УДК [612.392.5+616-006.81+612.015.11]-092.9

ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ В16 НА ДИЕТЕ С 30%-НЫМ ОГРАНИЧЕНИЕМ КАЛОРИЙНОСТИ

Фефелова Ю.А.[1], Сергеева Е.Ю.[1], Полякова Т.С. [1], Мутьев Н.С. [1]

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

Снижение калорийности питания оказывает влияние на инициацию и течение многих патологических процессов, включая канцерогенез. Ограничение калорий является диетической стратегией, которая может использоваться как потенциальное вспомогательное вмешательство для предотвращения и/или борьбы со злокачественными новообразованиями. Большое количество исследований указывают на принципиальное перепрограммирование метаболических процессов в экспериментальных моделях и в организме человека при использовании режима рестрикции питания при злокачественных опухолевых образованиях. Управление калорийностью питания может стать новым подходом для понимания механизмов развития опухолевых процессов и создания методов прогнозирования рисков развития онкологических заболеваний. Применение комбинации противоопухолевых препаратов с диетическим ограничением открывает возможные пути для достижения эффективных результатов лечения. Цели данного исследования: оценка и анализ влияния ограничения калорийности пищи и питания ad libitum (без ограничений калорийности – питание вволю) на ориентировочно-исследовательскую составляющую поведенческих реакций мышей с экспериментальной меланомой В16. В экспериментальной модели использовалась перевивка клеток меланомы В16 группам мышей линии C57Bl/6, находящихся на диете с рестрикцией питания и на режиме без ограничений калорийности в течение 3 месяцев. Изучение ориентировочно-исследовательской составляющей поведенческих реакций мышей осуществлялось с использованием теста «Открытое поле» с видеофиксацией и последующей программной обработкой информации. Оценивались параметры: количество пересечений границы центральной области установки, временной интервал и интервал преодоленного расстояния в центральной области. Существенно более низкие уровни тревожности и беспокойства выявлены как для контрольных групп мышей на диете с лимитом потребления калорий, так и для групп мышей с экспериментальной меланомой В16 в сравнении с группами без диетического лимитирования. Адаптационные перестройки в пользу программ стрессоустойчивости проявились большей приспособленностью групп мышей на лимитирующей по калорийности диете как к новой стрессогенной ситуации при тестировании животных в установке «Открытое поле», так и к развитию экспериментальной меланомы.

Ключевые слова: рестрикция питания, экспериментальная меланома, ориентировочно-исследовательская активность мышей, молекулярные программы стрессоустойчивости.

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

TENTATIVELY RESEARCH ACTIVITY OF MICE WITH EXPERIMENTAL B16 MELANOMA ON 30% CALORY RESTRICTED DIET

Fefelova Y.A. [1], Sergeeva E.Yu [1], Polyakova T.S. [1], Mutyev N.S. [1]

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

Reducing caloric intake affects the initiation and course of many pathological processes, including carcinogenesis. Calorie restriction is a dietary strategy that can be used as a potential adjuvant intervention for the prevention and/or control of cancer. A large number of studies indicate a fundamental reprogramming of metabolic processes in cancer experimental models and in the patient organism under using a calory restriction. Calorie intake regulation may become a new approach to understanding the mechanisms of cancerogenesis and creating methods for predicting the risks of cancer development. The use of a combination of antitumor drugs with dietary restrictions opens up possible ways to achieve effective treatment results. The purpose of this study: to evaluate and analyze the effect of calorie restriction and ad libitum diet on the orientation-exploratory reactions of mice with experimental B16 melanoma. C57Bl/6 mice were transplanted with B16 melanoma cells and divided into two groups. Experimental group mice kept 30% calory restriction diet and control group mice kept ad libitum

diet for 3 months. The study of the orientation-exploratory reactions of mice was carried out using the open field test with video recording and subsequent software processing of information. The following parameters were assessed: the number of entries into the central zone of the arena, the time the animal spent in the central zone, and the distance traveled in the central zone. Significantly lower levels of anxiety and restlessness were detected for groups of mice on a calorie-restricted diet, both for control groups without a tumor process and for groups of mice with experimental B16 melanoma. Adaptive changes associated with stress resistance programs activation were manifested by increased adaptability of mice on calory restricted diet to a new stressful situation during open field test, the same alterations were associated with revealed inhibition of cancer development.

Keywords: calorie restriction, experimental melanoma, orientation-exploratory activity of mice, molecular programs of stress resistance.

