

## СНИЖЕНИЕ КАЛОРИЙНОСТИ ПИТАНИЯ ИЗМЕНЯЕТ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У МЫШЕЙ С МЕЛАНОМОЙ В-16

Фефелова Ю.А.<sup>1</sup>, Сергеева Е.Ю.<sup>1</sup>, Титова Н.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России», Красноярск, e-mail: rector@krasgmu.ru;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, e-mail: office@sfu-kras.ru

Целью данной работы явилось изучение влияния ограничения калорийности питания на развитие экспериментальной опухоли меланомы В-16 у мышей. В исследовании были использованы самки мышей линии С57/BL6, разделенные на четыре группы – контрольные животные на базовой диете и диете с ограничением калорийности, животные с перевитой меланомой В-16 на базовой диете и диете с ограничением калорийности. Для спектрофотометрического определения содержания малонового диальдегида, активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы – использовали гомогенат печени. Уровень экспрессии гена *sirt1* определяли в опухолевой ткани и оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Было установлено, что ограничение калорийности питания мышей с меланомой В-16 не приводит к активации процесса перекисного окисления липидов, повышению активности супероксиддисмутазы и каталазы в клетках печени. В то же время активность глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы снижалась соответственно в 1,6 и 1,2 раза. При этом у мышей, находившихся на диете с ограничением калорийности, происходило повышение экспрессии гена *sirt1* в клетках опухоли, но данный эффект отсутствовал у животных, находящихся на базовой диете. Полученные данные позволяют предположить, что ограничение калорийности воздействует на развитие опухоли посредством изменения активности ферментов антиоксидантной системы и экспрессии гена *sirt1*.

Ключевые слова: ограничение калорийности, меланомы В-16, сиртуины, окислительный стресс, ферменты антиоксидантной системы.

## CALORY RESTRICTION ALTERS THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM ENZYMES AT THE MICE WITH MELANOMA B-16

Fefelova Y.A.<sup>1</sup>, Sergeeva E.Y.<sup>1</sup>, Titova N.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FGBOU VO «Krasnoyarsk state medical university named after professor V.F. Voino-Yasenetsky Ministry of Health of Russia», Krasnoyarsk, e-mail: rector@krasgmu.ru;

<sup>2</sup>FGAOU VO «Siberian federal university», Krasnoyarsk, e-mail: office@sfu-kras.ru

The aim of this study was to investigate the influence of calory restriction on the development of experimental tumor melanoma B-16 at mice. In the investigation female C57/BL6 mice divided into four groups – control animals kept a basic diet and calory restrictive diet, the animals with melanoma B-16 kept a basic diet and calory restrictive diet were used. Liver supernatant was used for spectrophotometric assessment of malonic dialdehyde level, the activity of antioxidative enzymes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase. Expression level analysis of *sirt1* in tumor tissue was performed by RT-qPCR. Calory restriction of melanoma B-16 mice was not found to activate lipid peroxidation and to alter the activity of superoxide dismutase and catalase. At the same time, glutathione peroxidase activity and glutathione S-transferase were decreased, accordingly, 1,6 and 1,2 times. Under this, *sirt1* expression level in tumor cells of calory restrictive mice was increased. This effect was absent at mice kept a basic diet. The findings allow to suppose that calory restriction influences on tumor development by means of alterations of antioxidative enzymes activity and *sirt1* expression level.

Keywords: calory restriction, melanoma B-16, sirtuins, oxidative stress, antioxidant enzymes.

Одним из приоритетных современных направлений исследований стало изучение семейства белков сиртуинов (SIRTUIN1-7) в связи с их значительной ролью в регуляции клеточного гомеостаза у млекопитающих. SIRT1, один из семейства этих белков, регулирует

процессы метаболизма в организме, что в существенной степени определяет его роль в развитии ряда патологий, в том числе различных видов рака [1].

