

## ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ B16 ПРИ РЕЖИМЕ РЕСТРИКЦИИ ПИТАНИЯ

<sup>1</sup>Фефелова Ю.А., <sup>1,2</sup>Сергеева Е.Ю., <sup>3</sup>Шерстнев А.П., <sup>1</sup>Мутьев Н.С., <sup>1</sup>Полякова Т.С.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им 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;

<sup>3</sup>КГБУЗ «Лесосибирская МБ», Лесосибирск, e-mail: lescgb@yandex.ru

Ограничение калорийности питания – это диетическая манипуляция, привлекающая внимание в качестве потенциального адьювантного вмешательства в патогенез опухолевого процесса и его профилактики. Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что диеты с уменьшением потребляемых калорий вызывают перепрограммирование метаболических процессов как в опухолевых клетках, так и в клетках опухолевого микроокружения, оказывая эффект на развитие и прогрессию злокачественных новообразований. Цель данного исследования: выявление влияния 30%-ного снижения калорийности питания на поведенческие аспекты мышей с экспериментальной меланомой B16. Для исследования воздействия различных диет, а именно – питания *ad libitum* и рестрикции питания на 30% от физиологического уровня потребностей в пище, были использованы половозрелые мыши-самки линии C57Bl/6. Животные на данных режимах питания содержались в течение 3 месяцев, после чего экспериментальным группам была произведена трансплантация опухолевых клеток меланомы B16. Изучение поведенческих характеристик мышей осуществлялось с помощью теста «Открытое поле» с видеофиксацией пройденной дистанции, скорости передвижения, времени замираний и последующей программной обработкой информации. В группах мышей с рестрикцией питания общая локомоторная активность по показателям пройденной дистанции и средней скорости движения по территории арены была выше, чем у животных, содержащихся на базовой диете – питание *ad libitum*. Данные результаты были достигнуты как в группах контрольных мышей (без перевивки опухоли), так и в группах мышей с экспериментальной меланомой B16. Диета с ограничением калорийности питания на 30% приводит к переходу на программы стрессоустойчивости. Одним из проявлений данных программ является активация двигательных функций и поисковой активности мышей, как контрольной, так и опытной групп, что указывает на существенные резервы энергетических ресурсов при диете с рестрикцией калорийности за счет принципиальной перестройки метаболических процессов.

Ключевые слова: ограничение калорийности питания, меланома B16, канцерогенез, тест «Открытое поле», аспекты поведения.

*Работа была выполнена с использованием ресурсной базы ЦКП МКТ ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России*

## BEHAVIORAL ASPECTS OF MICE WITH EXPERIMENTAL B16 MELANOMA UNDER NUTRITION RESTRICTION

<sup>1</sup>Fefelova Y.A., <sup>1,2</sup>Sergeeva E.Yu., <sup>3</sup>Sherstnev A.P., <sup>1</sup>Mutyev N.S., <sup>1</sup>Polyakova T.S.

<sup>1</sup>FSBEI HE Prof. V.F. Voino-Yasenetsky KrasSMU MOH Russia, Krasnoyarsk, e-mail: rector@krasgmu.ru;

<sup>2</sup>FSEI HPE Siberian Federal University, Krasnoyarsk, e-mail: office@sfu-kras.ru;

<sup>3</sup>RSBHI "Lesosibirsk Interdistrict Hospital"

Calorie restriction is a dietary strategy that has attracted attention as a potential adjuvant intervention in tumor pathogenesis and prevention. *In vitro* and *in vivo* studies show that diets with reduced caloric intake cause reprogramming of metabolic processes in both tumor cells and cells of the tumor microenvironment, having an effect on the development and progression of malignant neoplasms. The purpose of this study was to determine the effect of a 30% reduction in caloric intake on the behavioral aspects of mice with experimental B16 melanoma. Mature female C57Bl/6 mice were used to study the effects of food restriction to 30% of the physiological level of food requirements compared with *ad libitum* feeding. The animals of experimental and control groups were kept on these diets for 3 months, after which the mice of experimental groups were transplanted B16 melanoma tumor cells for tumor formation. The behavioral characteristics of mice were studied using the "Open Field" test with video recording of the distance traveled, speed of movement, freezing time and subsequent software processing of information. In groups of mice with dietary restriction, overall locomotor activity in terms of distance traveled and average speed of movement across the arena was higher than in animals kept on a basic diet - *ad libitum* feeding. These results were achieved both in groups of control mice

