

ОГРАНИЧЕНИЕ КАЛОРИЙНОСТИ ПИТАНИЯ НА 30% У МЫШЕЙ С МЕЛАНОМОЙ B16 ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ ОБЪЕМА ОПУХОЛЕВОГО УЗЛА И УМЕНЬШЕНИЮ ВЫРАЖЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ

Сергеева Е.Ю.^{1,2}, Фефелова Ю.А.¹, Титова Н.М.²

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

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

Ожирение – фактор риска развития многих заболеваний, включая злокачественные опухоли. При ожирении происходят метаболические нарушения, способствующие канцерогенезу, среди которых важное значение имеет развитие окислительного стресса. Цель данного исследования: определение влияния 30%-ного снижения калорийности питания мышей с меланомой B16 на рост опухоли и такие показатели антиоксидантной системы, как активность супероксиддисмутазы и уровень диеновых конъюгатов в ткани опухолевого узла. Для исследования воздействия ограничения калорийности питания на рост и развитие опухоли были использованы половозрелые мыши-самки линии C57Bl/6 в возрасте 7–8 недель со средней массой тела 16,5 г. После содержания животных на данных режимах питания в течение 3 месяцев экспериментальным группам животных была произведена трансплантация опухолевых клеток меланомы B16. Замер объема опухоли и определение показателей антиоксидантной системы осуществляли на 15-е сутки после трансплантации опухолевых клеток. Активность супероксиддисмутазы и концентрация диеновых конъюгатов оценивались спектрофотометрически. Установлено, что режим ограничения калорийности приводит к уменьшению объема опухолевого узла, что сопровождается снижением активности супероксиддисмутазы и понижением содержания диеновых конъюгатов в ткани опухоли. Можно сделать предположение, что ограничение калорийности питания на 30% вызывает установленное нами уменьшение объема опухолевого узла, обусловленное снижением пролиферации опухолевых клеток, что, возможно, связано с активацией внутриклеточных процессов, нарушающих синтез структурных компонентов клетки и блокирующих клеточный цикл, отчасти обусловленных снижением уровня окислительного стресса при голодании.

Ключевые слова: снижение калорийности питания, меланома B16, канцерогенез, окислительный стресс, супероксиддисмутазы.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25 – 20067 от 22.03.2022 г.) и Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (проект № 26 от 25.03.2022 г.).

30% CALORY RESTRICTION IN MELANOMA B16 MICE LEADS TO THE DECREASE OF CANCER VOLUME AND OXIDATIVE STRESS LEVEL IN TUMOR TISSUE

Sergeeva E.Yu.^{1,2}, Fefelova Y.A.¹, Titova N.M.²

¹FSBEI HE Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky KrasSMU MOH Russia, Krasnoyarsk, e-mail: rector@krasgmu.ru;

²FSEI HPE Siberian Federal University, Krasnoyarsk, e-mail: office@sfu-kras.ru

Obesity is a risk factor of many diseases including cancer. Obesity is associated with the development of metabolic disorders promoting cancer development. One of such disorders is oxidative stress. The aim of this investigation is to assess the influence of melanoma B16 mice 30% calory restriction on the tumor growth, superoxide dismutase activity and conjugated diene level in tumor tissue. Female C57Bl/6 mice aged 7–8 weeks, average weight 16,5 g were used for investigation of the calory restriction influence on the tumor growth and development. The transplanted melanoma B16 cells were carried out after 3 months of calory restrictive diet. On the 15th day after cancer cell transplanted the tumor volume and the indicators antioxidative system were assessed. Superoxide dismutase activity and conjugated diene level were measured spectrophotometrically. It was revealed that calory restriction resulted in the decrease of tumor volume, decreased superoxide dismutase activity and decreased conjugated diene level in tumor tissue. We suppose, that 30% calory restriction initiates the decrease of tumor volume associated with the decreased cancer cell proliferation. It was supposed that starvation decreases oxidative stress level that, in turn, can activates intracellular processes connected with the blockage of cell structural components synthesis and cell cycle stopping.

Keywords: calory restriction, B16 melanoma, cancerogenesis, oxidative stress, superoxide dismutase.

The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 22-25 - 20067 dated 03/22/2022) and the Regional State Autonomous Institution “Krasnoyarsk Regional Foundation for the Support of Scientific and Scientific-Technical Activities” (project No. 26 dated 03/25/2022).