Известно, что роль окислительного стресса в процессе развития злокачественных опухолей неоднозначна. С одной стороны, окислительный стресс способен индуцировать процессы, играющие важную роль в инициации опухолевого роста. Установлено, что повышение продукции активных форм кислорода, в том числе и под действием ультрафиолетового излучения, способствует повышению продукции меланина и меланомогенезу [2]. С другой стороны, при поздних стадиях развития опухоли окислительный стресс способствует гибели опухолевых клеток и предотвращает метастазирование [3].

Существует определенное количество исследований, показывающих положительное влияние ограничения калорийности при злокачественных новообразованиях, в частности меланоме [4].

Тем не менее механизмы опухолюсупрессивного эффекта ограничения калорийности до сих пор окончательно не исследованы.

Цель исследования

Изучение влияния низкокалорийной диеты на экспрессию гена *sirt1* и активность ферментов антиоксидантной системы в опухолевых клетках и клетках печени у мышей линии C57BL6 с экспериментальной меланомой В-16.

### **Материалы и методы исследования**

Объект исследования – самки мышей линии C57/BL6 массой 20–22 г. Мышей содержали при постоянной температуре 20–22°C со световым периодом 12 ч в индивидуальных клетках. Диета животных была строго сбалансирована, для чего использовался гранулированный полнорационный комбикорм «Чара» (ГОСТ ISO 9001-2011(ISO 9001:2008)).

Список экспериментальных процедур одобрен этическим комитетом ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 57/2014).

Для исследований в качестве контрольных образцов использовали мышей, находящихся на базовой диете (*adlibitum*), – 1-я группа, и на диете, составляющей 70% от диеты, удовлетворяющей физиологические потребности животных, – 2-я группа. Опытным животным подкожно перевивали  $5 \times 10^5$  клеток меланомы В-16 в 0,5 мл раствора Хенкса. После трансплантации опухоли меланомы В-16 мыши случайным образом были разделены на две опытные группы: 3-я группа (7 мышей) получала диету 1-й группы; 4-я группа (8 мышей) получала диету 2-й группы. На 22-е сутки, после эвтаназии животных, опухоль иссекали в пределах непораженных тканей и извлекали печень.

Уровень экспрессии гена *sirt1* определяли в опухолевой ткани и оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Постановку метода осуществляли на приборе StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Сингапур). Очищенную РНК предварительно подвергали обратной транскрипции со случайными гексамерными праймерами. Реакционная смесь для обратной транскрипции содержала 5 мкл ОТ-буфера, 1 мкл 25 мМ случайных праймеров, 2 мкл 20 мМ дитиотреитола, 1 мкл 25 мМ дНТФ, 5 е.а. фермента MMLV обратной транскриптазы, 4 мкл раствора РНК (около 2 мкг), воду без нуклеаз до конечного объема 25 мкл. 2 мкл полученной комплементарной ДНК добавляли в ПЦР-смесь следующего состава: 10 мкл ПЦР-смеси (Синтол, Москва, Россия), 1 мкл смеси праймеров и зонда, специфичных для участка гена *sirt1* мыши, 12 мкл безнуклеазной воды. Реакцию проводили в соответствии с указаниями производителя праймеров. По окончании реакции относительный уровень экспрессии сиртуина 1 рассчитывали по методу  $\Delta\Delta Ct$  [5]. В качестве внутреннего контроля использовали экспрессию гена бета-актина.

Гомогенат печени использовали для определения содержания малонового диальдегида, активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КТ), глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатион-S-трансферазы (GST).

Содержание малонового диальдегида (МДА), продукта перекисного окисления липидов, оценивалось по уровню хромогена, образующегося при взаимодействии МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой, интенсивность окраски которого регистрировалась при длине волны 532 нм. Уровень МДА рассчитывали, учитывая коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равный  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , и выражали в мкмоль/г белка [6].