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

Введение

Диета с лимитом калорийности является наиболее эффективным нефармакологическим способом поддержания метаболического здоровья [1, 2]. Злокачественные новообразования тесно связаны со старением и возрастной смертностью. Нет полного понимания в области влияния диет и, в частности, диеты с ограничением калорийности на развитие различных видов опухолей [3]. Снижение потребления калорий уменьшает факторы риска и задерживает возникновение новообразований за счет изменения метаболизма и улучшения характеристик, влияющих на здоровье, включая усиление аутофагии и чувствительности к инсулину, снижение уровня глюкозы в крови, уменьшение выраженности воспаления, процессов ангиогенеза и передачи сигналов факторов роста. Будущие исследования и клинические испытания необходимы для полного понимания биохимической основы ограничения калорийности питания [4, 5]. Важнейшим направлением современных исследований является изучение молекулярных механизмов, задействованных в эффектах ограничения калорийности питания, что может вывести на новые направления терапии опухолевых процессов и послужить основой для разработки персонализированного подхода «еда как лекарство» для здорового старения.

Меланома – это злокачественная опухоль, которая лидирует по количеству смертей во всем мире, поскольку является наиболее устойчивой к современным методам лечения [6]. В структуре заболеваемости злокачественные новообразования кожи занимают одно из ведущих мест в ряде стран мира и в Российской Федерации. Ряд авторов выявили положительное влияние лимитирующих диет при злокачественных новообразованиях и, в частности, при меланоме [7].

Цель исследования

Оценка и анализ влияния диеты с лимитом калорийности и диеты «питание без ограничений» на ориентировочно-исследовательский компонент поведенческих характеристик мышей с экспериментальной меланомой B16.

Материал и методы исследования

В экспериментальной модели 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». Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (протокол № 119 от 07.06.2023 г.).

В результате рандомизации были сформированы следующие группы (по 10 особей в каждой группе):

группа «а» – контрольная – питание ad libitum (питание без ограничений калорийности – базовая диета);

группа «б» – контрольная группа на диете с 30%-ным лимитом калорийности в течение 3 месяцев;

группа «в» – опытная – питание ad libitum (питание без ограничений калорийности – базовая диета) с трансплантацией клеток экспериментальной меланомы B16;

группа «г» – опытная группа на диете с 30%-ным диетическим лимитом по калорийности в течение 3 месяцев с трансплантацией клеток экспериментальной меланомы B16.

Все животные содержались в индивидуальных клетках при естественном освещении с неограниченным доступом к воде. Животные групп «а» и «в» имели нелимитированный доступ к еде (питание вволю – ad libitum). Питание животных групп «б» и «г» осуществлялось в режиме ограничения калорийности из расчета 70% от диеты, удовлетворяющей физиологические потребности животных, с учетом массы тела животных в течение 3 месяцев. Для питания животных всех групп использовался полнорационный сухой гранулированный корм для содержания лабораторных мышей «ЧАРА» (ООО «Фаворит», Россия). Группам животных «в» и «г» через 3 месяца была произведена трансплантация клеток меланомы. Для воспроизведения модели меланомы линии B16 вводили подкожно в боковую поверхность живота $1x10^6$ 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 [8].

Для оценки ориентировочно-исследовательской активности животных использовался тест «Открытое поле». 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. Регистрацию количеств пересечений границ центральной зоны, временных интервалов и интервалов

преодоленного расстояния в центральной зоне осуществляли с помощью видеозаписи. Обработку информации производили с использованием программного обеспечения ANY-MAZE [7].

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

Результаты исследования и их обсуждение

Первая сессия экспериментов была проведена с группами контрольных мышей «а» и «б», которые находились на диете питание ad libitum (базовая диета) и на диете с ограничением калорийности питания соответственно. Вторая сессия была проведена для групп мышей «в» и «г» с перевитой экспериментальной меланомой B16, которые соответственно находились на базовой диете и на диете с ограничением калорийности питания.

Сравнение результатов исследований осуществляли между группами мышей «а» и «б», то есть между группами на диете без лимита по калорийности пищи (основная диета) и на лимитирующей по калорийности диете. Группам мышей «в» и «г» была осуществлена трансплантация клеток меланомы, также эти группы имели различия в диете. Группа мышей «в» получала неограниченный доступ к пище (ad libitum), тогда как группа «г» имела питание, лимитируемое по калорийности.

При помещении животного в освещенное пространство установки «Открытое поле» инициируется стресс, и мышь стремится занять положение у бортика круглой арены, проявляя тревожность в виде эпизодов замирания. Исследовательская активность проявляется продвижением животного по арене в первое время теста по внешним секторам, по мере уменьшения стресса животное начинает исследовать центральную зону арены.

