



3.1.6. Онкология, лучевая терапия
ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

РЕАЛИЗАЦИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ОРГАНИЗМЕ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ ЖИВОТНЫХ

О. И. Кит, Е. М. Франциянц, А. И. Шихлярова, И. В. Нескубина✉

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ neskubina.irina@mail.ru

Резюме

Цель исследования. Получение экстракраниальных диффузных опухолевых очагов глиобластомы в организме мышей Balb/c Nude путем имплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы человека.

Материалы и методы. Митохондрии глиобластомы человека выделяли с применением дифференциального центрифугирования на высокоскоростной рефрижераторной центрифуге. Митохондриальные образцы разводили 0,9 % раствором NaCl до концентрации 3 мг белка в 0,4 мл физиологического раствора. Мышам линии Balb/c Nude ($N = 6$) внутрибрюшинно одноразово трансплантировали свежееизолированные митохондрии глиобластомы из расчета 3 мг белка на 1 животное в 0,4 мл физиологического раствора. Контролем служили мыши-самцы линии Balb/c Nude ($N = 4$), которым одноразово внутрибрюшинно вводили 0,4 мл физиологического раствора. Всех животных умерщвляли путем декапитации на гильотине через 17-21 дней после парентеральной имплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы.

Результаты. Выявлены особые изменения структуры селезенки ($N = 4$): на множественных полях зрения отмечалось образование тяжей из клеток, напоминающих мультиформную глиобластому. Об инициации диффузного роста клеток глиобластомы в стромальной части красной пульпы селезенки свидетельствовала экспрессия GFAP и ki-67, которая фиксировалась и в препарате опухоли пациентки с глиобластомой. При морфологическом исследовании брыжейки и лимфоузлов были выявлены множественные участки с атипичными клетками, напоминающие мультиформную глиобластому, локализирующиеся в фиброзных перегородках и синусах. В брыжейке и лимфатическом узле мышей Balb/c Nude ($N = 6$) после трансплантации митохондрий глиобластомы человека четко определялись окрашенные гранулы с соответствующим иммуногистохимическим профилем – GFAP и ki-6. Дополнительное исследование иммунофенотипа клеток у мышей Balb/c Nude в селезенке, брыжейке и лимфоузлах по общепринятому маркеру S100 не оставляло сомнений в индукции злокачественного роста после трансплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы человека.

Заключение. Показано, что применение парентеральной имплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы человека, мышам-самцам линии Balb/c Nude вызывает рост и развитие в организме животных экстракраниальных очагов глиобластомы.

Ключевые слова:

митохондрии, глиобластома, имплантация митохондрий, морфологическое исследование, экспериментальная онкология

Для цитирования: Кит О. И., Франциянц Е. М., Шихлярова А. И., Нескубина И. В. Реализация злокачественного потенциала митохондрий глиобластомы человека в организме иммунодефицитных животных. Research and Practical Medicine Journal (Исследования и практика в медицине). 2023; 10(3): 55-68. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2023-10-3-5>, EDN: KZLERK

Для корреспонденции: Нескубина Ирина Валерьевна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63
E-mail: neskubina.irina@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>, SPIN: 3581-8531, AuthorID: 794688, Scopus Author ID: 6507509066, ResearcherID: AAG-8731-2019

Соблюдение этических стандартов: в работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013). От пациента получено подписанное информированное согласие на взятие и передачу биологического материала для проведения научных исследований, государственных заданий в общественно и социально-полезных целях. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Комиссией по биотехнике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 24.12.2019 был одобрен протокол исследования (протокол этического комитета №15/75) по работе с мышами линии Balb/c Nude.

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Статья поступила в редакцию 27.04.2023; одобрена после рецензирования 11.08.2023; принята к публикации 28.08.2023.

REALIZATION OF MALIGNANT POTENTIAL OF HUMAN GLIOBLASTOMA MITOCHONDRIA IN IMMUNODEFICIENT ANIMALS

O. I. Kit, E. M. Frantsiyants, A. I. Shikhlyarova, I. V. Neskubina✉

National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ neskubina.irina@mail.ru

Abstract

Purpose. Obtaining extracranial diffuse tumor foci of glioblastoma in Balb/c Nude mice by implantation of mitochondria isolated from human glioblastoma.

Material and methods. Human glioblastoma mitochondria were isolated using differential centrifugation in a high speed refrigerated centrifuge. Mitochondrial samples were diluted with 0.9 % NaCl solution to a protein concentration of 3 mg of protein in 0.4 ml of saline. Balb/c Nude mice ($N = 6$) were intraperitoneally transplanted with freshly isolated glioblastoma mitochondria at the rate of 3 mg of protein per 1 animal in 0.4 ml of physiological solution. Male mice of Balb/c Nude line ($N = 4$), which were injected once intraperitoneally with 0.4 ml of physiological solution, served as control. All animals were euthanized by guillotine decapitation 17-21 days after parenteral implantation of mitochondria isolated from glioblastoma.

Results. Specific changes in the spleen structure were revealed ($N = 4$): the formation of strands of cells resembling glioblastoma multi-forme was observed in multiple fields of vision. The initiation of diffuse growth of glioblastoma cells in the stromal part of the red pulp of the spleen was evidenced by the expression of GFAP and ki-67, which were also recorded in the tumor preparation of the patient with glioblastoma. Morphological examination of the mesentery and lymph nodes revealed multiple areas with atypical cells resembling glioblastoma multi-forme, localized in fibrous septa and sinuses. Stained granules with the corresponding immunohistochemical profile, GFAP and ki-6, were clearly defined in the mesentery and lymph node of a Balb/c Nude mouse ($N = 6$) after transplantation of human glioblastoma mitochondria. An additional study of the immunophenotype of cells in the spleen, mesentery, and lymph nodes of Balb/c Nude mice by the generally accepted marker S100 left no doubt about the induction of malignant growth after transplantation of mitochondria isolated from human glioblastoma.

Conclusions. Parenteral implantation of mitochondria isolated from human glioblastoma in male Balb/c Nude mice Might cause the growth and development of extracranial foci of glioblastoma in animals.

Keywords:

mitochondria, glioblastoma, mitochondrial implantation, morphological study, experimental oncology

For citation: Kit O. I., Frantsiyants E. M., Shikhlyarova A. I., Neskubina I. V. Realization of malignant potential of human glioblastoma mitochondria in immunodeficient animals. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2023; 10(3): 55-68. (In Russ.). <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2023-10-3-5>, EDN: KZLERK

For correspondence: Irina V. Neskubina – Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher at Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation
Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation
E-mail: neskubina.irina@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>, SPIN: 3581-8531, AuthorID: 794688, Scopus Author ID: 6507509066, ResearcherID: AAG-8731-2019

Compliance with ethical standards: the ethical principles required by the World Medical Association Declaration of Helsinki (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ed. 2013) were observed in the work. Signed informed consent was obtained from the patient for the collection and transfer of biological material for scientific research, governmental assignments for public and socially beneficial purposes.

Work with animals was carried out in accordance with the rules of the European Convention for the Protection of Animals Used in Experiments (Directive 86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki, as well as in accordance with the "International Recommendations for Biomedical Research Using Animals" and Order of the Ministry of Health of Russia No. 267 of 19 June 2003 «On Approval of the Rules of Laboratory Practice». On December 24, 2019, the Commission on Bioethics of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia approved the study protocol (protocol of the ethical committee No. 15/75) for working with mice of the Balb/c Nude line.

Funding: this work was not funded.

Conflict of interest: the authors declare that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

The article was submitted 27.04.2023; approved after reviewing 11.08.2023; accepted for publication 28.08.2023.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Глиобластома (ГБ) остается одним из неизлечимых первичных злокачественных новообразований головного мозга и связано это с рядом факторов, к примеру, таким, как отсутствие единого целевого онкогенного пути, что является одной из причин, которые еще больше усложняют ее лечение и исследование [1]. ГБ всегда метастазирует за пределы центральной нервной системы (ЦНС). Однако, она может быть очень инвазивной в пределах паренхимы головного мозга, что серьезно ограничивает эффективность хирургического вмешательства и лучевой терапии [1].