Ожирение в настоящее время является одной из самых важных медицинских проблем. Известно, что ожирение – фактор риска развития целого ряда опасных заболеваний, включающих гипертоническую болезнь, ишемическую болезнь сердца, сахарный диабет второго типа, злокачественные новообразования [1, 2]. Роль ожирения в развитии злокачественных опухолей связана с целым рядом метаболических изменений, в частности с повышением уровня глюкозы крови и развитием инсулинорезистентности [3]. Кроме того, активации канцерогенеза при ожирении способствуют повышение уровня жирных кислот в крови, дисбаланс эстрогенов, андрогенов и адипокинов, вялотекущее хроническое воспаление. Важную роль в ряду способствующих канцерогенезу процессов, ассоциированных с ожирением, играет развитие окислительного стресса, связанного с дисбалансом про- и антиоксидантов [2]. Меланома – злокачественное новообразование, заболеваемость которым быстро увеличивается во всем мире [4]. Роль ожирения в патогенезе меланомы до сих пор окончательно не ясна. Тем не менее, существуют данные, что повышение массы тела может способствовать меланомагенезу [5]. Использование стратегии снижения калорийности питания увеличивает продолжительность жизни, снижает риск развития ассоциированных со старением болезней, к числу которых относятся и онкологические заболевания [6].

Таким образом, целью данного исследования является выявление влияния 30%-ного снижения калорийности питания мышей с меланомой B16 на рост опухоли и такие показатели антиоксидантной системы, как активность супероксиддисмутазы и уровень диеновых конъюгатов в ткани опухолевого узла.

Материал и методы исследования

Для исследования воздействия ограничения калорийности питания на рост и развитие опухоли были использованы половозрелые мыши-самки линии C57Bl/6 в возрасте 7–8 недель со средней массой тела 16,5 г. Животные были предоставлены Филиалом НИЦ «Курчатовский институт» ПИЯФ – ПЛЖ «Рапполово». Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (протокол № 119 от 07.06.2023 г.). Температура воздуха в помещении поддерживалась на уровне 20–22°C. Контрольная группа – мыши на базовой диете (питание *ad libitum*), опытная группа – ограничение калорийности питания на 30% от диеты, удовлетворяющей физиологические потребности животных, исходя из веса животных. Внешние признаки оценивались ежедневно путем балльной оценки изменения окраса шерсти и волосяного покрова. Для кормления животных был использован полнорационный сухой гранулированный корм для содержания

лабораторных мышей «ЧАРА» (ООО «Фаворит», Россия). После содержания животных на данных режимах питания в течение 3 месяцев животным экспериментальной группы была произведена трансплантация опухолевых клеток. Для воспроизведения модели меланомы линии В16 мы вводили подкожно в боковую поверхность живота 1×10^6 суспензии клеток до формирования солидной опухоли в размере 20 мм. Культура клеток меланомы была любезно предоставлена ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии». Формирование опухолевого узла происходило в течение 15 суток после имплантации клеток меланомы. На 15-е сутки мы осуществили линейные замеры опухоли в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = (A \times (B)^2) / 2$, где А – больший, а В – меньший линейный размер узла.

Оценку содержания диеновых конъюгатов с учетом молярного коэффициента экстинкции [7] и расчет активности СОД [8] проводили спектрофотометрически на спектрофотометре Genesis 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific (USA) в гомогенатах опухолевой ткани. Принцип метода определения диеновых конъюгатов основан на том, что вследствие π - π переходов спектры конъюгированных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот характеризуются интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра с максимумом при 232–234 нм. На первом этапе липиды экстрагировали стократным избытком смеси растворителей. В гомогенизатор вносили 0,1 г ткани, добавляли 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирали до получения гомогенной суспензии. Содержимое гомогенизатора количественно переносили в мерную центрифужную пробирку, в которую затем добавляли 5 мл гептана. Экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 1700g. Надосадочную фракцию переносили в градуированную пробирку и добавляли 1/5 объема раствора КСl для отмывки липидного экстракта от нелипидных примесей. После тщательного встряхивания образовавшаяся эмульсия расслаивалась на две прозрачные фазы. В гептановом экстракте (верхняя фаза) измеряли спектрофотометрически содержание сопряженных диенов в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против гептана. Расчет количества ДК производили с учетом молярного коэффициента экстинкции ($27000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) и выражали в молях на 1 г ткани.

