

## ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПО ГЕНУ УРОКИНАЗЫ НА УРОВЕНЬ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В ТКАНЯХ МЫШЕЙ – НОСИТЕЛЕЙ МЕЛАНОМЫ

Елена Михайловна ФРАНЦИЯНЦ, Ирина Викторовна КАПЛИЕВА,  
Екатерина Игоревна СУРИКОВА, Ирина Валерьевна НЕСКУБИНА,  
Валерия Ахтямовна БАНДОВКИНА, Лидия Константиновна ТРЕПИТАКИ,  
Юлия Александровна ПОГОРЕЛОВА, Людмила Анатольевна НЕМАШКАЛОВА

*Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России  
344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63, корп. 8*

Цель исследования – изучить динамику биогенных аминов в головном мозге, опухоли и коже на 21-е сутки развития меланомы B16/F10 у мышей с нокаутом по гену урокиназы (uPA). **Материал и методы.** Исследование проведено на разнополых мышях с нокаутом по гену uPA (–uPA,  $n = 38$ ) и животных дикого типа (+uPA,  $n = 61$ ). Меланому перевивали подкожно. Методом ИФА определяли содержание биогенных аминов в тканях, изъятых на 21-е сутки канцерогенеза. **Результаты и их обсуждение.** У интактных (–uPA) мышей было повышено суммарное содержание биогенных аминов: в коже – за счет роста уровня норадреналина в 4,8 раза у самцов и в 4,9 раза у самок, гистамина – в 3,6 раза у самцов и в 1,6 раза у самок, серотонина – в 3,4 раза у самцов и в 8,3 раза у самок; в головном мозге – за счет роста концентрации норадреналина в 3,5 раза у самцов и в 3,2 раза у самок, дофамина – в 2,1 раза у самцов и в 2,9 раза у самок, при этом содержание гистамина падало. Отличительными чертами развития меланомы у (–uPA) мышей были: меньший уровень адреналина на фоне более высокой концентрации норадреналина и увеличения метаболизма серотонина в головном мозге; большая концентрация гистамина в опухоли и больший уровень серотонина в коже; идентичное (+uPA) мышам содержание адреналина (самцы) и норадреналина (все) в опухоли и большие уровни адреналина в опухоли и гистамина в коже у (–uPA) самок. **Заключение.** Нокаут по гену uPA ограничивает развитие стресса на центральном регуляторном уровне путем формирования меньшего уровня адреналина на фоне увеличения серотонинергической медиации в головном мозге, а также модулирует иммунный противоопухолевый ответ за счет больших уровней гистамина в опухоли и серотонина в коже, вследствие меньшей активности моноаминоксидазы, у мышей – носителей меланомы B16/F10.

**Ключевые слова:** биогенные амины, кожа, меланома, головной мозг, нокаут по гену uPA, мыши.

**Конфликт интересов.** Авторы отрицают наличие конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Нескубина И.В., e-mail: kaplirina@yandex.ru

**Для цитирования:** Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Бандовкина В.А., Трепитаки Л.К., Погорелова Ю.А., Немашкалова Л.А. Влияние нокаута по гену урокиназы на уровень биогенных аминов в тканях мышей – носителей меланомы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 22–30. doi: 10.15372/SSMJ20190603

## EFFECT OF UROKINASE GENE KNOCKOUT ON TISSUE LEVELS OF BIOGENIC AMINES IN MICE WITH MELANOMA

Elena Mikhaylovna FRANTSIYANTS, Irina Viktorovna KAPLIEVA,  
Ekaterina Igorevna SURIKOVA, Irina Valerievna NESKUBINA,  
Valeriya Akhtyamovna BANDOVKINA, Lidia Konstantinovna TREPITAKI,  
Yuliya Aleksandrovna POGORELOVA, Lyudmila Anatolievna NEMASHKALOVA

*Rostov Research Institute of Oncology  
344037, Russia, Rostov-on-Don, 14 line, 63, bldg. 8*

The research aim was to study the dynamics of biogenic amines in the brain, tumor and intact skin of urokinase (uPA) gene knockout mice on day 21 of the B16/F10 melanoma growth. **Material and methods.** The study included male and female uPA gene knockout (–uPA,  $n = 38$ ) and wild type mice (+uPA,  $n = 61$ ). Melanoma was transplanted subcutaneously. Levels of biogenic amines were studied by ELISA in tissues obtained on day 21 of carcinogenesis.

**Results and discussion.** Intact (–uPA) mice showed an increased total content of biogenic amines: in the skin – due to noradrenaline increase by 4.8 times in males and by 4.9 times in females, histamine – by 3.6 times in males and by 1.6 times ( $p < 0.05$ ) in females, serotonin – by 3.4 times in males and by 8.3 times in females; in the brain – due to noradrenaline increase by 3.5 times in males and by 3.2 times in females, dopamine by 2.1 times in males and by 2.9 times in females, while histamine content decreased. Melanoma development in (–uPA) mice was characterized by: lower levels of adrenaline with high NA concentrations and an increase in the serotonin metabolism in the brain; higher histamine concentrations in the tumor and higher serotonin levels in the skin; similar to (+uPA) mice levels of adrenaline (males) and noradrenaline in the tumor and higher levels of adrenaline in the tumor and histamine in the skin in (–uPA) females. **Conclusions.** The uPA gene knockout limits the development of stress at the central regulatory level due to lower levels of A together with increasing serotonergic mediation in the brain, as well as modulates the immune antitumor response due to higher levels of histamine in the tumor and 5 serotonin in the skin, as a result of lower monoamine oxidase activity, in mice with B16/F10 melanoma.