Как и в других солидных опухолях, в ГБ присутствует нарушение физиологии митохондрий, которое считается ключевым фактором прогрессирования данной опухоли. Как митохондриальная функция, так и дисфункция играют важную роль в онкогенезе ГБ, поскольку митохондрии модулируют поддержание свойств стволовых клеток, покоя и дифференцировки ГБ, тогда как митохондриальные нарушения необходимы для разрешения устойчивости глиальных стволовых клеток к лечению. Субклеточное распределение митохондрий коррелирует с миграционными и инвазивными возможностями клеток ГБ [1]. Было показано, что антагонисты PI3K запускают транспорт энергетически активных удлинённых митохондрий в кортикальный цитоскелет опухолевых клеток. По-видимому, перемещенные митохондрии ускоряют динамику ламеллиподий, вызывают более активный оборот фокальных адгезивных комплексов, увеличивают скорость и расстояние миграции клеток, что в конечном итоге приводит к более высоким показателям инвазии клеток ГБ [2]. Митохондрии поддерживают инвазивность ГБ не только за счет снабжения аденозин трифосфатом (АТФ), но и за счет контроля экспрессии поверхностных гликанов в стволовых клетках глиомы. Мутации в генах, кодирующих компоненты митохондриальных белковых комплексов, могут приводить к повышенной выработке супероксидного радикала, что приводит к устойчивым АФК-зависимым онкогенным путям и индукции митохондриальной ДНК. Эти изменения связаны с повышенным риском онкогенеза и метастазирования при глиобластоме [3].

Нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) у пациентов с метастазами и ГБ высокой степени злокачественности связано с нарушением, как эндотелиальных плотных контактов, так и взаимодействий астроцитов и эндотелиальных клеток. Нарушение ГЭБ также влияет на перитуморальный отек, развитие и прогрессирование опухоли. В дополнение к вышеупомянутым факторам, другие механизмы выхода злокачественных клеток включают сосудистую инвазию, лимфатическое рас-

пространение, периневральное распространение черепных нервов и прямую инвазию [4].

Суммируя предполагаемые препятствия для метастазирования ГБ следует отметить следующие особенности: защиту ГЭБ, отсутствие лимфатических метастазов, приписываемое отсутствию лимфатических каналов в системе ЦНС, подавление экстракраниального роста клеток ГБ иммунной системой и предположение о неспособности клеток ГБ проникать/разрушать внеклеточный матрикс других тканей, кроме тканей головного мозга [5]. Однако и эти факты в литературе оспариваются. Во-первых, экспериментальные данные доказывают, что ГЭБ неэффективно блокирует перенос клеток за пределы внутричерепного пространства, а кровеносные сосуды ГБ скомпрометированы вставками дифференцированных мезинхимальных стволовых клеток (перицитов), ассоциированных с раком фибробластов (КАФ), и даже самих раковых клеток, имитирующих эндотелиальные клетки. Во-вторых, в ЦНС мышей и человека была обнаружена функциональная выстилка лимфатических сосудов, состоящая из типичных эндотелиальных синусов твердой мозговой оболочки, ведущих к глубокому шейным лимфатическим узлам [6].

В последнее время, в связи с ростом заболеваемости глиомой и достижениями в их диагностике [7], количество сообщений о пациентах ГБ с экстракраниальными метастазами постепенно увеличивается. Так, в статье Размологовой О. Ю. и Соколовой Т. В. (2013) представлен случай метастазирования глиобластомы у женщины 64 лет, умершей в раннем послеоперационном периоде после удаления опухоли. Метастазы в легких были диагностированы при аутопсии. Фактором, способствующим экстракраниальному экстракраниальному гематогенному распространению опухолевого процесса, явилась опухолевая инвазия верхнего сагиттального синуса – крупного венозного коллектора, имеющего сброс крови в систему верхней полой вены [8]. К сожалению, в отечественной литературе такие случаи единичны. В исследовании Chen J. и соавт. (2022) были рассмотрены и проанализированы клинические характеристики 15 пациентов ГБ с метастазами в позвоночник. Поскольку такие метастазы обычно возникают одновременно или последовательно с прогрессированием ГБ, они часто протекают бессимптомно или симптомы появляются поздно [9]. В мета-анализе Cunha и соавт. (2019) в 11 из 114 случаев метастатического поражения глиобластомы были метастазы в один орган, и только 12 случаев – метастазы ГБ в несколько очагов [10]. Наиболее частая первичная локализация ГБ с экстракраниальными метастазами – височная доля, а ее метастатические очаги включают легкие, плевру, лимфатические узлы, печень, кожу, волосистую часть

головы, околоушную железу, селезенку, поджелудочную железу, брыжейку кишечника, брюшину, эпидуральное пространство и кости, а также часто распространяется на мозговые оболочки или спинной мозг через спинномозговую жидкость [11, 12]. Liu J. и соавт. (2020) сообщили о 46-летнем мужчине с первичной ГБ без сопутствующих патологий, у которого развилась обширная внечерепная прогрессия и отдаленные метастазы [4]. Мультиформную глиобластому с метастазами в кожу описали и Nakib C. E. и соавт. (2022) [12].

Таким образом, к настоящему времени рассмотрено достаточно много случаев экстракраниального метастазирования ГБ, однако механизмы этого явления остаются плохо изученными. Очевидна и роль митохондрий в прогрессировании ГБ, при этом их участие в экстракраниальном метастазировании не известно.

Линейные животные широко используются в экспериментальной практике, во многих областях биологии и медицины [13–15]. Результаты исследований, выполненных на линейных животных, являются сопоставимыми и могут быть повторены в любое отдаленное время и в любом другом научном центре.

Выбор животного определяется видовой принадлежностью клеточного материала. Для исследования рекомендуется использовать иммунодефицитных животных. Наиболее предпочтительными моделями являются стандартные сертифицированные животные с генетически обусловленным иммунодефицитом – бестимусные мыши (голые мыши, Nude). Эти животные являются носителями аутосомно-рецессивной мутации, которая в гомозиготном состоянии приводит к отсутствию внутриутробной закладки тимуса и волосяных луковиц, в результате чего они дефицитны по Т-лимфоцитам и лишены шерстного покрова [16].

Целью исследования является получение экстракраниальных диффузных опухолевых очагов глиобластомы в организме мышей Balb/c Nude путем имплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение опухолевого материала

Во время операции краниотомии производили удаление у больной глиобластомы.

Часть опухоли быстро помещали в стерильный холодный раствор, содержащий 0,22 М маннитол, 0,3 М сахараза, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ TRIS-HCL, 10 мМ HEPES, pH 7,4.

Митохондрии выделяли с применением дифференциального центрифугирования на высокоскоростной рефрижераторной центрифуге Avanti J-E,

BECKMAN COULTER, USA по методу Егоровой М. В., Афанасьева С. А. (2011) [17] и Гуреева А. П. и соавт. (2015) [18]. Митохондриальные образцы разводили 0,9 % раствором NaCl до концентрации 3 мг белка в 0,4 мл физиологического раствора.

Для имплантации изолированных митохондрий глиобластомы использовали мышей-самцов линии Balb/c Nude, которые были получены из ФГБУ МНИЦ Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с 62 «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Все животные содержались в одинаковых условиях в стандартных пластиковых клетках при естественном освещении, температуре воздуха 22–26 °С и со свободным доступом к пище и воде. Животные ежедневно получали стандартный кормовой рацион и воду, проводили постоянное наблюдение с регулярным осмотром и взвешиванием. Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики.

Мышам-самцам линии Balb/c Nude ($N = 6$) с начальной массой 28,5–32,1 г внутрибрюшинно однократно имплантировали свежееизолированные митохондрии глиобластомы из расчета 3 мг белка на 1 животное в 0,4 мл физиологического раствора.

Контролем служили мыши-самцы линии Balb/c Nude ($N = 4$) с начальной массой 27–32,5 г, которым однократно внутрибрюшинно вводили 0,4 мл физиологического раствора.

Всех животных умерщвляли путем декапитации на гильотине через 17–21 дней после парентеральной имплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы, когда у животных появлялись следующие симптомы: потеря массы тела ≥ 25 % (таблица), вялость, шаткая походка.