Принцип метода определения активности СОД основан на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии супероксиддисмутазы (СОД) вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов. Об интенсивности аутоокисления адреналина, исходная концентрация которого в пробе составляет 256 мкМ, судят 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. В качестве источника СОД использовали опухолевую ткань. В пробирку вносили 50

мг ткани и 450 мкл дист. H₂O, охлажденной до 0°C. После этого пробы перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 10 минут. Полученную суспензию перемешивали и центрифугировали при 6000g в течение 10 минут. Супернатант использовали для определения активности СОД. После внесения адреналина в контрольную пробу, содержащую бикарбонатный буфер, содержимое кюветы тщательно и быстро перемешивали. Изменение оптической плотности регистрировали через каждые 30 с в течение 3 мин в кювете с толщиной слоя 1,0 см. Измерение проводили против контрольной пробы. Аналогичным образом обрабатывали и опытную пробу. Для расчета активности СОД использовали показатели величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность фермента выражали в у.е./мин*г ткани.

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2019. Определяли средние значения, доверительный интервал и ошибку среднего. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Значимым считали различие при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При взвешивании мышей контрольной и опытной групп после содержания на режиме снижения калорийности и обычной диете в течение 3 месяцев, перед процедурой перевивки опухолевых клеток мышам опытной группы было установлено, что при содержании животных на режиме ограничения калорийности происходит статистически значимое снижение веса животных опытной группы – в 1,09 раза (рис. 1).

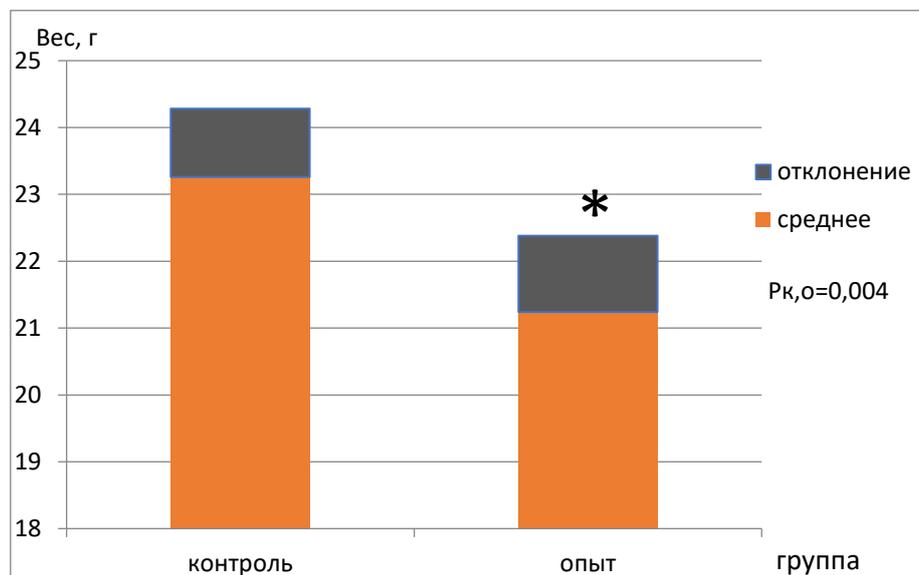


Рис. 1. Вес мышей с экспериментальной меланомой В16, находящихся на базовой диете (контроль) и режиме ограничения калорий (опыт)

При ежедневной оценке внешнего вида и двигательной активности животных контрольной и опытной групп после перевивки опухоли выявлено, что внешний вид животных

существенно не изменялся. Шерстяной покров яркий – 2 балла. Тем не менее, двигательная активность мышей, находящихся на режиме ограничения калорийности питания, резко отличалась от активности мышей в группе на базовой диете (питание без ограничений). Животные проявляли высокую двигательную активность как в плане дистанции, так и в плане скорости передвижения и поисковой активности. Таким образом, оценка для группы, находящейся на базовой диете, соответствовала 4 баллам, тогда как для группы на режиме ограничения калорийности балльная оценка соответствовала 5 (табл. 1).

Таблица 1

Внешние признаки – окрас шерсти и волосяного покрова;
изменение двигательной активности в группах мышей с экспериментальной меланомой В16, находящихся на базовой диете (контроль) и режиме ограничения калорий (опыт)

Внешние признаки															
Окрас шерсти и волосяного покрова (баллы)															
№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
контроль	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
опыт	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Изменение двигательной активности (баллы)															
№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
контроль	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
опыт	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

После трансплантации меланомы В16 проводили оценку динамики роста опухоли с 7-х суток после трансплантации, осуществляя замеры линейных замеров опухоли и рассчитывая объем опухолевого узла. Установлено, что на 15-е сутки средний показатель объема опухоли в группе мышей с ограниченной калорийностью питания статистически значимо ниже, чем в группе мышей, содержащихся на базовой диете (рис. 2).