(without tumor transplantation) and in groups of mice with experimental B16 melanoma. The diet with a 30% caloric restriction, causing reprogramming of metabolic processes leads to a transition to stress resistance programs. One of the peculiarities of such programs is the activation of the motor functions and search activity of mice, both control and experimental groups that demonstrates significant reserves of energy resources under CR diet due to cardinal reprogramming of metabolic processes. **Key words: calory restriction, B16 melanoma, cancerogenesis, open field test, behavioral aspects.**

Keywords: calory restriction, B16 melanoma, cancerogenesis, open field test, behavioral aspects.

*The work was done using the resource base Shared Core Facilities Molecular and Cell Technologies Krasnoyarsk State Medical University.*

Диеты с ограничением калорийности питания вызывают перепрограммирование метаболических процессов в опухолевых клетках и в клетках опухолевого микроокружения, оказывая влияние на патогенез и прогрессию опухоли [1, 2]. Одной из стратегических целей противоопухолевой терапии является преодоление метаболической пластичности [3]. Диета и питание являются одними из наиболее значимых модифицируемых внешних факторов, регулирующих метаболизм опухолевых клеток [4]. Меланома – злокачественное новообразование, заболеваемость которым быстро увеличивается в большинстве регионов мира, наблюдается устойчивый рост показателей заболеваемости и смертности населения от этой опухоли [5]. В ряде исследований показано положительное влияние ограничения калорийности при злокачественных новообразованиях и, в частности, при меланоме [6]. Возможное управление калорийностью пищи может иметь практическое значение в контексте канцерогенеза. Однако механизмы опухолюсупрессивного эффекта ограничения калорийности поняты далеко не полностью.

Таким образом, целью данного исследования является выявление влияния 30%-ного снижения калорийности питания мышей с экспериментальной меланомой B16 на поведенческие аспекты при использовании теста «Открытое поле».

### **Материал и методы исследования**

Для исследования влияния 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 НИЦ «Курчатовский институт» «ПЛЖ «Рапполово». Температура воздуха в помещении поддерживалась на уровне 20–22°C. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (протокол 119 от 07.06.2023 г.).

Лабораторные животные подвергнуты рандомизации, сформированы четыре группы:

1-я группа – интактные мыши, базовая диета (питание вволю – ad libitum) (n=10);

2-я группа – мыши на ограничении калорийности (ОК) питания (на 30% от физиологических потребностей) (n=10);

3-я группа – мыши на базовой диете (питание вволю), перевивка опухоли (n=10);

4-я группа – мыши на ОК питания (30%), трансплантация клеток меланомы B16 (n=10).

Животные групп № 1 и № 3 содержались в индивидуальных клетках при естественном освещении с неограниченным доступом к воде и корму. Животные групп № 2 и № 4 содержались в индивидуальных клетках при естественном освещении с неограниченным доступом к воде, но питание этих животных осуществлялось в режиме ограничения калорийности из расчета 70% от диеты, удовлетворяющей физиологические потребности животных, исходя из веса животных, в течение 3 месяцев. Для питания животных всех групп использовался полнорационный сухой гранулированный корм для содержания лабораторных мышей «ЧАРА» (ООО «Фаворит, Россия»). Экспериментальным группам животных № 3 и № 4 через 3 месяца была произведена трансплантация клеток меланомы. Для воспроизведения модели меланомы линии B16 мы вводили подкожно в боковую поверхность живота  $1 \times 10^6$  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.

Для оценки двигательной и исследовательской активности животных использовался тест «Открытое поле» [7]. Установка представляет собой открытую арену диаметром 63 см с высотой бортиков по периметру 30 см (производство НПК «Открытая Наука», РФ). Поверхность арены разделена на центральную (диаметр 32 см) и периферическую зоны. Животные проходили тестирование дважды. Каждая сессия длилась 8 минут. Для фиксирования пройденной дистанции, скорости передвижения, времени замираний использовалась видеозапись с последующей обработкой информации с помощью программного обеспечения ANY-MAZE.