В основу метода определения активности СОД положено ингибирование реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов. Об интенсивности аутоокисления адреналина судили по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, не описанного ранее в литературе, и опережающему по времени образованию адренохрома, имеющего максимум поглощения при 480 нм [7].

Определение активности КТ основано на образовании окрашенного в желтый цвет комплекса не разрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония. Активность КТ рассчитывали, используя коэффициент экстинкции пероксида водорода, равный  $22,2 \cdot 10^3 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при длине волны 400 нм, и выражали в мкмоль/мин \* г белка [8].

Активность ГПО оценивали по изменению содержания GST в пробах до и после инкубации с модельным субстратом – гидропероксидом трет-бутила – в ходе цветной реакции с ДТНБК [8]. Активность GST определяли по скорости образования конъюгатов между GST и 1-хлор-2,4-динитробензолом. Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Активность фермента рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции глутатион-S-конъюгатов,  $9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [8].

По результатам исследования была сформирована база данных, на основе которой с помощью программы Statistica 8 осуществлялся статистический анализ при подсчете медианы и интерквартильного разброса (C25–C75 процентиля). Проверку гипотезы о статистической значимости различий показателей двух выборок проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

### Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что ограничение калорийности питания у животных с экспериментальной меланомой не приводит к достоверному повышению содержания МДА в гомогенате печени. Активность СОД и КТ при низкокалорийной диете достоверно не изменяется. Ограничение калорийности у животных с меланомой вызывает снижение активности ГПО и GST в гомогенате печени в 1,6 и 1,2 раза соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Изменение активности показателей антиоксидантной системы и содержания МДА при ограничении калорийности у мышей с экспериментальной меланомой; группа 3 – базовая диета, группа 4 – диета с ограничением калорийности (70% от базовой диеты)

Показатель	Группа 3 n=10 (7)	Группа 4 n=10 (8)
	Me C <sub>25</sub> –C <sub>75</sub>	Me C <sub>25</sub> –C <sub>75</sub>
МДА мкмоль/г белка	4,20 3,68–4,57	5,91 3,90–7,41
СОД у.е/мин/г белка	1305,50 1188,0–1522,0	1544,50 1340,0–1576,0
КТ ммоль/мин/г белка	262,90 260,30–265,70	290,55 287,40–292,50
ГПО мкмоль/мин/г белка	5,63 5,04–7,74	3,52 3,34–4,29 P<0,01
GST ммоль/мин/г белка	7,17 6,93–9,8	5,77 5,0–6,85 P<0,01

Выявлено усиление экспрессии гена *sirt1* в группе мышей, находящихся на диете с ограничением калорийности питания после перевивки клеток опухоли – «Опухоль + ОК», по сравнению с контрольной группой мышей без опухоли и с содержанием на рационе с ограничением калорийности – «ОК». При сравнении группы мышей, находящихся на базовой диете после перевивки клеток опухоли – «Опухоль + БД», с группой мышей без опухоли, находящихся на рационе питания без ограничения калорийности – базовая диета (БД), таких изменений экспрессии гена *sirt1* не выявляется. Это может указывать на положительное влияние ОК на экспрессию данного гена и способно опосредовать ряд механизмов, направленных на замедление темпов развития опухоли (табл. 2).

Таблица 2

Влияние диеты на изменение экспрессии гена *sirt1* у мышей с экспериментальной меланомой.

№ группы	Обозначение группы	$\bar{x}$ (среднее)	m (стандартная ошибка среднего)
1	БД	0,00058	0,00004
2	ОК	0,00031	0,00003
3	БД + Опухоль	0,00163	0,00162
4	ОК + Опухоль	0,00097	0,00033

Примечание: ОК – ограничение калорийности; БД – базовая диета.  $P_{1,2}=0,00796$ ;  $P_{2,4}=0,039$

Ферментативная активность SIRT1 зависит от уровня  $NAD^+$ , что во многом определяет его регулируемую роль в клеточном метаболизме. Ограничение калорийности питания можно рассматривать как стрессовый фактор, влияющий на активность белков семейства сиртуинов (и SIRT1 в том числе). Вмешательство в изменение активности SIRT1 с помощью ограничения калорийности питания может быть одним из направлений, влияющих на процессы меланогенеза.