Для изучения морфологических параметров использовали выделенные после декапитации мышей Balb/c Nude фрагменты/сектора тканей селезенки, брыжейки, лимфатического узла и фиксировали в 10 % нейтральном формалине. После парафиновой проводки блоки резали на микротоме толщиной 2–4 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и оценивали в проходящем свете при увеличении объектива $\times 5$, $\times 10$, $\times 100$, $\times 200$ (масляная иммерсия) с использованием микроскопа Axiovert (Carl Zeiss, Германия) и программы визуализации изображе-

ний Axiovision 4 (Carl Zeiss, Германия). Проводилось установление иммунофенотипа опухолевых клеток экспериментальных животных (ИГХ-маркеры: GFAP+, S100, ki-67, Grad4).

Характеристика больной. Больная Ч., 28.11.1958 г. рождения поступила в ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ России 30.09.2022 г. с жалобами на периодические головные боли, общую слабость.

Из анамнеза. В начале августа 2022 г. остро возникла слабость левых конечностей и лица. Госпитализирована в ГБУЗ «НИИ-Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С. В. Очаповского» Минздрава

России, где находилась с 31.08.2022 г. по 06.09.2022 г. Выполнено МРТ головного мозга с контрастным усилением с выраженными артефактами 01.09.2022 г.: объемное образование правой лобно-височно-подкорковой области 42 × 56 × 54 мм, смещение срединных структур – 10 мм. Самостоятельно обратилась в «НМИЦ онкологии». Рекомендовано хирургическое лечение в отделении нейрохирургии. МРТ головного мозга 14.09.2022 г.: срединные структуры смещены влево на уровне средне-черепной ямки до 5–6 мм. В подкорковых ядрах, островке, лобной и височных долях правого полушария выявлена зона распада.

Таблица. Динамика массы тела мышей-самцов линии Balb/c Nude после внутрибрюшинной имплантации митохондрии глиобластомы и органы поражения злокачественным процессом
Table. Dynamics of body weight of Balb/c Nude male mice after intraperitoneal implantation of glioblastoma mitochondria and organs affected by a malignant process

№	Масса тела животных (г) до опыта / Animal body weight (g) before experiment	Масса тела животных на 17-е сутки опыта / body weight of animals on the 17 th day of the experiment		Масса тела животных на 19-е сутки опыта / body weight of animals on the 19 th day of the experiment		Масса тела животных на 21-е сутки опыта / body weight of animals on the 21 st day of the experiment		Органы поражения / organs affected
		Абс. / Abs. (%)	Абс. / Abs.	Абс. / Abs. (%)	Абс. / Abs.	Абс. / Abs. (%)	Абс. / Abs.	
1	28,5	21,2 (25,6)		–	–	–	–	Лимфоузлы, селезенка, брыжейка / Lymph nodes, spleen, mesentery
2	29,0		28,1	20,4 (29,7)		–	–	Лимфоузлы, брыжейка / Lymph nodes, mesentery
3	31,0	23,3 (24,8)		–	–	–	–	Лимфоузлы, селезенка, брыжейка / Lymph nodes, spleen, mesentery
4	32,1		31,2	21,2 (32,0)		–	–	Лимфоузлы, брыжейка / Lymph nodes, mesentery
5	29,7		27,3	22,3 (24,9)		–	–	Лимфоузлы, селезенка, брыжейка / Lymph nodes, spleen, mesentery
6	30,1		29,5		27,3	20,1 (33,2)		Лимфоузлы, селезенка, брыжейка / Lymph nodes, spleen, mesentery
$M \pm m$	30,066 ± 0,539	22,25 ± 1,050	29,02 ± 0,855	21,3 ± 0,550				

Примечание: Абс. – масса тела животного в граммах; % – потеря массы тела на момент декапитации. Данные таблиц представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – стандартная ошибка среднего. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0.

Note: Abs. – body weight of the animal in grams; % – body weight loss at the moment of decapitation. Table data are presented as $M \pm m$, where M – arithmetic mean, m – standard error of the mean. Statistical analysis of the results was performed using Statistica 10.0 software package.

Компрессия 3-го и правого бокового желудочка мозга. Снижение субарахноидального пространства, боковой щели правого полушария. После внутривенного введения отмечается диффузное равномерное периферическое накопление контраста тканью опухоли в правом полушарии, размерами узла 45 × 60 мм. При DTI разрушение проводящих трактов на уровне опухоли, вовлечение в процесс правого кортико-спинального тракта, инфильтрация передних его отделов, большая часть тракта сдавлена. Боковые желудочки мозга ассиметричны, D < S, не расширены. IV желудочек не расширен. Очаг глиоза в левой лобной доли. Гиперостаз левой лобной кости. Дополнительных образований в области мосто-мозжечковых углов не выявлено. Орбиты и хиазмальная область без особенностей, гипофиз в размерах не увеличен, ткань гипофиза имеет обычный сигнал. Хиазмальная цистерна не расширена. Умеренное расширение большой мозговой и нижней ретроцеребральной цистерн. Остальные субарахноидальные пространства и борозды полушарий головного мозга нерезко неравномерно расширены. Боковые щели мозга ассиметричны, D < S. Миндалины мозжечка расположены на уровне большого затылочного отверстия краниовертебральный переход без особенностей.

Тяжесть пациента при поступлении: средняя.

Диагноз: глиальная опухоль правых лобных и височных долей головного мозга T3N1M0 с распространением в силвиев пакет, подкорковую область, стадия опухолевого процесса – IIIa. Клиническая группа 2.

Оперативное вмешательство: удаление новообразования больших полушарий головного мозга с применением микрохирургической техники.

Гистологическое исследование 111288–99 от 12.10.2022 г.: морфологическая картина характерна для глиобластомы, NOS, Grad4 (ВОЗ, 2016). Для уточнения иммунофенотипа опухолевых клеток и степени злокачественности рекомендуется иммуногистохимическое (ИГХ) исследование.

Иммуногистохимическое исследование 111294–95/22 от 20.10.2022 г.: морфологическая картина и иммунофенотип опухолевых клеток (GFAP+, S100, ki-67–15 %) характерные для глиобластомы, NOS, Grad4 (ВОЗ, 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При общем морфологическом исследовании препарата селезенки мышей Balb/c Nude после имплантации изолированных митохондрий глиобластомы отмечено сохранение общей архитектоники со значительным кровонаполнением, отвечающим кроветворному статусу органа (рис. 1 а, б). Красная пульпа селезенки мышей (N = 4) была представлена

расширенными венозными синусами и клеточными элементами, включая, главным образом, эритроциты и лимфоциты, а также лейкоциты, плазматические клетки, моноциты и макрофаги. Обращало на себя внимание реактивное состояние ретикулярной ткани, переходящей в ретикулярную строму мальпигиевых телец (белая пульпа селезенки), размеры и структура которых значительно варьировали по всей поверхности органа с доминированием крупных с расширенными герминативными центрами и узкими периферическими слоями иммунокомпетентных клеток.

Вместе с тем, были выявлены особые изменения, которые указывали на развитие патологического процесса. На множественных полях зрения отмечалось значительное расширение стромальных путей активной миграции атипичных клеток, принимающих форму рекрутированных фибробластов (рис. 1 в, г), а также образование тяжей из клеток, напоминающих мультиформную глиобластому (рис. 1 д, е).

Кроме того, отмечались скопления округлых атипичных лимфоцитоподобных клеток с выраженной гиперхромией ядер, а также множественные участки с гигантскими многоядерными клетками типа мегакариоцитов с характерными ядрами неправильной формы (рис. 1 ж, з). Обилие мегакариоцитов по всей поверхности препарата, как известно, служит косвенным подтверждением воздействия фактора опухолевой природы, который оказывает существенное гемолитическое влияние.