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. Значимыми считали различие при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Первая сессия экспериментов была проведена с группами контрольных мышей № 1 и № 2, которые находились на базовой диете и на диете с ограничением калорийности питания соответственно. Вторая сессия была проведена для групп мышей с перевитой экспериментальной меланомой B16 № 3 и № 4, которые соответственно находились на базовой диете и на диете ОК питания.

Анализ результатов выявил, что пройденная дистанция была статистически значимо выше в группе мышей, находящихся на ОК питания, для животных контрольной группы (для

группы № 1 –  $47,7 \pm 1,3$ ; для группы № 2 –  $53,0 \pm 1,6$ ;  $p=0,039$  критерий Манна–Уитни) (рис. 1). Кроме того, статистически значимо пройденная дистанция была выше и в группе опытных мышей, находящихся на диете с ограничением калорийности питания ( $49,8 \pm 1,6$ ) по сравнению с группой животных, находящихся на базовой диете ( $40,2 \pm 2,0$ ) ( $p=0,042$  критерий Манна–Уитни) (рис. 2).

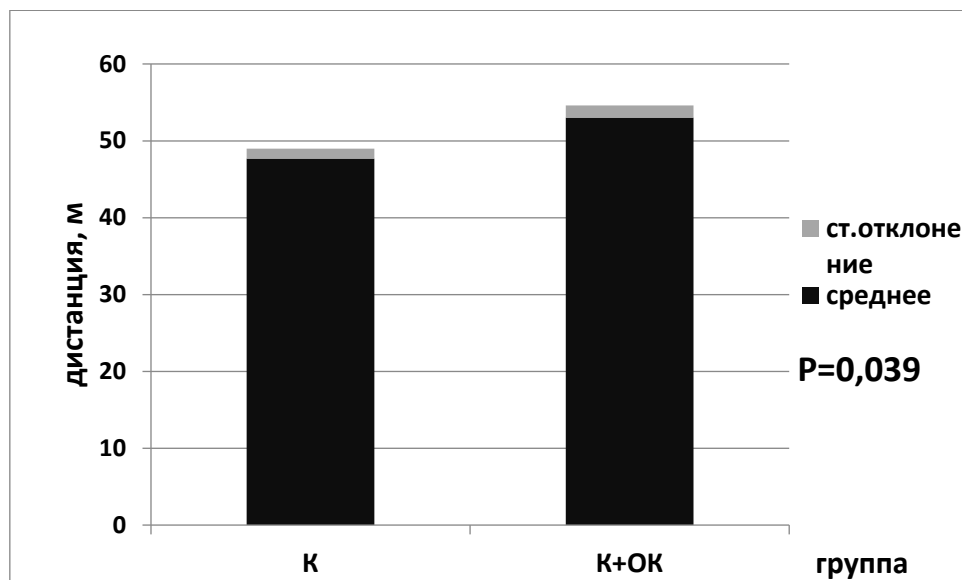


Рис. 1. Пройденная дистанция в группе контрольных мышей на базовой диете (К) и в группе контрольных мышей на диете с ограничением калорийности питания (К+ОК)