**Key words:** biogenic amines, skin, melanoma, brain, uPA gene knockout, mice.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Contact person:** Neskubina I.V., e-mail: kaplirina@yandex.ru

**For citation:** Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Surikova E.I., Neskubina I.V., Bandovkina V.A., Trepitaki L.K., Pogorelova Yu.A., Nemashkalova L.A. Effect of urokinase gene knockout on tissue levels of biogenic amines in mice with melanoma. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 22–30. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190603

Меланома – это сложное заболевание с этиологическими, гистологическими, генетическими особенностями и разными терапевтическими реакциями. Модели мышей с измененным геномом являются важным инструментом для изучения молекулярных механизмов развития меланомы [13]. Динамическое развитие генной инженерии позволяет расширить информацию о роли тех или иных генов в канцерогенезе и прогрессировании злокачественного процесса.

Известно, что в коже, одном из самых объемных барьерных «органов» нейроэктодермального происхождения, синтезируются биогенные амины, которые местно участвуют в различных физиологических и патологических процессах. Установлено, что серотонин индуцирует меланогенез в клетках меланомы кожи SK-MEL-2 и B16/F10 [8, 18]. Рецептор гистамина HR4 играет решающую роль в регуляции пролиферации и прогрессировании меланомы человека, поэтому считается, что гистамин может использоваться в комбинированной терапии для повышения эффективности при ее лечении [9, 10]. Высокая концентрация катехоламинов в зоне роста злокачественных опухолей на ранних стадиях канцерогенеза, так же как и в период эмбрионального развития, способствует выживанию и пролиферации неопластических клеток в условиях гипоксии [5]. Клетки меланомы экспрессируют β-адренергические рецепторы, которые, в свою очередь, активируются при метастатической меланоме [4]. Уровень дофамина в коже коррелирует с частотой возникновения в ней меланоцитарных и немеланоцитарных опухолей [17].

Также доказано участие системы «uPA – рецептор uPA» в образовании опухолей. У мышей с дефицитом uPA замедляется прогрессирование меланомы. В клетках рака молочной железы РНК-опосредованное ингибирование как uPA, так и рецептора uPA одновременно запускает апоптоз через активацию каспазы. Несмотря на то, что обе системы (активации плазминогена и биогенных аминов) отмечены в патогенезе меланомы, данные о взаимном влиянии компонентов этих систем друг на друга в настоящий момент отсутствуют.

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики биогенных аминов в головном мозге, опухоли и коже на 21-е сутки развития меланомы B16/F10 у мышей с нокаутом по гену uPA.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 99 мышах. 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 Приказе Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики», одобрены биоэтическим комитетом по работе с животными ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, протокол № 4 от 10.08.2018.

Мыши линии C57BL/6-PlautmI.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu ( $n = 38$ , в том числе 19 самцов и 19 самок) получены из питомника лабораторных животных «Пушино»; 24 животных с нокаутом uPA (-uPA) составили основную группу, 14 (-uPA) мышей служили интактным контролем к ним. Мыши линии C57BL/6 ( $n = 61$ , в том числе 32 самца и 29 самок) получены из ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА, 47 животных этой линии (+uPA) составили группу сравнения, 14 (+uPA) мышей служили им интактным контролем.

Меланому B16/F10, полученную из ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, перевивали под кожу правой подлопаточной области в объеме 0,5 мл (разведение 1 : 10, физиологический раствор), пролиферативный пул опухолей – 71,6 %. Материал для перевивки получали от мышей-доноров линии C57BL/6 на 12–16-е сутки развития опухолей. Головной мозг, опухоль и кожу изымали для исследований на 21-й день канцерогенеза после декапитации мышей на гильотине. Все манипуляции с извлеченными тканями проводили на льду. Из тканей получали 10%-е цитозольные фракции, приготовленные на содержащем 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7,4, в которых с помощью стандартных тест-систем для определения адреналина, норадреналина, дофамина, гистамина, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5ОИУК) в тканях у мышей методом ИФА («Cusabio», Китай) определяли со-

держание биогенных аминов и 5ОИУК с соблюдением всех методических рекомендаций производителя.

Переменные представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ( $M \pm SD$ ), после проверки на нормальность распределения для оценки различий между группами использовали критерий Манна – Уитни либо  $t$ -критерий Стьюдента. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы ( $p$ ) принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Интактная кожа.** В коже (-uPA) мышей обоего пола был выше, чем в коже (+uPA) животных, уровень ряда биогенных аминов: норадреналина – в 4,8 раза у самцов и в 4,9 раза у самок, гистамина – в 3,6 раза у самцов и в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) у самок, серотонина – в 3,4 раза у самцов и в 8,3 раза у самок (табл. 1). По содержанию 5ОИУК статистически значимых различий не выявлено. Концентрация адреналина в интактной коже (-uPA) самцов была такой же, как у (+uPA) мышей, а у (-uPA) самок была больше в 2,6 раза. По уровню дофамина (-uPA) и (+uPA) самки не различались, у (-uPA) самцов он был меньше в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ); гендерных различий для дофамина не обнаружено (см. табл. 1). Суммарное содержание биогенных аминов в коже интактных (-uPA) мышей было выше, чем в коже интактных (+uPA) животных, – в 3,3 раза у самцов ( $2101,2 \pm 154,3$  и  $617,2 \pm 52,1$  нг/г ткани со-

Таблица 1. Содержание биогенных аминов в коже и опухоли у (-uPA) мышей-носителей меланомы

Table 1. Biogenic amine content in the skin and tumor of (-uPA) mice with melanoma