При морфологическом исследовании брыжейки и лимфоузлов на малом увеличении микроскопа (об. × 5), их структура не была патологически изменена и никаких аномальных макроконгломераций выявлено не было (рис. 2, 3 а, б). Однако при значительном приближении (об. × 10, × 40), были выявлены множественные участки с атипичными клетками, напоминающие мультиформную глиобластому, и локализирующиеся в фиброзных перегородках и синусах (рис. 3 в, г). Необычная тропность митохондрий глиобластомы к структурным элементам лимфоидной ткани проявлялась формированием стромальных клеток глиального характера в стенках трабекулярных синусов, лабиринтах лимфатических узлов и мозговых синусов, а также в окружении кровеносных сосудов (рис. 3 д, е). Помимо ретикулярной сети коллагеновых волокон и проводящей системы, возможность заселения имплантируемого опухолевого материала, состоящего из изолированных митохондрий, продемонстрирована на снимках перегородок брыжейки, которые, как хорошо известно, также включают помимо кровеносных сосудов и нейрональные структуры. В связи с этим, полученный эффект диффузного распространения митохондрий глиобластомы через фибробластический ретикулярный путь вполне соответствует существую-

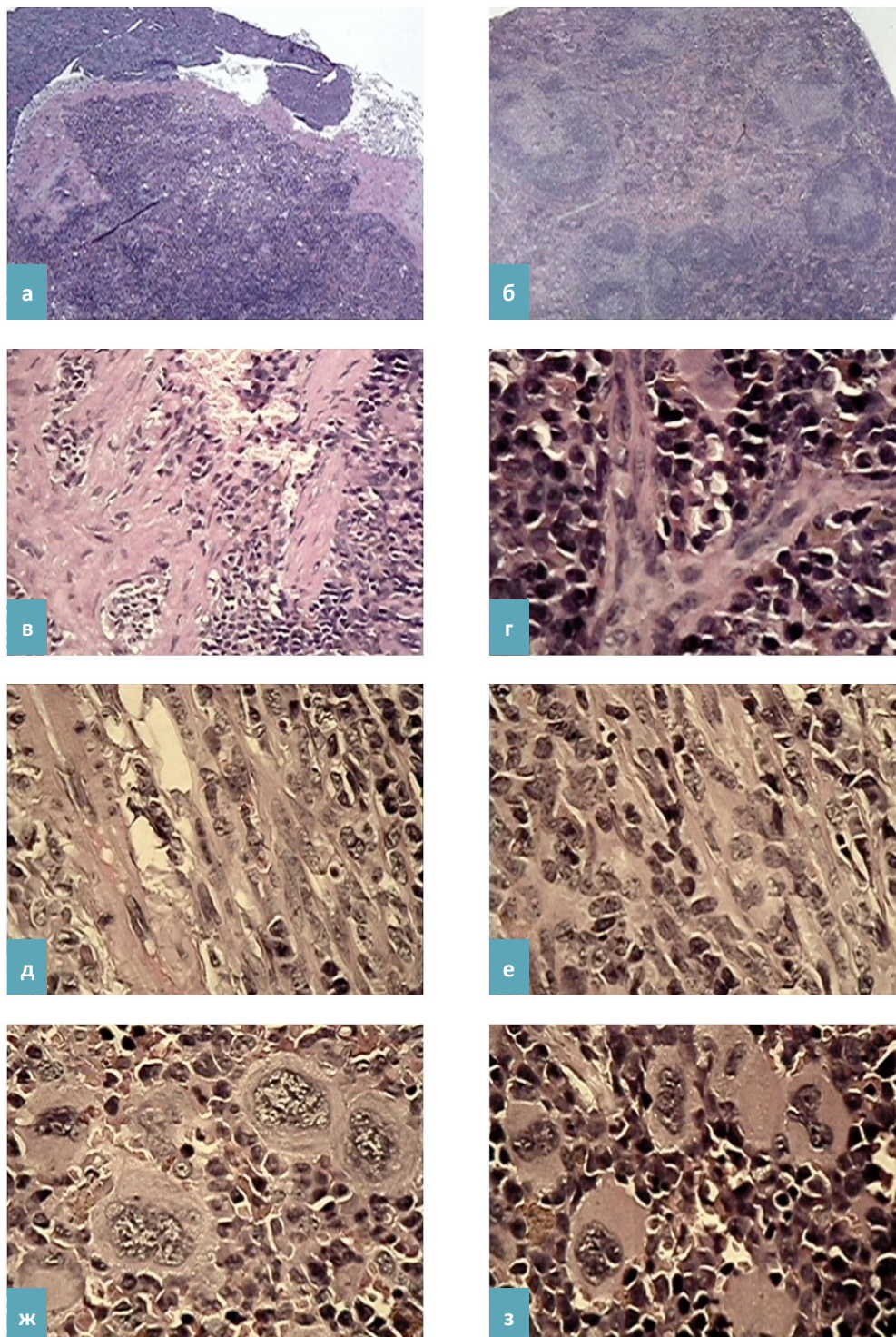


Рис. 1. Фрагменты селезенки мышей Balb/c Nude после введения изолированных митохондрий глиобластомы человека: а, б – частичное сохранение общей архитектоники с участками кровонаполнения, ув. $\times 5$; в–е – расширение стромальных путей миграции атипичных клеток, принимающих форму рекрутированных фибробластов и лимфоцитоподобных клеток, ув. $\times 40$, $\times 100$; ж, з – обилие мегакариоцитов, ув. $\times 100$. Окр. гематоксилин-эозином. Изображения типичны для каждого из 4 обследованных животных в группе.

Fig. 1. Fragments of the spleen of Balb/c Nude mice after injection of isolated mitochondria of human glioblastoma: а, б – partial preservation of the general architectonics with areas of blood filling, mag. $\times 5$; в–е – expansion of stromal migration pathways of atypical cells taking the form of recruited fibroblasts and lymphocyte-like cells, mag. $\times 40$, $\times 100$; ж, з – abundance of megakaryocytes, mag. $\times 100$. Hematoxylin-eosin staining. Images are typical for each of the 4 examined animals in the group.

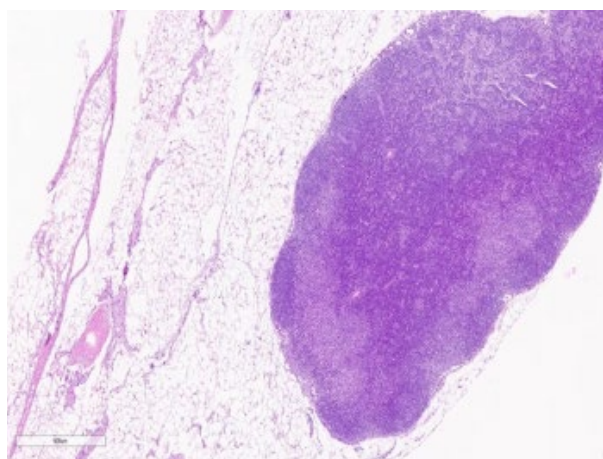


Рис. 2. Брыжейка и лимфатический узел мышей Balb/c Nude после введения изолированных митохондрий глиобластомы человека. Сохранение общей архитектоники лимфоузла с диффузными изменениями трабекулярных синусов, лабиринтов и мозговых синусов, ув. $\times 50$, окр. гематоксилин-эозин. Изображения типичны для каждого из 6 обследованных животных в группе.

Fig. 2. Mesentery and lymph node of Balb/c Nude mice after injection of isolated human glioblastoma mitochondria. Preservation of the overall architectonics of the lymph node with diffuse changes of the trabecular sinuses, labyrinths and cerebral sinuses, mag. $\times 50$. Hematoxylin-eosin staining. Images are typical for each of the 6 examined animals in the group.