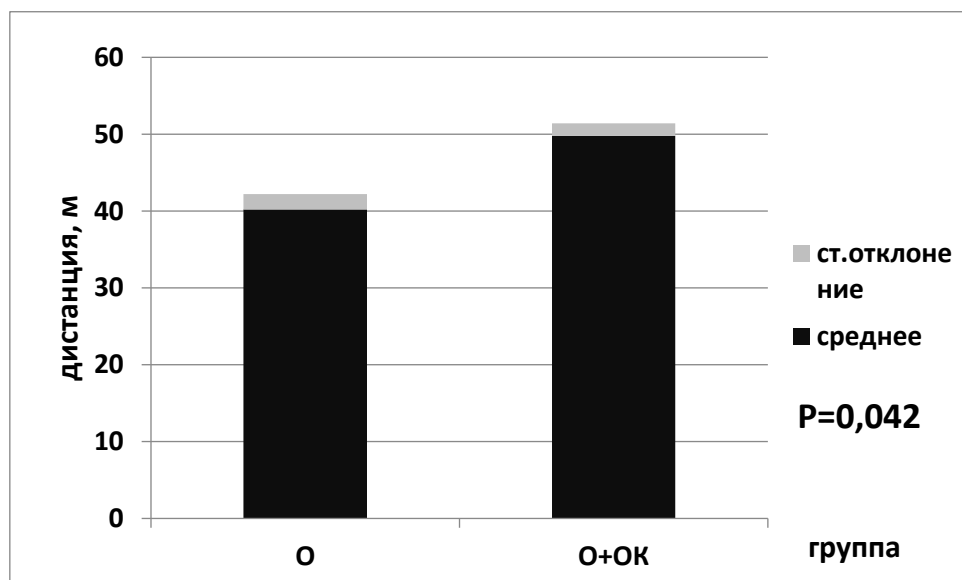


Рис. 2. Пройденная дистанция в группе опытных мышей на базовой диете (О) и в группе опытных мышей на диете с ограничением калорийности питания (О+ОК)

Средняя скорость в группе мышей без перевивки опухолевых клеток, находящихся на базовой диете ( $0,099 \pm 0,003$ ), была статистически значимо ниже показателя средней скорости для группы на ограничении калорийности питания ( $0,109 \pm 0,003$ ) ( $p=0,035$  критерий Манна–

Уитни) (рис. 3). В сессии для групп мышей с перевитыми клетками опухоли для показателя средней скорости наблюдались аналогичные статистически значимые изменения. В группе животных с ограничением питания средняя скорость была выше ( $0,099 \pm 0,003$ ), чем в группе, находящейся на базовой диете ( $0,081 \pm 0,002$ ) ( $p=0,002$  критерий Манна–Уитни) (рис. 4).

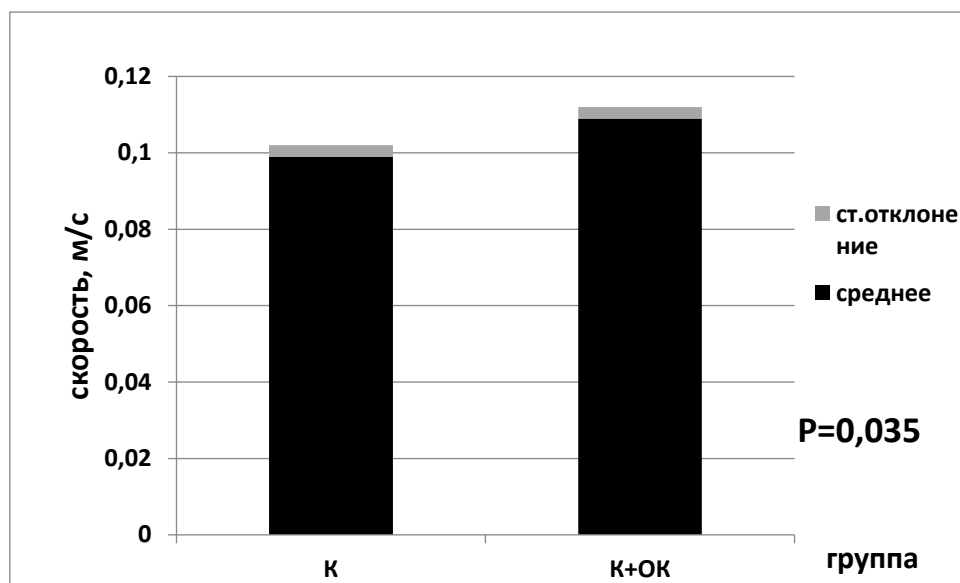


Рис. 3. Средняя скорость в группе контрольных мышей на базовой диете (К) и в группе контрольных мышей на диете с ограничением калорийности питания (К+ОК)