Содержание биогенного амина	Кожа интактных мышей		Мыши с меланомой B16/F10			
			Кожа		Опухоль	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Адреналин, нг/г ткани	2,7 ± 0,2	8,4 ± 0,7 <sup>#,Δ</sup>	3,5 ± 0,3 <sup>Δ</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>#,Δ</sup>	5,3 ± 0,5*	6,3 ± 0,4 <sup>*,Δ</sup>
Норадреналин, нг/г ткани	17,8 ± 1,2 <sup>Δ</sup>	28,7 ± 2,1 <sup>#,Δ</sup>	15,1 <sup>Δ</sup> ± 1,2	6,6 ± 0,5 <sup>*,#</sup>	13,7 ± 2,4	11,4 ± 1,1*
Дофамин, нг/г ткани	31,1 ± 2,8 <sup>Δ</sup>	33,3 ± 2,8	33,4 ± 4,4 <sup>Δ</sup>	77,4 ± 6,3 <sup>*,#</sup>	65,9 ± 5,4 <sup>*,+,Δ</sup>	53,6 ± 4,8 <sup>*,+</sup>
Гистамин, нг/г ткани	2047,2 ± 186,3 <sup>Δ</sup>	2130,1 ± 195,2 <sup>Δ</sup>	2130,1 ± 187,2	2104,8 ± 18,9 <sup>Δ</sup>	238,4 ± 19,6 <sup>*,+,Δ</sup>	200,7 ± 18,3 <sup>*,+,Δ</sup>
Серотонин, нг/г ткани	2,4 ± 0,3 <sup>Δ</sup>	3,4 ± 0,3 <sup>Δ</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>*,Δ</sup>	0,51 ± 0,0 <sup>*,Δ</sup>	0,70 ± 0,1 <sup>*,+</sup>	3,2 ± 0,4 <sup>*,#</sup>
5ОИУК, мкг/г ткани	0,40 ± 0,02	0,26 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,40 ± 0,03 <sup>Δ</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>#,Δ</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>*,+</sup>	0,28 ± 0,02

Примечание. Обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей: \* – кожи интактных (-uPA) мышей соответствующего пола, + – кожи (-uPA) мышей с меланомой B16/F10 соответствующего пола, # – самцов той же группы, Δ – (+uPA) мышей.

Таблица 2. Содержание биогенных аминов в коже и опухоли у (+uPA) мышей – носителей меланомы

Table 2. Levels of biogenic amines in the skin and tumors of (+uPA) mice with melanoma

Содержание биогенного амина	Кожа интактных мышей		Мыши с меланомой B16/F10			
			Кожа		Опухоль	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Адреналин, нг/г ткани	2,9 ± 0,25	3,2 ± 0,3	19,5 ± 1,8*	3,0 ± 0,3 <sup>#</sup>	5,1 ± 0,4* <sup>+</sup>	4,2 ± 0,4* <sup>+</sup>
Норадреналин, нг/г ткани	3,7 ± 0,35	5,8 ± 0,5 <sup>#</sup>	27,4* ± 2,5	8,5 ± 0,8* <sup>#</sup>	12,7 ± 1,3* <sup>+</sup>	12,6 ± 1,2* <sup>+</sup>
Дофамин, нг/г ткани	45,3 ± 4,2	30,9 ± 2,8 <sup>#</sup>	56,2 ± 5,1	26,4 ± 2,4 <sup>#</sup>	38,8 ± 4,1 <sup>+</sup>	64,3 ± 6,1* <sup>+</sup> <sup>#</sup>
Гистамин, нг/г ткани	564,6 ± 52,1	1357,7 ± 105,0	1734,5 ± 168,0*	1135,1 ± 97,0 <sup>#</sup>	67,2 ± 9,1* <sup>+</sup>	109,3 ± 9,8* <sup>+</sup> <sup>#</sup>
Серотонин, нг/г ткани	0,71 ± 0,06	0,41 ± 0,04 <sup>#</sup>	0,28 ± 0,02*	0,38 ± 0,02	1,10 ± 0,20* <sup>+</sup>	0,52 ± 0,05* <sup>+</sup> <sup>#</sup>
5ОИУК, мкг/г ткани	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,03	1,60 ± 0,15*	0,40 ± 0,04 <sup>#</sup>	0,25 ± 0,03* <sup>+</sup>	0,23 ± 0,02* <sup>+</sup>

Примечание. Обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей: \* – кожи интактных (+uPA) мышей соответствующего пола, + – кожи (+uPA) мышей с меланомой B16/F10 соответствующего пола, # – самцов той же группы.

ответственно) и в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) у самок (2203,9 ± 148,3 и 1398,0 ± 115,4 нг/г ткани соответственно). Следовательно, в коже интактных (+uPA) мышей суммарное содержание биогенных аминов у самок было в 2,3 раза больше, чем у самцов, тогда как в коже (–uPA) мышей этот показатель не имел половых различий (табл. 1, 2). При этом у интактных самок дикого типа в коже содержалось больше норадреналина (в 1,6 раза) и гистамина (в 2,4 раза) и меньше дофамина (в 1,5 раза) и серотонина (в 1,7 раза), чем у самцов (см. табл. 2), тогда как у интактных (–uPA) самок – больше адреналина и норадреналина (соответственно в 3,1 раза и 1,6 раза) и меньше 5ОИУК (в 1,5 раза), чем у самцов соответствующей линии (см. табл. 1).