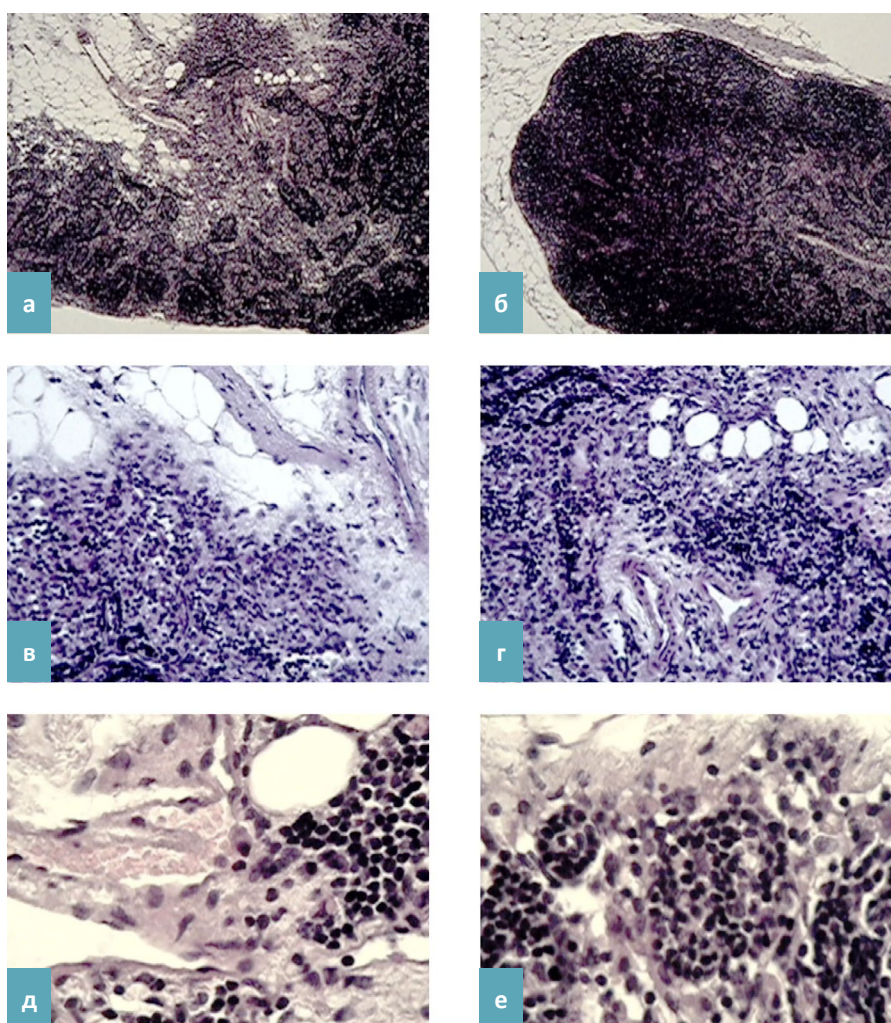


Рис. 3. Брыжейка и лимфатические узлы мышей Balb/c Nude после внутрибрюшинного введения изолированных митохондрий глиобластомы человека: а–г – локализация атипичных лимфоцитоподобных клеток в фиброзных перегородках и синусах лимфоузлов, ув. $\times 40$; д, е – кровенаполнение сосудов, диффузный рост мультиформных клеток глиобластомы в стромальных участках, ув. $\times 100$. Окр. гематоксилин-эозином. Изображения типичны для каждого из 6 обследованных животных в группе.

Fig. 3. Mesentery and lymph nodes of Balb/c Nude mice after intraperitoneal injection of isolated human glioblastoma mitochondria: a–g – localization of atypical lymphocyte-like cells in fibrous septa and sinuses of lymph nodes, mag. $\times 40$; d, e – blood filling of vessels, diffuse growth of glioblastoma multiforme cells in stromal areas, mag. $\times 100$. Hematoxylin-eosin staining. Images are typical for each of the 6 examined animals in the group.

щим представлениям о двусторонней связи нервной и иммунной систем, которая может трансформироваться как вариант патологического взаимодействия и демонстрировать вклад важнейших органоидов клеток глиобластомы в инициацию опухолевого роста.

Исходя из полученных данных о клинической картине глиобластомы больной Ч. 28.11.1958 г. рождения и установленного иммунофенотипа опухолевых клеток (ИГХ от 20.10.2022 г.: GFAP+, S100, ki-67–15 %, характерного для глиобластомы, NOS, Grad4), был проведен сравнительный иммуногистохимический анализ экспериментальных препаратов селезенки, брыжейки и лимфоузлов мышей Balb/c Nude, которым была осуществлена внутрибрюшинная трансплантация митохондрий, изолированных из глиобластомы пациентки Ч.

Об инициации диффузного роста клеток глиобластомы в стромальной части красной пульпы селезенки, не затрагивающего фолликулярные структуры белой пульпы, можно судить по определению экспрессии GFAP и ki-67.

На рис. 4 (а, б, в) представлены препараты, подтверждающие экспрессию GFAP при различном увеличении объектива.

Важным обстоятельством явилось то, что при увеличении $\times 200$ (рис. 4 в) четко прослеживается цитоплазматическая (а не ядерная) реакция в фиброзных перегородках селезенки мыши Balb/c Nude ($N = 4$), что подтверждает локализацию митохондрий именно в цитоплазме. Такая выраженная экспрессия GFAP свидетельствует о содержании маркера глиобластомы, который фиксировался и в препарате опухоли пациентки Ч. Следовательно, впервые можно было констатировать инициацию идентичного процесса канцерогенеза путем целенаправленного митохондриального заноса в экспериментальных условиях внутрибрюшинной трансплантации митохондрий из опухоли человека в организм животного.

Подобная иммуногистохимическая реакция была зафиксирована в селезенке мышей Balb/c Nude ($N = 4$) в отношении ki-67. Наиболее значительная экспрессия маркера регистрировалась в фиброзных перегородках (рис. 5 а), что характеризовало возможность опухолевого роста клеток глиобластомы, иницированного субклеточным носителем злокачественной митохондриальной ДНК. Мы полагаем, что подтверждением митохондриального канцерогенеза в стромальном