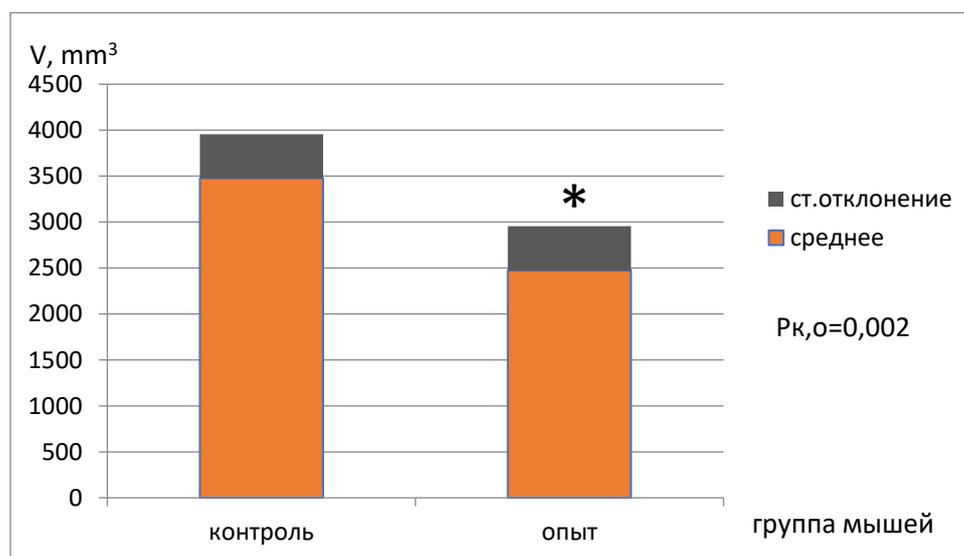


Рис. 2. Объем опухолевого узла (мм³) в группах мышей, находящихся на базовой диете (контроль) и режиме ограничения калорий (опыт)

Далее проводилось определение активности супероксиддисмутазы и содержания диеновых конъюгатов спектрофотометрически. Установлено, что активность супероксиддисмутазы статистически значимо снижалась в 3,5 раза, а содержание диеновых конъюгатов становилось меньше в 3,4 раза (рис. 3, 4).

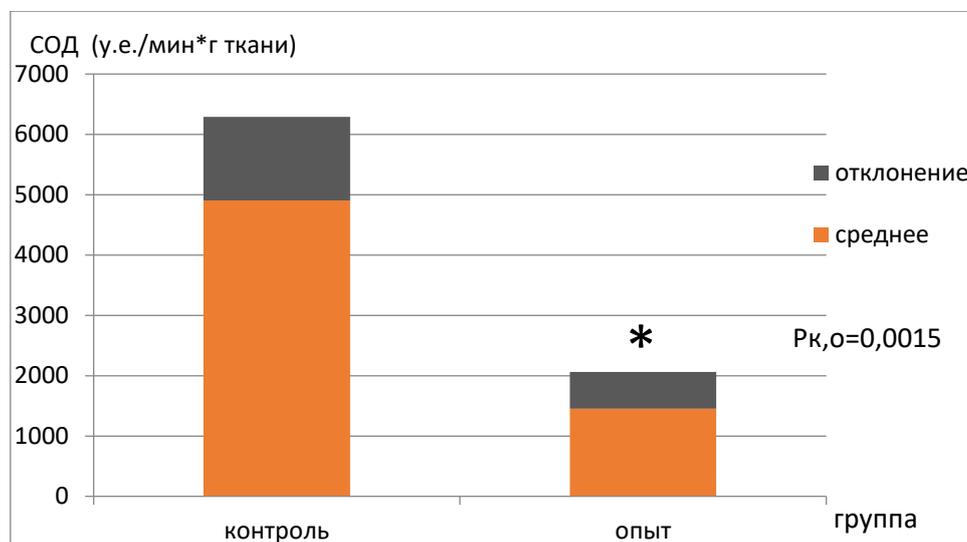


Рис. 3. Активность супероксиддисмутазы (у.е./мин*г ткани) в группах мышей с экспериментальной меланомой В16, находящихся на базовой диете (контроль) и режиме ограничения калорийности (опыт)