**Кожа после перевивки меланомы.** В непораженной злокачественным процессом коже (–uPA) самцов значимые изменения найдены только у уровне серотонина – снижение в 4,8 раза без изменения уровня его метаболита (см. табл. 1). У самцов из группы сравнения найдено увеличение содержания адреналина (в 6,7 раза), норадреналина (в 7,4 раза), гистамина (в 3,1 раза), не изменялся уровень дофамина и снижалась концентрация серотонина (в 2,5 раза) при увеличении содержания 5ОИУК (в 4,4 раза) (см. табл. 2). В непораженной злокачественным процессом коже (–uPA) самок по сравнению с кожей интактных животных этой линии найдено снижение уровня норадреналина (в 4,3 раза) и серотонина (в 6,7 раза) без изменения его метаболита. Концентрация гистамина и адреналина оставалась

прежней, а содержание дофамина возросло в 2,3 раза (см. табл. 1). У (+uPA) самок в непораженной коже статистически значимо изменялся только уровень норадреналина (повышался в 1,5 раза) относительно интактных животных соответствующей линии (см. табл. 2). Суммарное содержание биогенных аминов в непораженной злокачественным процессом коже (–uPA) самцов составило 2182,6 ± 125,3 нг/г ткани, у самок (–uPA) – 2196,3 ± 104,8 нг/г ткани и в обоих случаях не имело статистически значимых отличий от показателей в интактной коже этих животных. В непораженной злокачественным процессом коже (+uPA) самцов суммарное содержание биогенных аминов составило 1837,9 ± 95,9 нг/г ткани и было в 3,0 раза больше, чем в коже интактных мышей этой линии; для самок величины соответствующих показателей составили 1173,4 ± 84,8 и 1398,0 ± 19,8 нг/г ткани, статистически значимо не различаясь.

**Меланома.** В ткани меланомы (–uPA) самцов найдено повышение по сравнению с интактной кожей соответствующих контрольных животных уровня адреналина (в 2,0 раза) и дофамина (в 2,1 раза) и снижение содержания серотонина и его метаболита 5ОИУК (в 3,4 раза и 1,5 раза соответственно). Отдельно стоит отметить резкое падение уровня гистамина (в 8,6 раза) (см. табл. 1). В ткани опухоли (+uPA) самцов отмечено увеличение уровня адреналина (в 1,8 раза), норадреналина (в 3,4 раза) и серотонина (в 1,6 раза) при уменьшении содержания 5ОИУК в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ); уровень гистамина был снижен в

8,4 раза. Не обнаружено изменения концентрации дофамина (см. табл. 2). Суммарное содержание биогенных аминов в ткани опухоли (-uPA) самцов было в 6,3 раза меньше, чем в коже интактных животных ( $324,0 \pm 27,8$  и  $2101,2 \pm 154,3$  нг/г ткани соответственно), в ткани опухоли (+uPA) самцов – в 2,6 раза ( $124,9 \pm 13,1$  и  $617,2 \pm 52,1$  нг/г ткани соответственно). В ткани меланомы (-uPA) самок обнаружено снижение уровня адреналина (в 1,3 раза), норадреналина (в 2,5 раза) и резкое падение уровня гистамина (в 10,6 раза) на фоне увеличения содержания дофамина (в 1,6 раза) относительно показателей в коже интактных самок (см. табл. 1). Не найдено изменения концентрации серотонина и его метаболита. В ткани опухоли (+uPA) самок наблюдалось увеличение уровня адреналина (в 1,3 раза), норадреналина (в 2,2 раза), дофамина (в 2,1 раза), серотонина (в 1,3 раза) на фоне снижения содержания 5ОИУК (в 1,4 раза) и резкого падения уровня гистамина (в 12,4 раза) (см. табл. 2). Суммарное содержание биогенных аминов в ткани опухоли (-uPA) самок было существенно меньше, чем в коже интактных животных соответствующего пола, – в 8,0 раза ( $275,2 \pm 19,5$  и  $2203,9 \pm 19,8$  нг/г ткани соответственно), так же как и в ткани меланомы (+uPA) самок (в 7,3 раза:  $190,9 \pm 14,7$  и  $1398,0 \pm 19,8$  нг/г ткани соответственно).

**Головной мозг.** У интактных (-uPA) мышшей суммарное содержание биогенных аминов в мозге было больше, чем у (+uPA) животных: в 1,8 раза у самцов ( $151 \pm 12,8$  и  $84,2 \pm 9,1$  нг/г ткани соответственно) и в 1,7 раза у самок ( $p < 0,05$ ) ( $137 \pm 14,3$  и  $80,9 \pm 7,2$  нг/г ткани соответствен-

но). При этом уровень адреналина у интактных (-uPA) мышшей не имел различий с показателями у (+uPA) животных, тогда как концентрация норадреналина и дофамина была выше: у самцов – в 3,5 и 2,1 раза, у самок – в 3,2 и 2,9 раза соответственно (табл. 3). Уровень серотонина был выше только у самцов (в 1,9 раза) за счет усиления его синтеза и/или уменьшения инактивации: концентрация 5ОИУК у них снижалась в 1,8 раза. У (-uPA) самок содержание серотонина в мозге не отличалось от величины соответствующего показателя у (+uPA) самок, при этом количество 5ОИУК было в 2,0 раза больше, что свидетельствовало об усилении инактивации серотонина. Содержание гистамина в мозге (-uPA) животных обоего пола было меньше, чем у мышшей из группы сравнения: у самцов – в 2,2 раза, у самок – в 2,1 раза (см. табл. 3).