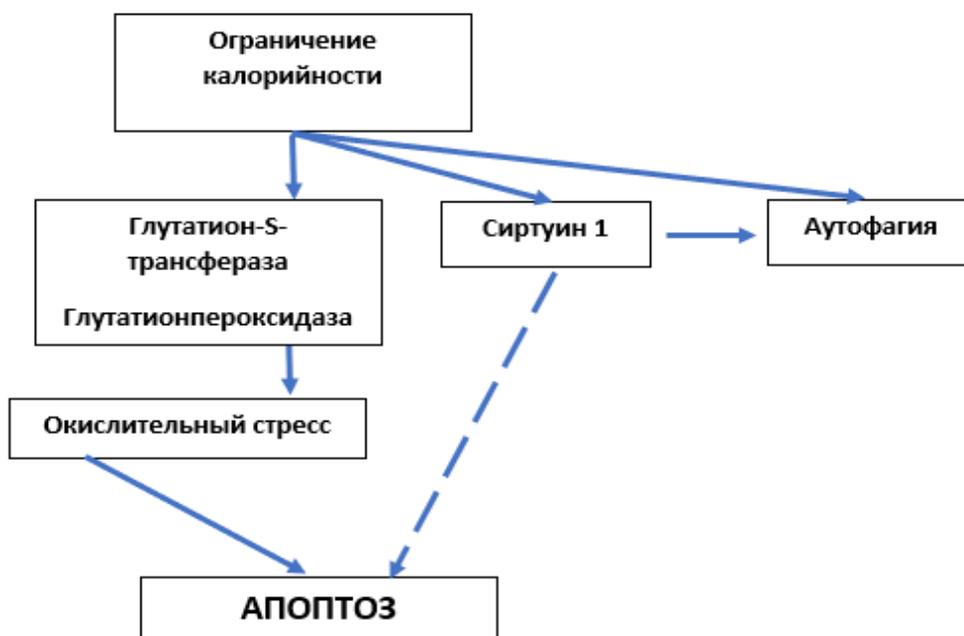
Усиление экспрессии гена *sirt1* в тканях опухоли у мышей при ограничении калорийности питания по сравнению с группой мышей, находящейся на базовой диете, в наших экспериментах указывает на положительное влияние ОК на экспрессию данного гена и может опосредовать ряд механизмов, направленных на замедление темпов развития опухоли. Эти механизмы в существенной степени могут быть реализованы через изменение баланса клеточных про- и антиоксидантных систем.

СОД катализирует реакцию дисмутации супероксиданиона с образованием пероксида водорода. КТ обеспечивает удаление пероксида водорода. ГПО катализирует восстановление органических гидроперекисей и  $H_2O_2$ . Одновременно в результате действия NADPH-зависимой глутатионредуктазы происходит восстановление глутатиона, GST использует глутатион для конъюгации с гидрофобными соединениями и восстановления органических

пероксидов. GST осуществляет обезвреживание различных органических соединений, к числу которых относятся вещества, обладающие канцерогенным действием.

Таким образом, ограничение калорийности не приводит к усилению продукции свободных радикалов и увеличению степени окислительного стресса в клетках печени мышей с экспериментальной меланомой, а способствует повышению антиоксидантной активности клеток печени. Можно предположить, что данные изменения способны оказывать воздействие на развитие клеток меланомы B-16 в целом. Известно, что одной из особенностей метаболизма, присущих опухолевым клеткам, является повышение продукции активных форм кислорода. Возможно, снижение уровня свободных радикалов способно изменять активность ряда сигнальных путей, в том числе MAPK-сигнальных путей (ERK и JNK), и инициировать гибель клеток меланомы путем апоптоза. Кроме того, установлено, что изменение уровня свободных радикалов способно модулировать действие некоторых противоопухолевых препаратов, в частности, влияя на NF-κB сигнальный путь [9].

