратов опухолевых узлов в определенной степени позволял предположить сценарий митохондриального канцерогенеза. Ход событий, по нашему мнению, был обусловлен как уникальными способностями митохондрий к ядерно-цитоплазматическому обмену, регуляторным метаболическим, пролиферационным и, особенно, миграционным функциям, так и обеспечением этих функций со стороны рыхлой соедини-

тельной ткани — обильным кровоснабжением, жирами, клеточными элементами (коллагеновые волокна, фибробласты) для рекрутизации и образования конгломераций опухолевых клеток. Способность митохондрий меланомы самостоятельно, быстро и агрессивно рекрутировать клеточные элементы и использовать биохимическую среду реципиента с образованием меланомы *de novo*, представляет возможный новый уникальный путь злокачественной трансформации.

Безусловно, обсуждение данного исследования носит односторонний характер, поскольку ни в отечественной, ни в зарубежной литературе мы не встретили аналогичных данных по трансплантации митохондрий опухоли, хотя мировые сообщения изобилуют данными о переносе митохондрий здоровых органов, их терапевтическом эффекте. Надеемся, что актуальность проводимых нами исследований найдет отклик в разработке новых аспектов патогенеза злокачественных опухолей и противоопухолевой терапии.

Заключение

Проведенные исследования выявили ранее не известные свойства митохондрий, изолированных из меланомы кожи B16/F10, при парентеральном введении которых в организм животных-реципиентов наблюдается развитие опухолевых узлов меланомы, идентифицированных при морфологическом исследовании. Этот ранее не известный факт в экспериментальной онкологии требует дальнейшего глубокого изучения новых свойств митохондрий клеток меланомы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing

The work was performed without external funding.

Соблюдение этических стандартов

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 19.12.2019, был одобрен протокол исследования (протокол этического комитета № 14/74).

Compliance with ethical standards

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 December 19, 2019, the study protocol was approved (ethics committee protocol No. 14/74).

Участие авторов

Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Кит О.И. — разработка концепции и дизайна работы, окончательное утверждение для публикации рукописи;

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

Шихлярова А.И. — морфологическое исследование, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи;

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

Кутилин Д.С. — проведение эксперимента, анализ и интерпретация результатов.

Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработке концепции статьи, получении и анализе фактических данных, написании и редактировании текста статьи, проверке и утверждении текста статьи.

Authors' contributions

The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria.

Kit O.I. — developed the concept and design of the article and approved the final version of the manuscript before publication;

Frantsiyants E.M. — developed the concept and design of the article, analyzed and interpreted the data, and approved the final version of the manuscript before publication;

Shikhlyarova A.I. — carried out the morphological study, revised the article for critical intellectual content, approved the final version of the manuscript before publication;

Neskubina I.V. — carried out the experiment, analyzed and interpreted the data, drafted and edited the manuscript;

Kutulin D.S. — performed the experiment, analyzed and interpreted the data.

All authors have made substantial contributions to the preparation of this publication: conception of the article, acquisition and analysis of data, drafting and editing of the article, revision and approval of the article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chaffer K.L., Weinberg R.A. A look at cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331: 1559-1564.-DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
2. Juan C., Radi R.H., Arbeizer J.L. Mitochondrial metabolism in melanoma. *Cells*. 2021; 10(11): 3197.-DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10113197>.
3. Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Черярина Н.Д., et al. Функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов при злокачественном процессе на фоне коморбидной патологии в эксперименте. *Южно-Российский*

- онкологический журнал. 2021; 2(3): 13-22.-DOI: <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-3-2>. [Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Cheryarina N.D., et al. 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.-DOI: <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-3-2>. (In Rus)].
4. Denisenko T.V., Gorbunova A.S., Zhivotovsky B. Mitochondrial involvement in migration, invasion and metastasis. *Front Cell Dev Biol*. 2019; 7: 355.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00355>.
 5. Kit O.I., Shikhlyarova A.I., Frantsiyants E.M., et al. Mitochondrial therapy: direct visual assessment of the possibility of preventing myocardial infarction under chronic neurogenic pain and B16 melanoma growth in the experiment. *Cardiometry*. 2022; 22: 38-49.-DOI: <https://doi.org/10.18137/cardiometry.2022.22.3849>.
 6. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Shikhlyarova A.I., et al. Biological effects of mitochondrial therapy: preventing development of myocardial infarction and blocking metastatic aggression of B16/F10 melanoma. *Cardiometry*. 2022; 22: 50-55.-DOI: <https://doi.org/10.18137/cardiometry.2022.22.3849>.
 7. Nagase H., Watanabe T., Koshikawa N., et al. Mitochondria: Endosymbiont bacteria DNA sequence as a target against cancer. *Cancer Sci*. 2021; 112(12): 4834-4843.-DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.15143>.
 8. Burt R., Dey A., Aref S., et al. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood*. 2019; 134(17): 1415-1429.-DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.2019001398>.
 9. 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. [Egorova M.V., Afanasyev S.A. Isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and human: modern methodical approaches. *The Siberian Medical Journal*. 2011; 26(1-1): 22-28. (In Rus)].
 10. Гуреев А.П., Кокина А.В., Сыромятникова М.Ю., Попов В.Н. Оптимизация методов выделения митохондрий из разных тканей мыши. *Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация*. 2015; 4: 61-65. [Gureev A.P., Kokina A.V., Syromyatnikov M.Yu., Popov V.N. Optimization of methods for isolating mitochondria from different mouse tissues. *VSU Vestnik, Series: Chemistry. Biology. Pharmacia*. 2015; 4: 61-65. (In Rus)].
 11. Юрьева Е.А., Шапошников А.В., Кутилин Д.С. Генетические и транскриптомные регуляторы функционального состояния печени у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой и жировым гепатозом. *Современные проблемы науки и образования*. 2023;(6): 15-15.-DOI: <https://doi.org/10.17513/spno.33038>.-URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=33038>. [Yureva E.A., Shaposhnikov A.V., Kutilin D.S. Genetic and Transcriptomic Regulators of the Liver Functional State in Hepatocellular Carcinoma and Fatty Hepatosis Patients. *Modern Problems of Science and Education*. 2023;(6): 15-15.-DOI: <https://doi.org/10.17513/spno.33038>.-URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=33038>. (In Rus)].

Поступила в редакцию / Received / 25.03.2024

Прошла рецензирование / Reviewed / 05.02.2024

Принята к печати / Accepted for publication / 13.06.2024

Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Олег Иванович Кит / Oleg I. Kit / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN: 1728-0329.

Елена Михайловна Франциянц / Elena M. Frantsiyants / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN: 9427-9928.

Алла Ивановна Шихлярова / Alla I. Shikhlyarova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>, SPIN: 6271-0717.

Ирина Валерьевна Нескубина / Irina V. Neskubina / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>, SPIN: 3581-8531.

Денис Сергеевич Кутилин / Denis S. Kutilin / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>, SPIN-код: 8382-4460.