Процесс канцерогенеза вносил существенные коррективы в аминергический баланс головного мозга у мышшей обеих линий. Так, у (-uPA) мышшей стирались гендерные различия уровня адреналина в мозге, при этом его концентрация становилась меньше, чем у (+uPA) мышшей: у самцов – в 2,9 раза, у самок – в 1,2 раза (см. табл. 3). Содержание норадреналина у (-uPA) мышшей оставалось высоким: у самцов не изменялось, у самок уменьшалось в 1,5 раза, в результате у (-uPA) самцов концентрация норадреналина в мозге была в 1,6 раза большей, чем у самок, т.е. регистрировалось такое же гендерное соотношение, как и у (+uPA) мышшей с меланомой, но при большей концентрации этого биогенного амина в мозге. Количество дофамина в мозге у

Таблица 3. Содержание биогенных аминов в головном мозге мышшей-носителей меланомы

Table 3. Levels of biogenic amines in the brain of mice with melanoma

Содержание биогенного амина	-uPA				+uPA			
	интактные		с меланомой B16/F10		интактные		с меланомой B16/F10	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Адреналин, нг/г ткани	$5,7 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,5^+$	$7,3 \pm 0,4^{*,\Delta}$	$7,4 \pm 0,3^{*,\Delta}$	$5,1 \pm 0,6$	$8,5 \pm 0,7^+$	$21,1 \pm 1,9^*$	$9,0 \pm 0,8^+$
Норадреналин, нг/г ткани	$62,3 \pm 5,1^\Delta$	$61,4 \pm 6,3^\Delta$	$65,2 \pm 6,1^\Delta$	$40,3 \pm 3,8^{*,\Delta}$	$17,68 \pm 1,9$	$19,4 \pm 1,8$	$37,2 \pm 3,3^*$	$23,2 \pm 2,2^+$
Дофамин, нг/г ткани	$69,0 \pm 6,5^\Delta$	$50,0 \pm 4,7^{*,\Delta}$	$44,5 \pm 4,5^{*,\Delta}$	$33,4 \pm 3,5^{*,+}$	$32,7 \pm 2,8$	$17,5 \pm 1,8^+$	$4,0 \pm 0,5^*$	$31,0 \pm 3,1^{*,+}$
Гистамин, нг/г ткани	$12,5 \pm 0,9^\Delta$	$16,4 \pm 1,7^\Delta$	$21,2 \pm 1,8^*$	$34,0 \pm 3,6^{*,+}$	$27,6 \pm 2,8$	$34,9 \pm 3,2$	$25,4 \pm 2,3$	$30,4 \pm 2,9$
Серотонин, нг/г ткани	$1,20 \pm 0,20^\Delta$	$0,33 \pm 0,03^+$	$3,00 \pm 0,40^{*,\Delta}$	$1,90 \pm 0,2^{*,\Delta}$	$0,62 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,03^+$	$0,42 \pm 0,04^*$	$0,97 \pm 0,05^{*,+}$
5ОИУК, мк/г ткани	$0,25 \pm 0,04^\Delta$	$0,30 \pm 0,03^\Delta$	$0,46 \pm 0,04^{*,\Delta}$	$0,40 \pm 0,02^{*,\Delta}$	$0,45 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,03^+$	$0,17 \pm 0,02^*$	$0,23 \pm 0,03$

Примечание. Обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей: \* – интактных мышшей соответствующей линии и пола, + – самцов той же группы,  $\Delta$  – (+uPA) мышшей.

(-uPA) животных уменьшалось в 1,6 раза, что сохраняло тенденцию превалирования дофамина в мозге у (-uPA) самцов, как и у интактных мышей этой линии, в то время как количество дофамина в мозге у (+uPA) самцов с меланомой резко падало (в 8,2 раза), у (+uPA) самок увеличивалось почти двукратно (см. табл. 3). После перевивки меланомы низкий уровень гистамина в мозге у (-uPA) мышей увеличивался практически до значений мышей без нокаута, но и здесь прослеживалось гендерное неравенство: у (-uPA) самок количество гистамина в мозге было в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) больше, чем у самцов, тогда как у (+uPA) мышей статистически значимой гендерной разницы по содержанию гистамина в мозге не было. Уровень серотонина в мозге у (-uPA) мышей на фоне роста меланомы также увеличивался: у самцов – в 2,5 раза, у самок – в 5,8 раза, однако сохранялось превалирование этого биогенного амина у самцов (в 1,6 раза), как и у интактных животных этой линии, тогда как у (+uPA) мышей концентрация серотонина в мозге увеличивалась только у самок (в 2,3 раза), а у самцов снижалась (в 1,5 раза) по сравнению с контролем. Уровень 5ОИУК возрастал у (-uPA) самцов и самок (в 1,8 и 1,3 раза соответственно) и уменьшался в 2,6 раза у (+uPA) самцов, в результате количество 5ОИУК в мозге у (-uPA) мышей было больше, чем у (+uPA) животных: у самцов – в 2,7 раза, у самок – в 1,7 раза (см. табл. 3). В целом, в мозге (-uPA) мышей с меланомой B16/F10 суммарное содержание биогенных аминов не отличалось от величин соответствующих показателей интактных животных этой линии: у самцов –  $141,0 \pm 15,3$  и  $151,0 \pm 12,8$ , у самок –  $117,4 \pm 12,8$  и  $137,0 \pm 14,3$  нг/г ткани соответственно. Такая же картина наблюдалась и в мозге (+uPA) мышей: у самцов –  $88,3 \pm 9,1$  и  $84,2 \pm 10,3$ , у самок –  $94,2 \pm 11,8$  и  $80,9 \pm 10,1$  нг/г ткани соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Кожа может реагировать на неблагоприятные воздействия, а каждый ее тканеспецифичный ответ способен вносить вклад в центральную нейроэндокринную регуляцию. Эта новая концепция тонкой настройки заключается в том, что периферические ткани могут обеспечивать важную модуляцию управления системными регуляторами [7]. Понимание путей, посредством которых кожа может способствовать центральным нейроэндокринным реакциям, обеспечит новые терапевтические подходы к лечению меланомы.