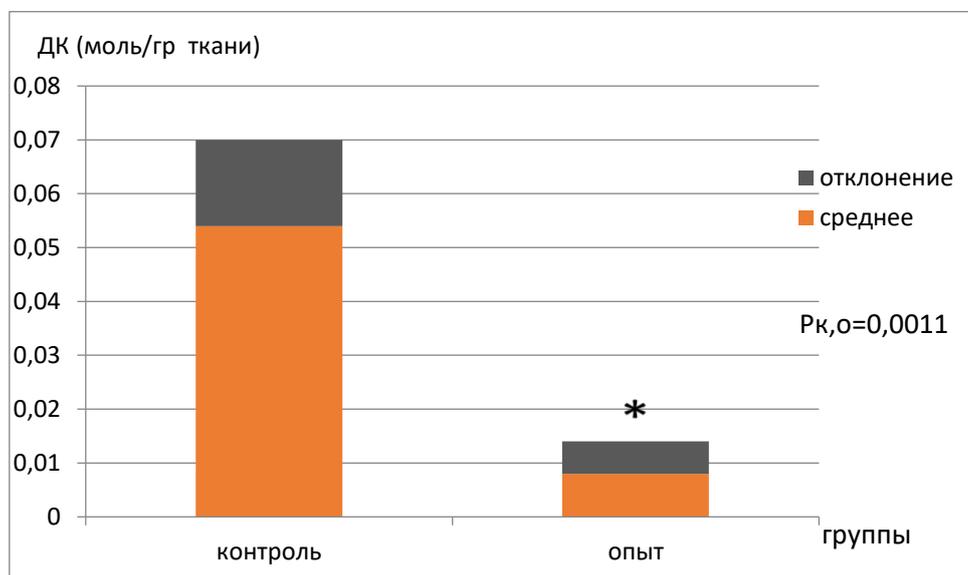


Рис. 4. Концентрация диеновых конъюгатов (моль/г ткани) в группах мышей с экспериментальной меланомой В16, находящихся на базовой диете (контроль) и режиме ограничения калорийности (опыт)

Существуют данные, что ограничение калорийности оказывает влияние на целый ряд клеточных процессов, ассоциированных с пролиферацией опухолевых клеток, изменяя метаболизм белков, жиров и углеводов [9]. Кроме того, множество факторов могут

регулировать процессы роста опухолевых клеток, оказывая стимулирующий или блокирующий эффекты. Среди таких факторов, регуляторная активность которых, как предполагают, контролируется, в том числе, изменением калорийности питания, можно назвать и микроРНК. Уменьшение калорийности питания меняет как профиль микроРНК, в частности, снижая экспрессию miR-210, miR-132, miR-29a, miR-34a, miR-132, miR-378, miR-29a-3p, miR-454-3p, miR-20b-5p, miR-210, принимающих участие в активации или блокаде сигнальных каскадов, играющих ключевую роль в регуляции роста опухолевых клеток и других процессов, ассоциированных с канцерогенезом, так и действует непосредственно на сами сигнальные пути, например сигнальный путь mTOR и JAK-STAT, снижая их способствующую росту и прогрессии злокачественной опухоли активность [9]. Так, установлено, что снижение калорийности питания стимулирует сигнальный путь eIF2, что приводит к блокаде синтеза белков и остановке клеточного цикла в фазе G2/M [10].

Повышение продукции свободных радикалов и развитие окислительного стресса в целом ряде работ рассматриваются в качестве факторов, способствующих канцерогенезу. Так, показано, что развитие ассоциированного с гипоксией и гиперпродукцией свободных радикалов стресса эндоплазматического ретикулума приводит к блокаде апоптоза и индукции аутофагии, стимуляции синтеза белков и нуклеиновых кислот, что, в конечном итоге, способствует усилению пролиферации опухолевых клеток и прогрессии злокачественного новообразования [11]. Кроме того, гипоксия и окислительный стресс в клетках меланомы WM793B приводят к повышению экспрессии VEGFA, фактора роста сосудистого эндотелия, играющего важную роль в ключевых процессах канцерогенеза, включающих пролиферацию опухолевых клеток и неоангиогенез [12, 13, 14]. Таким образом, изменение активности факторов антиоксидантной защиты может быть связано с усилением или, наоборот, торможением пролиферационного потенциала опухолевых клеток. В нашей работе мы исследовали изменение активности супероксиддисмутазы и содержание диеновых конъюгатов в ткани опухоли при воздействии снижения калорийности на 30%. Известно, что супероксиддисмутаза – один из ключевых ферментов антиоксидантной системы, принимающий участие в реакции дисмутации супероксидных анион-радикалов. Снижение активности супероксиддисмутазы в контексте нашего исследования может свидетельствовать о снижении уровня окислительного стресса, что подтверждается уменьшением содержания диеновых конъюгатов, продуктов перекисного окисления липидов, отражающих выраженность окислительного стресса.