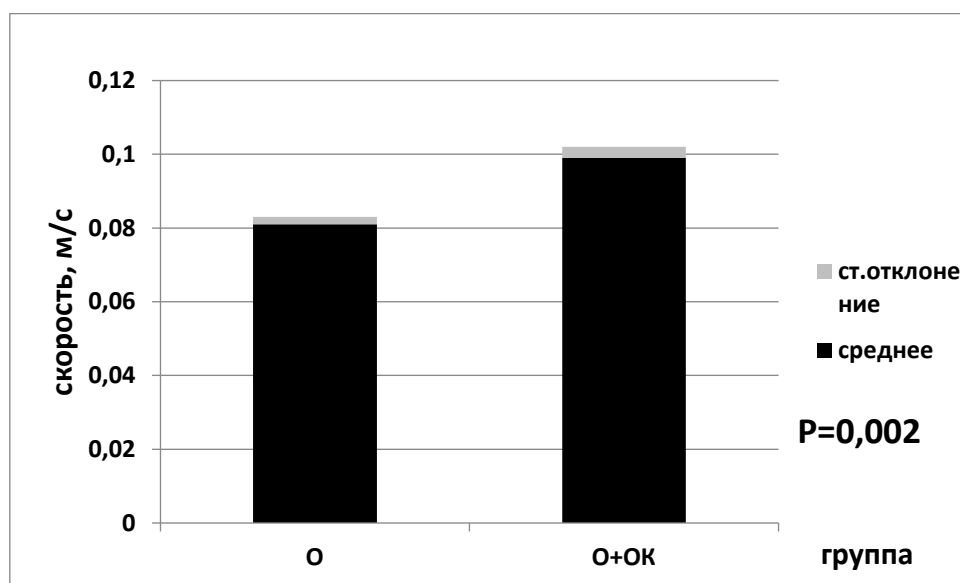


Рис. 4. Средняя скорость в группе опытных мышей на базовой диете (О) и в группе опытных мышей на диете с ограничением калорийности питания (О+ОК).

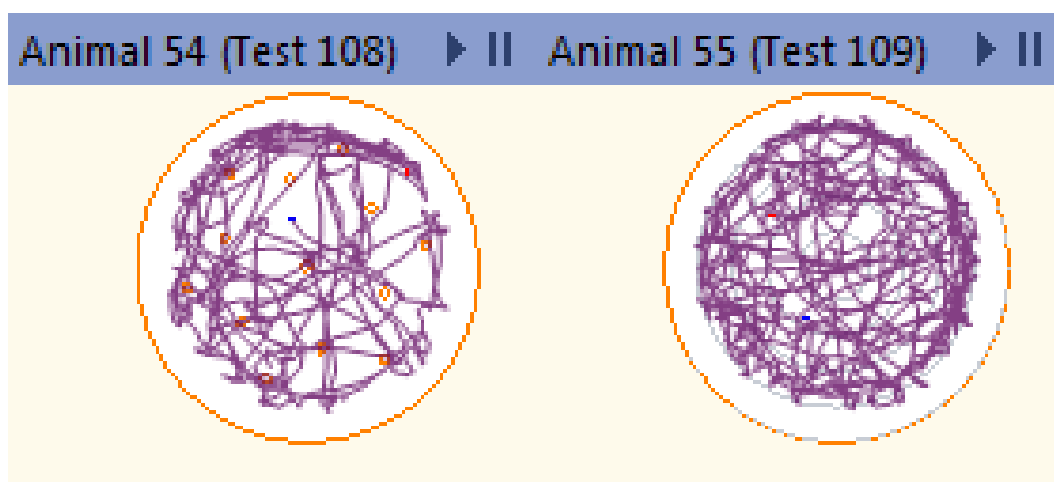
По показателю «время замирания» не выявлено статистически значимой разницы ни в сессии для мышей контрольных групп ( $52,5 \pm 4,1$  для группы мышей на базовой диете;  $44,5 \pm 3,1$  для группы на ОК питания), ни в сессии для групп животных с экспериментальной меланомой В16 ( $50,2 \pm 6,1$  для группы мышей на базовой диете;  $44,4 \pm 2,1$  для группы животных, находившихся на диете с ограничением калорийности).