При анализе полученных нами результатов исследования особенностей функционирования аминергической системы у мышей, нокаутиро-

ванных по урокиназе, обращают на себя внимание общие признаки, не зависящие от половой принадлежности животных, и гендерные особенности. К общим признакам можно отнести увеличение суммарного пула биогенных аминов с выраженной гипернорадреналинергией (кожа, мозг) и гипердофаминергией (мозг) в сочетании с гипергистаминергией и гиперсеротонинергией кожи и гипогистаминергией головного мозга. Гендерными особенностям у (-uPA) самок являются увеличение суммарной концентрации катехоламинов в коже (адреналина и норадреналина) и головном мозге (норадреналина, дофамина) без изменения уровня серотонина в головном мозге; у (-uPA) самцов – гиподофаминергия на фоне стабильного суммарного пула катехоламинов в коже, гиперсеротонинергия в сочетании с увеличением суммарного пула катехоламинов (норадреналина, дофамина) в головном мозге.

Для понимания значения полученных результатов необходимо обратиться к роли этих факторов в коже. Синтезированные в коже катехоламины опосредуют свои местные эффекты, вступая в связь с соответствующими рецепторами или посредством нерцепторных механизмов. Вполне вероятно, что кожная катехоламинергическая система будет оказывать влияние на головной мозг путем активации сенсорных нервов или путем воздействия на иммунные клетки, циркулирующие от кожи к другим органам [15]. Клетки кожи млекопитающих обладают способностью продуцировать и метаболизировать серотонин – классический нейротрансмиттер и вазоактивный амин, который является важным медиатором двуполосных взаимодействий между нейроэндокринной системой и кожей. Иммунная и сосудистая системы кожи являются традиционными мишенями для серотонина в биорегуляции, амин опосредует меланогенез-модулирующие эффекты стресса. Рецепторы 5HT<sub>1A/1B</sub> особенно важны в связи между мозгом и кожей для регуляции пигментации кожи [19]. Кожная серотонинергическая система может быть вовлечена в преобразование световой энергии солнечного излучения в локальные и системные биологические реакции, причем последнее опосредуется через передачу в мозг, эндокринные эффекты или регуляцию системных реакций [15].

Гистамин вырабатывается клетками эпидермиса и дермы и действует локально, модулируя функцию кератиноцитов, меланоцитов и клеток иммунной системы кожи. Это влияет на внутриклеточные сигнальные каскады, пролиферацию клеток и меланогенез. Гистамин передает сигналы клеткам иммунной системы и влияет на их миграцию и паттерны секреции цитокинов, мо-

дулирует иммунные ответы типа Th2 и экспрессию антимикробных пептидов. Таким образом, гистамин является важной частью нервно-иммунноэндокринной системы кожи с локальными и системными эффектами [14].

Нами установлено, что суммарное содержание биогенных аминов в коже, не пораженной злокачественным процессом, у (-uPA) мышей обоего пола с перевитой меланомой не изменялось по сравнению с показателями в коже интактных животных этой линии, хотя отмечены внутренние перестройки в соотношении индивидуальных катехоламинов у самок. В ткани меланомы (-uPA) мышей, напротив, регистрировалось резкое снижение суммарного содержания биогенных аминов, которое происходило за счет редукции гистамина, также как и у (+uPA) мышей [1]. В целом концентрация гистамина в опухоли у (-uPA) мышей была выше, чем у мышей без генетической мутации. Кроме того, на фоне роста меланомы изначально низкий уровень гистамина головного мозга увеличивался до интактных значений (+uPA) мышей. Хотя существует ряд исследований, описывающих действие гистамина как модулятора пролиферации некоторых опухолей, его роль в этиопатогенезе злокачественной меланомы до сих пор не доказана [10]. Похоже, что влияние гистамина на пролиферацию опухоли зависит от типа клеток, баланса между различными подтипами рецепторов, концентрацией гистамина, достигнутой в опухолевой среде.

Несмотря на то что нет единого мнения о роли гистамина при меланоме, патогенетическая значимость снижения его уровня в ткани этой опухоли, показанного в настоящем исследовании, подтверждается рядом экспериментальных и клинических работ. Так, эксперименты *in vivo* на модели первичной меланомы человека M1/15 показали, что у мышей, получающих гистамин, отмечено увеличение средней выживаемости, связанное с уменьшением роста опухоли и внутриопухолевой неоваскуляризацией. Многочисленные клинические испытания II и III фазы по метастатической меланоме также продемонстрировали клиническую пользу гистамина в качестве адьюванта для иммунотерапии IL-2, особенно у пациентов с метастазами меланомы в печени [3]. Восстановление низкого уровня гистамина в головном мозге на фоне роста меланомы, вероятно, было обусловлено его участием в эндокринном контроле и гомеостатической регуляции, изменившихся в ходе канцерогенеза.