Однако получены данные, что *sirt1* способствует аутофагии, инициированной действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при окислительном стрессе. Предполагают, что в реализации этого эффекта принимают участие III PI3K/беклин 1 и сигнальный путь mTOR [10]. Следовательно, повышение экспрессии *sirt1* может способствовать как гибели опухолевых клеток (аутофагия), так и снижению процесса апоптоза (рис.).



*Механизм влияния ограничения калорийности на гибель опухолевых клеток*

## **Заключение**

Таким образом, эффекты, вызванные снижением калорийности рациона мышей с меланомой, имеют разнонаправленный характер, а их дальнейшее исследование играет важную роль в понимании фундаментальных механизмов процесса канцерогенеза.

### Список литературы

1. Yang H., Bi Y., Xue L., Wang J., Lu Y., Zhang Z., Chen X., Chu Y., Yang R., Wang R., Liu G. Multifaceted Modulation of SIRT1 in Cancer and Inflammation. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2015. vol. 20. no. 1-2. P. 49-64. DOI: 10.1615/critrevoncog.2014012374.
2. Zhang X., Gibhardt C.S., Will T., Stanisz H., Körbel C., Mitkovski M., Stejerean I., Cappello S., Pacheu-Grau D., Dudek J., Tahbaz N., Mina L., Simmen T., Laschke M.W., Menger M.D., Schön M.P., Helms V., Niemeyer B.A., Rehling P., Vultur A., Bogeski I. Redox signals at the ER-mitochondria interface control melanoma progression. *The EMBO Journal*. 2019. vol. 38. no. 15. P. e100871. DOI: 10.15252/emj.2018100871.
3. Zdybel M., Chodurek E., Pilawa B. Application of EPR spectroscopy to determine the influence of simvastatin concentration on free radicals in A-375 human melanoma malignum cells. *Toxicology In Vitro*. 2019. vol. 61. P. 104620. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104620.
4. Yang K., Fung T.T., Nan H. An Epidemiological Review of Diet and Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 2018. vol. 27. no. 10. P. 1115-1122. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0243.
5. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001. vol. 25. no. 4. P. 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
6. Ko K.M., Godin D.V. Ferric ion-induced lipid peroxidation in erythrocyte membranes: effects of phytic acid and butylated hydroxytoluene. *Molecular and cellular biochemistry*. 1990. vol. 95. no. 10. P. 125-131. DOI: 10.1007/bf00219970.
7. Сирота Т.В., Захарченко М.В., Кондрашова М.Н. Активность цитоплазматической супероксиддисмутазы – чувствительный показатель состояния антиоксидантной системы печени и мозга крыс. *Биомедицинская химия*. 2014. № 1. С. 63-71.
8. Сергеева Е.Ю., Азанова А.В., Фефелова Ю.А., Сергеев Н.В., Титова М.С., Цугленок Н.В. Экологический фактор, изменяющий активность ферментов антиоксидантной системы – магнитное поле с частотой 66 кГц // *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2013. № 10. С. 119-122.

9. Li Q., Chen L., Dong Z., Zhao Y., Deng H., Wu J., Wu X., Li W. Piperlongumine analogue L50377 induces pyroptosis via ROS mediated NF- $\kappa$ B suppression in non-small-cell lung cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2019. vol. 313. P. 108820. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.108820.
10. Zhang E., Cui W., Lopresti M., Mashek M.G., Najt C.P., Hu H., Mashek D.G. Hepatic PLIN5 signals via SIRT1 to promote autophagy and prevent inflammation during fasting. *Journal of Lipid Research*. 2020. vol. 61. no. 3. P. 338-350. DOI: 10.1194/jlr.RA119000336.