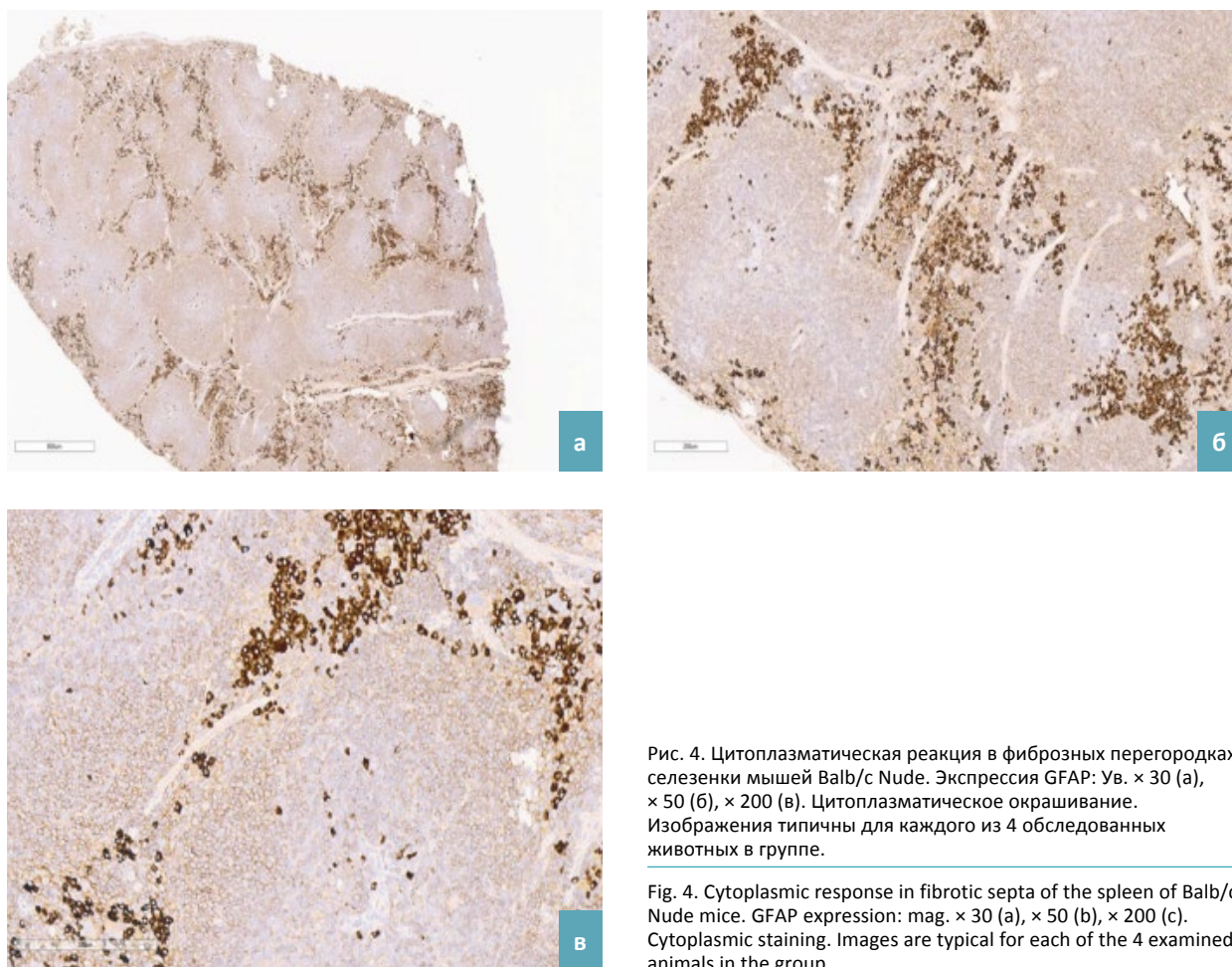


Рис. 4. Цитоплазматическая реакция в фиброзных перегородках селезенки мышей Balb/c Nude. Экспрессия GFAP: Ув. $\times 30$ (а), $\times 50$ (б), $\times 200$ (в). Цитоплазматическое окрашивание. Изображения типичны для каждого из 4 обследованных животных в группе.

Fig. 4. Cytoplasmic response in fibrotic septa of the spleen of Balb/c Nude mice. GFAP expression: mag. $\times 30$ (a), $\times 50$ (b), $\times 200$ (c). Cytoplasmic staining. Images are typical for each of the 4 examined animals in the group.

матрикс красной пульпы селезенки служит именно обнаруженное на препаратах цитоплазматическое, а не ядерное окрашивание, поскольку речь идет о митохондриальном компоненте цитоплазмы как носителе злокачественной генетической информации. На рис. 5 (б) при увеличении $\times 200$, нельзя ни отметить единообразие цитоплазматического окрашивания маркера ki-67 во всем опухолеобразующем пространстве фиброзных перегородок красной пульпы селезенки.

Дополнительное исследование иммунофенотипа клеток у мышей Balb/c Nude ($N = 4$) в селезенке, брыжейке и лимфоузлах по общепринятому маркеру S100 (рис. 6, 7) не оставляло сомнений в индукции злокачественного роста после трансплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы человека. Экспрессия маркера S100 отражала ведущую роль стромального и цитоплазматического звена в реализации митохондриального канцерогенеза.

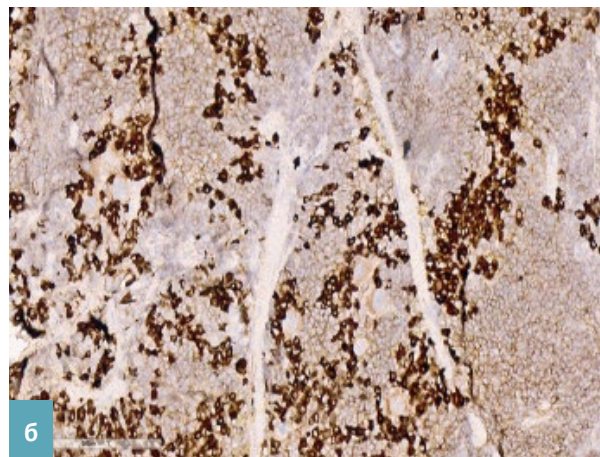
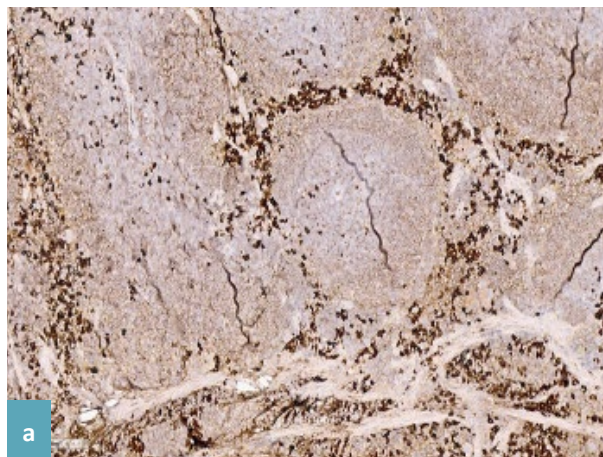


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция в фиброзных перегородках селезенки мышей Balb/c Nude. Экспрессия ki-67 при цитоплазматическом окрашивании атипичных клеток.: ув. $\times 50$ (а), $\times 200$ (б). Изображения типичны для каждого из 4 обследованных животных в группе.

Fig. 5. Immunohistochemical reaction in fibrotic septa of the spleen of Balb/c Nude mice. Expression of ki-67 in cytoplasmic staining of atypical cells.: mag. $\times 50$ (a), $\times 200$ (b). Images are typical for each of the 4 examined animals in the group.

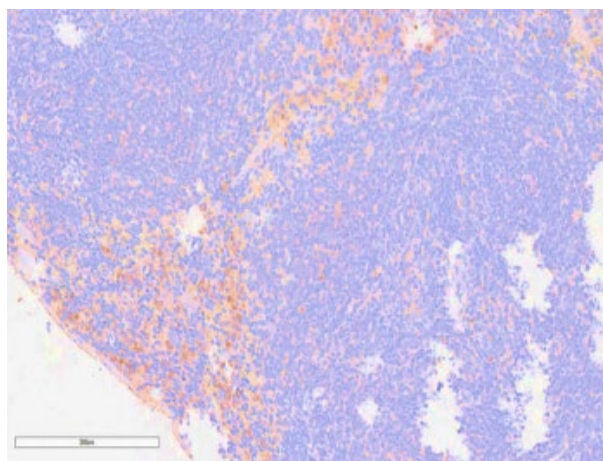


Рис. 6. Селезенка мыши Balb/c Nude после имплантации митохондрий, изолированных из клеток глиобластомы человека. Экспрессия S100. Ув. $\times 150$. Изображения типичны для каждого из 4 обследованных животных в группе.

Fig. 6. Spleen of Balb/c Nude mouse after implantation of mitochondria isolated from human glioblastoma cells. S100 expression. Mag. $\times 150$. Images are typical for each of the 4 examined animals in the group.

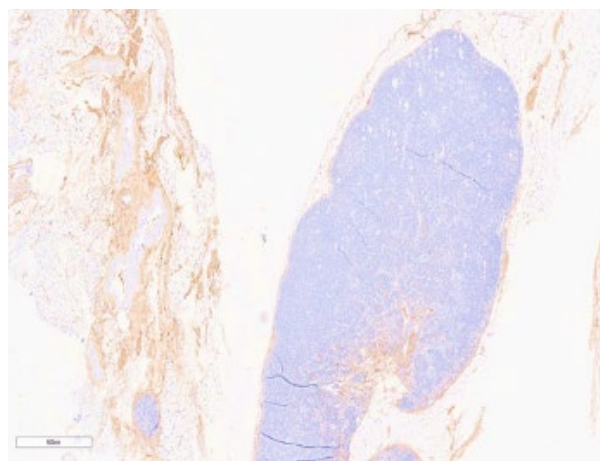


Рис. 7. Брыжейка и ткань лимфатического узла мыши Balb/c Nude после имплантации митохондрий, изолированных из клеток глиобластомы человека. Экспрессия S100. Ув. $\times 30$. Изображения типичны для каждого из 6 обследованных животных в группе.

Fig. 7. Mesentery and lymph node tissue of Balb/c Nude mouse after implantation of mitochondria isolated from human glioblastoma cells. S100 expression. Mag. $\times 30$. Images are typical for each of the 6 examined animals in the group.