Рассматривая уровень катехоламинов и серотонина в головном мозге, меланоме и коже, не затронутой патологическим процессом, у мышей с нокаутом по урокиназе в сравнительном аспекте

с показателями генетически полноценных животных, складывается впечатление об ингибировании стресса, имеющего место у мышей из группы сравнения. Так, у (-uPA) животных на фоне роста меланомы наблюдалось уменьшение содержания или низкий уровень стресс-реализующих биогенных аминов (адреналина, норадреналина): меньшая концентрация адреналина в мозге у всех (-uPA) мышей, по сравнению с (+uPA) животными; снижение изначально высокого уровня норадреналина в коже, опухоли и мозге у (-uPA) самок и меньшая выраженность гипернорадреналинергии кожи у (-uPA) самцов, по сравнению с (+uPA) самцами, сочетались с высоким уровнем стресс-лимитирующих биогенных аминов (дофамина, серотонина) в головном мозге, при этом содержание дофамина (самцы) и серотонина (все (-uPA) животные) было больше, чем у (+uPA) мышей. По всей видимости, высокая концентрация дофамина и увеличение интенсивности метаболизма серотонина в мозге при росте меланомы у мышей с нокаутом по урокиназе направлены на ограничение прогрессирования неоплазмы как выраженного стрессирующего фактора. Выявленные признаки ингибирования стресса у (-uPA) мышей на фоне канцерогенеза согласуются с менее агрессивным течением меланомы B16/F10 у мышей этой линии, описанным нами ранее [2], и с результатами других исследователей, установивших *in vitro* роль стресса как кофактора в развитии меланомы и подавление норадреналинзависимых ответов, ингибирующее ангиогенез и нарушающее миграцию раковых клеток при действии  $\beta$ -блокаторов и пропранолола [6].

Считается, что нейроиммуноэндокринная схема связи между мозгом и кожей лежит в основе многих заболеваний кожи, в том числе и при меланоме [19]. Кожа и мозг совместно используют несколько одинаковых нейрогормонов, нейротрансмиттеров и нейропептидов, и эти сигналы опосредуют и модулируют реакцию на системный стресс, изменяющий гомеостаз клеток кожи [12]. Стимулирующие факторы, такие как ультрафиолетовый свет, нейрогормоны и нейропептиды, могут влиять на функцию меланоцитов в реакции нейроэндокринного стресса. Pang et al. установили, что хронический стресс может подавлять меланогенез у мышей C57BL/6 и снижать экспрессию мРНК ключевых факторов на кожной оси «гипоталамус – гипофиз – надпочечники» (ГГН) [11]. Из-за эволюционного сохранения ГГН-подобных сетей на центральном и кожном уровнях могут существовать взаимодействия между этими системами, и такие взаимодействия могут влиять на функции каждой системы [16]. Например, ультрафиолетовое облучение кожи

приводит к возбуждению центральной нервной системы [6], а кожные заболевания связаны с более высокой активностью центральной оси ГГН [20].

Следовательно, можно предположить, что изменение уровня и индивидуального состава биогенных аминов в коже и головном мозге (–uPA) мышей связано с сигнализацией клеток кожи в ЦНС как об изменении метаболических процессов, опосредуемых главным образом нейротрансмитерами, так и о модуляции иммунных свойств кожи. Учитывая увеличение уровня некоторых катехоламинов, серотонина и гистамина, можно говорить о том, что нокаут по урокиназе приводит к повышению иммунной функции кожи животных. И такое состояние будет коррелировать с замедлением роста и прогрессирования злокачественной опухоли.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нокаут по гену uPA ограничивает развитие стресса на центральном регуляторном уровне путем формирования меньшего уровня адреналина на фоне увеличения серотонинергической медиации в головном мозге, а также модулирует иммунный противоопухолевый ответ за счет увеличения содержания гистамина в опухоли и серотонина в коже вследствие меньшей активности моноаминоксидазы у мышей-носителей меланомы B16/F10.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котиева И.М., Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Трепитакки Л.К., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Влияние экспериментальной хронической боли на уровень биогенных аминов в коже у мышей в динамике роста меланомы B16/F10. *Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естествозн. науки.* 2018; 198 (1): 130–139.

Kotieva I.M., Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. Effect of experimental chronic pain on levels of biogenic amines in skin of mice in dynamics of B16/F10 melanoma growth. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennyye nauki = University news. North-Caucasian region. Natural Sciences Series.* 2018; 198 (1): 130–139. [In Russian].

2. Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Бандовкина В.А., Трепитакки Л.К., Лесовая Н.С., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Немашкалова Л.А. Влияние нокаута по гену урокиназы на рост меланомы в эксперименте. *Сиб. науч. мед. журн.* 2019; 39 (4): 62–70. doi: 10.15372/SSMJ20190408

Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Surikova E.I., Neskubina I.V., Bandovkina V.A., Trepitaki L.K., Lesovaya N.S., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Nemashkalova L.A. Effect of urokinase gene-knockout on growth of melanoma in experiment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2019; 39 (4): 62–70. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190408

3. Agarwala S.S., Glaspy J., O’Day S.J., Mitchell M., Gutheil J., Whitman E., Gonzalez R., Hersh E., Feun L., Belt R., Meyskens F., Hellstrand K., Wood D. Results from a randomized phase III study comparing combined treatment with histamine dihydrochloride plus interleukin-2 versus interleukin-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 125–133.