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что в группах мышей с рестрикцией питания общая локомоторная активность по показателям пройденной дистанции и средней скорости движения по всей территории арены была выше, чем у животных на базовой диете. Причем эта закономерность регистрируется как для сессии контрольных групп мышей, так и для сессии групп мышей с экспериментальной меланомой В16. Следует отметить, что выявлена статистически значимая разница для показателей пройденной дистанции при сравнении групп контрольных мышей на базовой диете и мышей с экспериментальной меланомой, также находящихся на базовой диете ( $p=0,003$  критерий Манна–Уитни). Также выявлена статистически значимая разница между группой контроля на диете с рестрикцией питания и группой с меланомой, также находящейся на диете с ограничением калорийности ( $p=0,034$  критерий Манна–Уитни). Следовательно, развитие опухолевого процесса оказывает влияние на двигательную активность мышей. Однако для групп животных, находящихся на базовой диете (питание вволю), изменения при влиянии опухолевого процесса значительно выше и составляют 16%, тогда как при диете с ограничением калорийности питания уменьшение показателя пройденной дистанции, хоть и является статистически значимым, тем не менее, разброс между контрольной группой мышей и животных с опухолевым процессом составляет только 6%. Вполне возможно, что данные изменения не являются случайными и указывают на менее выраженные нарушения в организме мышей с опухолевым процессом, находящихся на диете с рестрикцией питания.

Сообщается, что ограничение калорий улучшает физическую активность за счет индукции митохондриального биогенеза и модулирует антиоксидантные и воспалительные реакции на острую физическую нагрузку [8]. Согласно результатам многих исследований, ограничение калорий приводит к снижению расхода энергии, определяя метаболическую адаптацию [9]. Такое перепрограммирование метаболических процессов вызывает уменьшение окислительного повреждения и задерживает возрастные изменения физиологических функций. Метаболическая адаптация, вызванная ограничением калорийности, связана с потерей массы тела, снижением секреции инсулина, снижением уровня гормонов щитовидной железы и лептина, а также повышением эффективности использования энергии митохондрий [10].

При режиме питания с ограничением калорийности происходит переход на метаболические модели, связанные с уменьшением воспаления без нарушения функции иммунной системы, что может способствовать защите от различных заболеваний, в том числе опухолевых [11]. В предыдущих исследованиях авторов выявлены положительные изменения параметров опухоли и пролиферативной активности при экспериментальной меланоме В16 у мышей при рестрикции питания. Кроме того, зафиксированы позитивные изменения

антиоксидантной активности для данной экспериментальной модели, которые могут способствовать замедлению прогрессии опухоли [12]. Высокие показатели локомоторной активности групп мышей, находящихся на диете с ограничением калорийности, указывают на метаболическое перепрограммирование в пользу повышения стрессоустойчивости и повышения уровня поисковой активности животных, что, в том числе, связано с активацией биогенеза митохондрий. При ограничении калорийности питания организм переходит в режим поддержания жизнеспособности, что реализуется за счет замедления процессов роста и репродукции [13]. Активация программ стрессоустойчивости приводит к выраженным изменениям внутриклеточных процессов: активации репаративных процессов, повышению стабильности ДНК, изменению скорости метаболизма и продолжительности жизни клеток [4]. Снижение калорийности питания модулирует  $NAD^+$  метаболизм в печени, что способствует усилению глюконеогенеза и повышению энергетических резервов организма [14]. Активация двигательной функции мышц в режиме рестрикции питания является одной из составляющих программ стрессоустойчивости, и, хотя это сопряжено с дополнительными энергетическими тратами организма, в целом данное переключение поведенческих программ требует меньших энергетических ресурсов, нежели программы роста и репродукции. Для иллюстрации изменений двигательной активности мышей на рисунке 5 приведены треки пройденной дистанции для мыши, находящейся на базовой диете, и мыши на диете с ограничением калорийности питания.



*Рис. 5. Трек пройденной дистанции для мыши из группы на базовой диете и мыши из группы на диете с ограничением калорийности питания*

### **Заключение**

Можно сделать предположение, что изменения локомоторной активности мышей при ограничении калорийности питания на 30% в данной экспериментальной модели укладываются в концепцию о повышении работоспособности и энергоэффективности за счет перепрограммирования метаболических процессов в пользу программ стрессоустойчивости.

Включение данных программ выражается, в том числе, в активации двигательной и поисковой активности мышей. И, хотя энергетическая стоимость локомоторной активности, безусловно, выше в группах мышей с ограничением калорийности питания по сравнению с группами мышей на базовой диете (по показателям пройденной дистанции и средней скорости движения), включение режима поддержания жизнеспособности приводит к угнетению более энергоемких программ клеточного роста и деления. Данные изменения происходят как в группах мышей без опухолевого процесса, так и в группах мышей с экспериментальной меланомой B16, что указывает на существенные резервы энергетических ресурсов при режиме рестрикции питания даже для мышей с экспериментальной меланомой B16 за счет принципиальной перестройки метаболических процессов.