Далее мы исследовали экспрессию маркеров GFAP, ki-67 в брыжейке и лимфатических узлах, как одних из часто встречаемых органов экстракраниального метастазирования глиобластомы и сопоставили с контролем.

На снимках брыжейки и лимфатического узла мыши Balb/c Nude после имплантации митохондрий глиобластомы человека четко определяется преимущественно центральная область расположения окрашенных гранул с соответствующим иммуногистохимическим профилем – GFAP и ki-67 (рис. 8, 9).

Так же, как и в селезенке мышей ($N = 4$), экспрессия маркеров регистрировалась в фиброзных перегородках центральной зоны мягкотных тяжей лимфатических узлов. Аналогичным образом на препаратах

обнаруживалось цитоплазматическое, а не ядерное окрашивание, что также указывало на свойственную митохондриям дислокацию в цитоплазме клетки и проявление канцерогенного влияния в виде переноса митохондриальной ДНК глиобластомы человека.

В качестве альтернативного примера цитоплазматического окрашивания иммуногистохимического маркера ki-67 приводим контрольный препарат метастатически пораженного лимфоузла, где со всей очевидностью проявляется злокачественное поражение герминативного центра фолликулов лимфоузлов (рис. 10), а не синусов и фиброзных перегородки с характерным ядерным окрашиванием.

В этом отношении, можно указать на несомненную важность ранее приведенных данных о наличии



Рис. 8. Брыжейка, ткань лимфатического узла, цитоплазматическая экспрессия GFAP в клетках, локализованных в синусах и фиброзных перегородках лимфатических узлов. Ув. $\times 30$. Изображения типичны для каждого из 6 обследованных животных в группе.

Fig. 8. Mesentery, lymph node tissue, cytoplasmic expression of GFAP in cells localised in sinuses and fibrous septa of lymph nodes. Mag. $\times 30$. Images are typical for each of the 6 examined animals in the group.

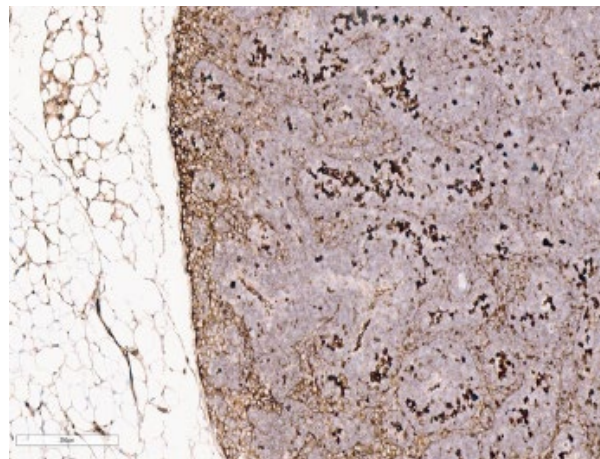


Рис. 9. Брыжейка, ткань лимфатического узла мыши Balb/c Nude после имплантации митохондрий, изолированных из клеток глиобластомы человека. Цитоплазматическая экспрессия ki-67. Ув. $\times 30$. Изображения типичны для каждого из 6 обследованных животных в группе.

Fig. 9. Mesentery, Balb/c Nude mouse lymph node tissue after implantation of mitochondria isolated from human glioblastoma cells. Cytoplasmic expression of ki-67. Mag. $\times 30$. Images are typical for each of the 6 examined animals in the group.

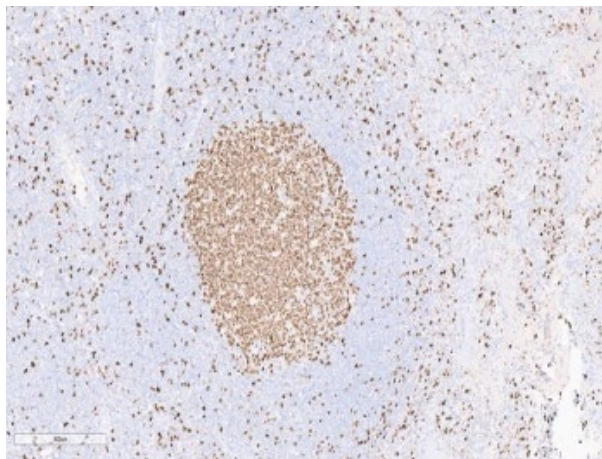


Рис. 10. Контрольный образец лимфатического узла для ki-67 с типичным ядерным окрашиванием герминативного центра фолликула, ув. $\times 200$.

Fig. 10. Control lymph node sample for ki-67 with typical nuclear staining of the germinal centre of the follicle, mag. $\times 200$

функциональной выстилки лимфатических сосудов, состоящей из типичных эндотелиальных синусов твердой мозговой оболочки, ведущих к глубоким шейным лимфатическим узлам [6]. Такое сродство структурных элементов тканей демонстрирует высокую вероятность межклеточного взаимодействия и подтверждает возможность метастазирования ГБ в другие лимфоидные органы. Безусловным фактором индукции митохондриями ГБ диффузного роста опухоли являются и кровеносные сосуды ГБ, которые, как уже отмечалось, скомпрометированы вставками дифференцированных мезенхимальных стволовых клеток (перицитов), ассоциированных с раком фибробластов (КАФ) и даже самих раковых клеток, имитирующих эндотелиальные клетки.

Высокая миграционная активность митохондрий ГБ и способность к транслокации с использованием механизмов рекрутизации фибробластических элементов соединительной ткани, по-видимому, представляет ранее неизвестный путь злокачественного метастазирования, опосредованного насыщением внутренних сред организма клеточными подсистемами, такими как архейоподобные генетически трансформированные и/или прокариоподобные митохондриальные подсистемы. Приобретенная само-

стоятельность онкогенных субклеточных носителей митохондриальной ДНК способствует ускоренному доступу и поражению органов, более выраженному, чем у целых злокачественных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что применение парентеральной имплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы человека, у мышей-самцов линии Balb/c Nude вызывает рост и развитие в организме животных экстракраниальных очагов глиобластомы. Это дает возможность создать модель для изучения патогенеза злокачественного роста под влиянием трансплантации митохондрий, изолированных из глиобластомы человека, и механизм митохондриального воздействия, вызывающего развитие экстракраниальных опухолевых очагов (метастазов) глиобластомы человека, что важно для клиники, так как показывает новый, ранее неизвестный механизм диссеминации глиобластом, доказанный при морфологическом исследовании. Это ранее не известный факт в экспериментальной онкологии, позволяющий проводить изучение новых свойств митохондрий клеток глиобластомы человека.

Список источников

- Iranmanesh Y, Jiang B, Favour OC, Dou Z, Wu J, Li J, Sun C. Mitochondria's Role in the Maintenance of Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front. Oncol.* 2021;11:101. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.582694>
- Altieri DC. Mitochondrial Dynamics and Metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019;76:827–835. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2961-2>
- Raimondi V, Ciccarese F, Ciminale V. Oncogenic pathways and the electron transport chain: a dangerous liaison. *Br J Cancer.* 2020;122(2):168–181. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0651-y>
- Liu J, Shen L, Tang G, Tang S, Kuang W, Li H, et al. Multiple extracranial metastases from glioblastoma multiforme: a case report and literature review. *J Int Med Res.* 2020;48(6):300060520930459. <https://doi.org/10.1177/0300060520930459>
- Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol.* 2020;60:262–273. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.010>
- Carvalho JADV, Barbosa CCL, Feher O, Maldaun MVC, Camargo VP, Moraes FY, Marta GN. Systemic dissemination of glioblastoma: literature review. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2019 Mar;65(3):460–468. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.460>
- Кит О. И., Водолажский Д. И., Росторгуев Э. Е., Франциянц Е. М., Панина С. Б. Молекулярно-генетические маркеры глиом. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017;35(4):132–140. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-4-132-140>
- Размологова О. Ю., Соколова Т. В. Редкий случай метастазирования глиобластомы в легкие. *Архив патологии.* 2013;75(4):34–36.
- Chen J, Shi Q, Li S, Zhao Wu, Huang H. Clinical characteristics of glioblastoma with metastatic dissemination in the spine. *Ann Palliat Med.* 2022;11(2):506–512. <https://doi.org/10.21037/apm-21-3387>
- Cunha MLVD, Maldaun MVC. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras.* 2019;65(3):424–433. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.424>
- Козлова М. Б., Франциянц Е. М., Салатова А. М., Комарова Е. Ф., Погорелова Ю. А. Первичные опухоли и их метастазы в головной мозг: особенности влияния на системный статус тиреоидных гормонов и кортизола. *Фундаментальные исследования.* 2014;7-1:81–86.
- Nakib CE, Hajjar R, Zerdan MB, Darwish H, Zeidan Y, Alame S, Kassouf HK, Chamseddine N, Assi HI. Glioblastoma multiforme metastasizing to the skin, a case report and literature review. *Radiol Case Rep.* 2021 Nov 11;17(1):171–175. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2021.10.029> . Erratum in: *Radiol Case Rep.* 2023 Mar;18(3):1387–1388.