4. Calvani M., Pelon F., Comito G., Taddei M.L., Moretti S., Innocenti S., Chiarugi P. Norepinephrine promotes tumor microenvironment reactivity through  $\beta$ 3-adrenoreceptors during melanoma progression. *Oncotarget.* 2015; 6 (7): 4615–4632. doi:10.18632/oncotarget.2652

5. Calvani M., Cavallini L., Tondo A., Spinelli V., Ricci L., Pasha A., Bruno G., Buonvicino D., Bigagli E., Vignoli M., Bianchini F., Sartiani L., Lodovici M., Semeraro R., Fontani F., de Logu F., Dal Monte M., Chiarugi P., Favre C., Filippi L.  $\beta$ 3-Adrenoreceptors control mitochondrial dormancy in melanoma and embryonic stem cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018; 2018: 816508. doi: 10.1155/2018/816508

6. De Giorgi V., Grazzini M., Benemei S. Propranolol for off-label treatment of patients with melanoma: results from a cohort study. *JAMA Oncol.* 2018; 4 (2): ID e172908. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.2908

7. Jozic I., Stojadinovic O., Kirsner R.S., Tomic-Canic M. Skin under the (spot)-light: cross-talk with the central hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J. Invest. Dermatol.* 2015; 135 (6): 1469–1471. doi: 10.1038/jid.2015.56

8. Lee H.J., Park M.K., Kim S.Y., Park Choo H.Y., Lee A.Y. Serotonin induces melanogenesis via serotonin receptor 2A. *Br. J. Dermatol.* 2011; 165: 1344–1348. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10490.x

9. Massari N.A., Medina V.A., Cricco G.P., Martinel Lamas D.J., Sambuco L., Pagotto R., Ventura C., Ciralo P.J., Pignataro O., Bergoc R.M., Rivera E.S. Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma. *J. Dermatol. Sci.* 2013; 72: 252–262. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.07.012

10. Massari N.A., Nicoud M.B., Sambuco L., Cricco G.P., Martinel Lamas D.J., Herrero Ducloux M.V., Medina V.A. Histamine therapeutic efficacy in metastatic melanoma: Role of histamine H4 receptor agonists and opportunity for combination with radiation. *Oncotarget.* 2017; 8 (16): 26471–26491. doi: 10.18632/oncotarget.15594



11. Pang S., Wu H., Wang Q., Cai M., Shi W., Shang J. Chronic stress suppresses the expression of cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis elements and melanogenesis. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e98283. doi: 10.1371/journal.pone.0098283
12. Paus R., Theoharides T.C., Arck P.C. Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. *Trends Immunol.* 2006; 27 (1): 32–39. doi: 10.1016/j.it.2005.10.002
13. Pérez-Guijarro E., Day C.P., Merlino G., Zaidi M.R. Genetically engineered mouse models of melanoma. *Cancer*. 2017; 123 (S11): 2089–2103. doi: 10.1002/cncr.30684
14. Slominski A., Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr. Rev.* 2000; 21: 457–487. doi: 10.1210/edrv.21.5.0410
15. Slominski A.T., Zmijewski M.A., Skobowiat C., Zbytek B., Slominski R.M., Steketee J.D. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2012; 212 (v, vii): 1–115. doi: 10.1007/978-3-642-19683-6\_1
16. Slominski A.T., Zmijewski M.A., Zbytek B., Tobin D.J., Theoharides T.C. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr. Rev.* 2013; 34: 827–884. doi: 10.1210/er.2012-1092
17. Tchernev G., Lozev I., Temelkova I., Chernin S., Yungareva I. Schizophrenia as potential trigger for melanoma development and progression! The psychoneuro-endocrine-oncology (P.N.E.O) network! *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2018; 6 (8): 1442–1445. doi: 10.3889/oamjms.2018.276
18. Wu H.L., Pang S.L., Liu Q.Z., Wang Q., Cai M.X., Shang J. 5-HT1A/1B receptors as targets for optimizing pigmentary responses in C57BL/6 mouse skin to stress. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e89663. doi: 10.1371/journal.pone.0089663
19. Wu H., Zhao Y., Huang Q., Cai M., Pan Q., Fu M., An X., Xia Z., Liu M., Jin Y., He L., Shang J. NK1R/5-HT1AR interaction is related to the regulation of melanogenesis. *FASEB J.* 2018; 32 (6): 3193–3214. doi: 10.1096/fj.201700564RR
20. Zhang X., Yu M., Yu W., Weinberg J., Shapiro J. Development of alopecia areata is associated with higher central and peripheral hypothalamic-pituitary-adrenal tone in the skin graft induced C3H/HeJ mouse model. *J. Invest. Dermatol.* 2009; 129: 1527–1538. doi: 10.1038/jid.2008.371

#### Сведения об авторах:

**Франциянц Е.М.**, д. б. н., проф., ORCID: 0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru  
**Каплиева И.В.**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru  
**Сурикова Е.И.**, к.б.н., ORCID: 0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru  
**Нескубина И.В.**, к.б.н. ORCID: 0000-0002-7395-3086, e-mail: nes kubina.irina@mail.ru  
**Бандовкина В.А.**, к.б.н. ORCID: 0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru  
**Трепитаки Л.К.**, ORCID: 0000-0002-9749-2747, e-mail: legolab69@yandex.ru  
**Погорелова Ю.А.**, к.б.н., ORCID: 0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru  
**Немашкалова Л.А.**, ORCID: 0000-0003-2713-8598, e-mail: tilde09@rambler.ru

#### Information about authors:

**Frantsiyants E.M.**, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru  
**Kaplieva I.V.**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru  
**Surikova E.I.**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru  
**Neskubina I.V.**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-7395-3086, e-mail: nes kubina.irina@mail.ru  
**Bandovkina V.A.**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru  
**Trepitaki L.K.**, ORCID: 0000-0002-9749-2747; e-mail: legolab69@yandex.ru  
**Pogorelova Yu.A.**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru  
**Nemashkalova L.A.**, ORCID: 0000-0003-2713-8598; e-mail: tilde09@rambler.ru