### Список литературы

1. Cozzo A.J., Coleman M.F., Pearce J.B., Pfeil A.J., Etigunta S.K., Hursting S.D. Dietary energy modulation and autophagy: exploiting metabolic vulnerabilities to starve cancer // *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020. Vol. 8. P. 590192. DOI: 10.3389/fcell.2020.590192.
2. Vidoni C., Ferraresi A., Esposito A., Maheshwari C., Dhanasekaran D.N., Mollace V., Isidoro C. Calorie Restriction for Cancer Prevention and Therapy: Mechanisms, Expectations, and Efficacy // *Journal of cancer prevention*. 2021. Vol. 26. Is. 4. P. 224-236. DOI: 10.15430/JCP.2021.26.4.224.
3. Park J.H., Pyun W.Y., Park H.W. Cancer metabolism: phenotype, signaling and therapeutic targets // *Cells*. 2020. Vol. 9. Is. 10. P. 2308. DOI: 10.3390/cells9102308.
4. Bose S., Allen A.E., Locasale J.W. The Molecular Link from Diet to Cancer Cell Metabolism // *Molecular Cell*. 2020. Vol. 78. Is. 6. P. 1034-1044. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.05.018.
5. 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.
6. Malagoli C., Malavolti M., Agnoli C., Crespi C.M., Fiorentini C., Farnetani F., Longo C., Ricci C., Albertini G., Lanzoni A., Veneziano L., Virgili A., Pagliarello C., Santini M., Fanti P.A., Dika E., Sieri S., Krogh V., Pellacani G., Vinceti M. Diet Quality and Risk of Melanoma in an Italian Population // *The Journal of nutrition*. 2015. Vol. 145. Is. 8. P. 1800-1807. DOI: 10.3945/jn.114.209320.
7. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 398 с.
8. Capó X., Martorell M., Ferrer M.D., Sureda A., Pons V., Domingo J.C., Drobnic F., Martínez-Rodríguez A., Leyva-Vela B., Sarabia J.M., Herranz-López M., Roche E., Tur J.A., Pons A. Calorie



Restriction Improves Physical Performance and Modulates the Antioxidant and Inflammatory Responses to Acute Exercise // *Nutrients*. Vol. 12. Is. 4. P. 930. DOI: 10.3390/nu12040930.

9. Kebbe M., Sparks J.R., Flanagan E.W., Redman L.M. Beyond weight loss: current perspectives on the impact of calorie restriction on healthspan and lifespan // *Expert review of endocrinology & metabolism*. 2021. Vol. 16. Is. 3. P. 95-108. DOI: 10.1080/17446651.2021.1922077.

10. Most J., Redman L.M. Impact of calorie restriction on energy metabolism in humans // *Experimental gerontology*. 2020. Vol. 133. P. 110875. DOI: 10.1016/j.exger.2020.110875.

11. Longo V.D., Anderson R.M. Nutrition, longevity and disease: From molecular mechanisms to interventions // *Cell*. 2022. Vol. 185. Is. 9. P. 1455-1470. DOI: 10.1016/j.cell.2022.04.002.

12. Сергеева Е.Ю., Фефелова Ю.А., Титова Н.М. Ограничение калорийности питания на 30% у мышей с меланомой B16 приводит к снижению объема опухолевого узла и уменьшению выраженности окислительного стресса в опухолевой ткани // *Современные проблемы науки и образования*. 2023. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=33041>. (дата обращения: 22.05.2024). DOI: 10.17513/spno.33041.

13. Sergeeva E., Ruksha T., Fefelova Y. Effects of obesity and calorie restriction on cancer development // *International journal of molecular sciences*. 2023. Vol. 24. Is. 11. P. 9601. DOI: 10.3390/ijms24119601.

14. Wei X., Wei C., Tan Y., Dong X., Yang Z., Yan J., Luo X. Both prolonged high-fat diet consumption and calorie restriction boost hepatic NAD<sup>+</sup> metabolism in mice // *The Journal of nutritional biochemistry*. 2023. Vol. 115. P. 109296. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2023.109296.