Заключение

Можно сделать предположение, что ограничение калорийности питания на 30% вызывает установленное нами уменьшение объема опухолевого узла, обусловленное снижением пролиферации опухолевых клеток, что, возможно, связано с активацией

внутриклеточных процессов, нарушающих синтез структурных компонентов клетки и блокирующих клеточный цикл, отчасти обусловленных снижением уровня окислительного стресса при голодании.

Список литературы

1. Piché M.E., Tchernof A., Després J.P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases // *Circ. Res.* 2020. Vol. 126. Is. 11. P. 1477-1500. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316101.
2. Avgerinos K.I., Spyrou N., Mantzoros C.S., Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives // *Metabolism.* 2019. Vol. 92. P. 121-135. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.001.
3. Pascale R.M., Calvisi D.F., Simile M.M., Feo C.F., Feo F. The warburg effect 97 years after its discovery // *Cancers (Basel).* 2020. Vol. 12. Is. 10. P. 2819. DOI: 10.3390/cancers12102819.
4. Teixido C., Castillo P., Martinez-Vila C., Arance A., Alos L. Molecular markers and targets in melanoma // *Cells.* 2021. Vol. 10. Is. 9. P. 2320. DOI: 10.3390/cells10092320.
5. Moliterni E., Paolino G., Veronese N., Bottoni U., Corsetti P., Cardone M., Didona D., Lopez T., Calvieri S. Prognostic correlation between vitamin D serological levels, body mass index and clinical-pathological features in melanoma patients // *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 2018. Vol. 153. Is. 5. P. 732-733. DOI: 10.23736/S0392-0488.17.05652-8.
6. Komatsu T., Park S., Hayashi H., Mori R., Yamaza H., Shimokawa I. Mechanisms of calorie restriction: a review of genes required for the life-extending and tumor-inhibiting effects of calorie restriction // *Nutrients.* 2019. Vol. 11. Is. 12. P. 3068. DOI: 10.3390/nu11123068.
7. Черданцев Д.В., Винник Ю.С., Каспаров Э.В., Титова Н.М., Первова О.В. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите. Красноярск: Vona Company, 2002. 146 с.
8. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопросы медицинской химии.* 1999. Т. 45. № 3. С. 263-272.
9. Sergeeva E., Ruksha T., Fefelova Y. Effects of obesity and calorie restriction on cancer development // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. Is. 11. P. 9601. DOI: 10.3390/ijms24119601.
10. Jongbloed F., de Bruin R.W.F., Steeg H.V., Beekhof P., Wackers P., Hesselink D.A., Hoeijmakers J.H.J., Dollé M.E.T., IJzermans J.N.M. Protein and calorie restriction may improve outcomes in living kidney donors and kidney transplant recipients // *Aging.* 2020. Vol. 12. Is. 13. P. 12441-12467. DOI: 10.18632/aging.103619.
11. Brown K.A. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2021. Vol. 17. Is. 6. P. 350-363. DOI: 10.1038/s41574-021-00487-0.

12. Olbryt M., Habryka A., Student S., Jarzab M., Tyszkiewicz T., Lisowska K.M. Global gene expression profiling in three tumor cell lines subjected to experimental cycling and chronic hypoxia // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. Is. 8. P. e105104. DOI: 10.1371/journal.pone.0105104.
13. Kang S.A., Blache C.A., Bajana S., Hasan N., Kamal M., Morita Y., Gupta V., Tsolmon B., Suh K.S., Gorenstein D.G., Razaq W., Rui H., Tanaka T. The effect of soluble E-selectin on tumor progression and metastasis // *BMC Cancer*. 2016. Vol. 16. P. 331. DOI: 10.1186/s12885-016-2366-2.
14. Aksenenko M.B., Palkina N.V., Sergeeva O.N., Yu Sergeeva E., Kirichenko A.K., Ruksha T.G. miR-155 overexpression is followed by downregulation of its target gene, NFE2L2, and altered pattern of VEGFA expression in the liver of melanoma B16-bearing mice at the premetastatic stage // *Int. J. Exp. Pathol*. 2019. Vol. 100. Is. 5-6. P. 311-319. DOI: 10.1111/iep.12342.