13. Кит О. И., Шихлырова А. И., Франциянц Е. М., Нескубина И. В., Каплиева И. В., Гончарова А. С., и др. Процессы самоорганизации митохондрий при росте экспериментальных опухолей в условиях хронической нейрогенной боли. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2019;2(202):97–105.
14. Кит О. И., Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Трепитаки Л. К., Котиева И. М. Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы B16 у мышей. Патент на изобретение RU 2650587 C1, 16.04.2018. Заявка № 2017114818 от 26.04.2017.
15. Frantsiyants EM, Neskubina IV, Shikhlyarova AI, Engibaryan MA, Vashchenko LN, Surikova EI et al. Content of apoptosis factors and self-organization processes in the mitochondria of heart cells in female mice C57BL/6 under growth of melanoma B16/F10 linked with comorbid pathology. *Cardiometry*. 2021;18:121–130.
16. Lewis AM Jr. Regulatory implications of neoplastic cell substrate tumorigenicity. U. S. Food and Drug Administration. 2005, 31p.
17. 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.
18. 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.

References

1. Iranmanesh Y, Jiang B, Favour OC, Dou Z, Wu J, Li J, Sun C. Mitochondria's Role in the Maintenance of Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front. Oncol*. 2021;11:101. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.582694>
2. Altieri DC. Mitochondrial Dynamics and Metastasis. *Cell. Mol. Life Sci*. 2019;76:827–835. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2961-2>
3. Raimondi V, Ciccarese F, Ciminale V. Oncogenic pathways, and the electron transport chain: a dangerROS liaison. *Br J Cancer*. 2020;122(2):168–181. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0651-y>
4. Liu J, Shen L, Tang G, Tang S, Kuang W, Li H, et al. Multiple extracranial metastases from glioblastoma multiforme: a case report and literature review. *J Int Med Res*. 2020;48(6):300060520930459. <https://doi.org/10.1177/0300060520930459>
5. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:262–273. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.010>
6. Carvalho JADV, Barbosa CCL, Feher O, Maldaun MVC, Camargo VP, Moraes FY, Marta GN. Systemic dissemination of glioblastoma: literature review. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2019 Mar;65(3):460–468. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.460>
7. Kit OI, Vodolazhsky DI, Rostorguev EE, Frantsiyants EM, Panina SB. Molecular markers of gliomas. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017;32(4):180–190. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-4-132-140>
8. Razmologova Olu, Sokolova TV. A rare case of glioblastoma metastasis to the lung. *Archive of Pathology*. 2013;75(4):34–36. (In Russ.).
9. Chen J, Shi Q, Li S, Zhao Wu, Huang H. Clinical characteristics of glioblastoma with metastatic dissemination in the spine. *Ann Palliat Med*. 2022;11(2):506–512. <https://doi.org/10.21037/apm-21-3387>
10. Cunha MLVD, Maldaun MVC. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras*. 2019;65(3):424–433. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.424>
11. Kozlova MB, Frantsiyants EM, Salatova AM, Komarova EF, Pogorelova YA. Primary tumors and their metastases to the brain: particularities of influence on the systemic status of thyroid hormones and cortisol. *Fundamental Research*. 2014;7-1:81–86. (In Russ.).
12. Nakib CE, Hajjar R, Zerdan MB, Darwish H, Zeidan Y, Alame S, Kassouf HK, Chamseddine N, Assi HI. Glioblastoma multiforme metastasizing to the skin, a case report and literature review. *Radiol Case Rep*. 2021 Nov 11;17(1):171–175. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2021.10.029> . Erratum in: *Radiol Case Rep*. 2023 Mar;18(3):1387–1388.
13. Kit OI, Shikhlyarova AI, Frantsiyants EM, Neskubina IV, Kaplieva IV, Goncharova AS, et al. Processes of mitochondrial self-organization in experimental tumor growth with chronic neurogenic pain. *News of higher educational institutions. The North Caucasus region. Series: Natural Sciences*. 2019;2(202):97–105. (In Russ.).
14. Kit OI, Frantsiyants EM, Kaplieva IV, Trepitaki LK, Kotieva IM. A method of modification by chronic pain of malignant growth of melanoma B16 in mice. Patent for the invention RU 2650587 C1, 04/16/2018. Application no. 2017114818 dated 04/26/2017. (In Russ.).
15. Frantsiyants EM, Neskubina IV, Shikhlyarova AI, Engibaryan MA, Vashchenko LN, Surikova EI et al. Content of apoptosis factors and self-organization processes in the mitochondria of heart cells in female mice C57BL/6 under growth of melanoma B16/F10 linked with comorbid pathology. *Cardiometry*. 2021;18:121–130.
16. Lewis AM Jr. Regulatory implications of neoplastic cell substrate tumorigenicity. U. S. Food and Drug Administration. 2005, 31p.
17. Egorova MV, Afanasyev SA. Isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and human: modern methodical approaches. *Siberian Medical Journal*. 2011;26(1–1):22–28. (In Russ.).
18. Gureev AP, Kokina AV, Syromyatnikova MYu, Popov VN. Optimization of methods for isolating mitochondria from different mouse tissues. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2015;4:61–65. (In Russ.).

Информация об авторах:

Кит Олег Иванович – академик РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN: 1728-0329, AuthorID: 343182, Scopus Author ID: 55994103100, ResearcherID: U-2241-2017

Франциянц Елена Михайловна – д.б.н., профессор, заместитель генерального директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN: 9427-9928, AuthorID: 462868, Scopus Author ID: 55890047700, ResearcherID: Y-1491-2018

Шихлярова Алла Ивановна – д.б.н., профессор, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>, SPIN: 3581-8531, Author ID: 482103, Scopus Author ID: 6507723229, ResearcherID: Y-6275-2018

Нескубина Ирина Валерьевна [✉] – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN: 3581-8531, Author ID: 794688, Scopus Author ID: 6507509066, ResearcherID: AAG-8731-2019

Information about authors:

Oleg I. Kit – Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor, General Director of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN: 1728-0329, AuthorID: 343182, Scopus Author ID: 55994103100, ResearcherID: U-2241-2017

Elena M. Frantsiyants – Dr. Sci. (Biology), Professor, Deputy General Director for Science of National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN: 9427-9928, AuthorID: 462868, Scopus Author ID: 55890047700, ResearcherID: Y-1491-2018

Alla I. Shikhlyarova – Dr. Sci. (Biology), Dr. Sci. (Biology), Professor, Senior Researcher at Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>, SPIN: 6271-0717, Author ID: 482103, Scopus Author ID: 6507723229, ResearcherID: Y-6275-2018

Irina V. Neskubina [✉] – Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher at Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN: 3581-8531, Author ID: 794688, Scopus Author ID: 6507509066, Researcher ID: AAG-8731-2019

Вклад авторов:

Кит О. И. – научное редактирование;
Франциянц Е. М. – написание текста, анализ и интерпретация данных;
Шихлярова А. И. – научное редактирование;
Нескубина И. В. – техническое редактирование, оформление библиографии.

Contribution of the authors:

Kit O. I. – scientific editing;
Frantsiyants E. M. – text writing, data analysis and interpretation;
Shikhlyarova A.I. – scientific editing;
Neskubina, I. V. – technical editing, bibliography design.