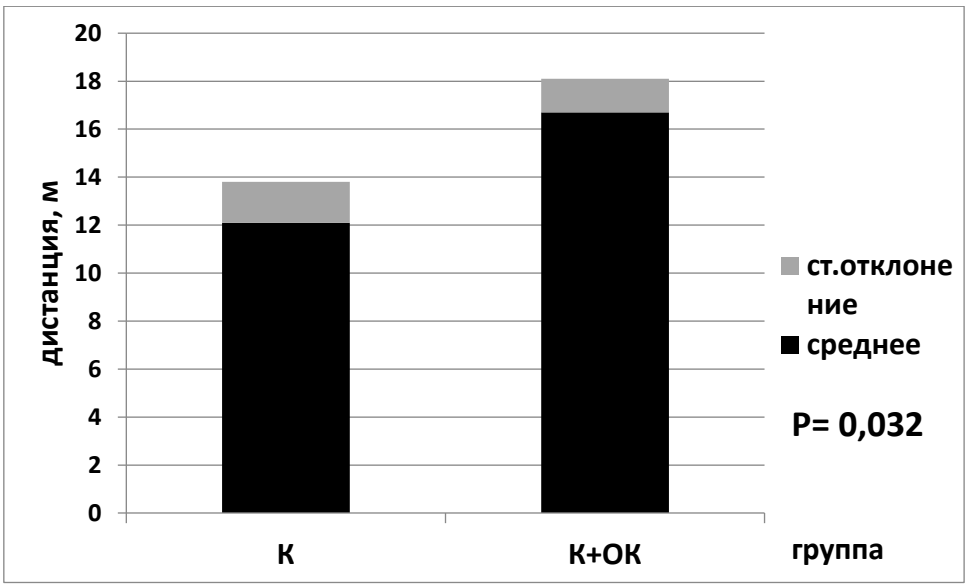

Рис. 1. Интервалы преодоленного расстояния в центральной области установки в группе «а» на базовой диете (К) и в группе «б» на лимитирующей по калорийности диете (К+ОК). Обозначения: К – контрольная группа; К+ОК – контрольная группа (К) на ограничении калорийности питания (ОК)

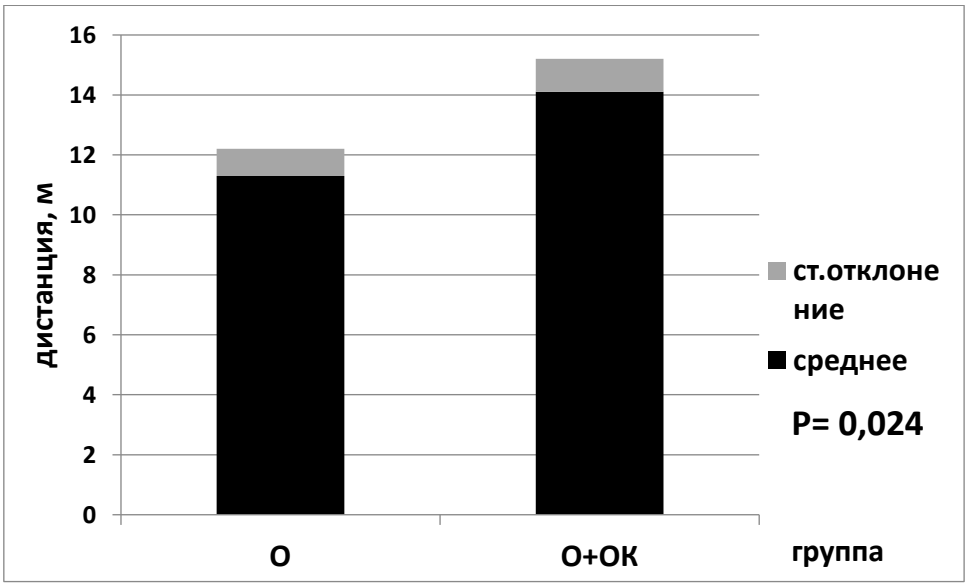

Рис. 2. Интервалы преодоленного расстояния в центральной области установки в группе мышей с опухолью «в» на базовой диете (О) и в группе мышей с опухолью «г» на лимитирующей по калорийности диете (О+ОК).
Обозначения: О – опытная группа с опухолью; О+ОК – опытная группа с опухолью (О) на ограничении калорийности питания (ОК)

При проведении данного теста можно сделать заключение об основных аспектах поведения – исследовательской активности, которая выражается в предпочтении исследовать преимущественно периферическую или центральную зону арены. Другим аспектом поведения является оценка тревожности поведения по тенденции оставаться вблизи ограничительного

бортика арены (тигмотаксис) и, соответственно, снижению времени нахождения в центральной зоне арены [9].

Интервалы преодоленного расстояния в центральной области арены, согласно полученным результатам, были статистически значимо выше для контрольных групп животных на диете с лимитом калорийности. Для группы «а» значения составили 16,7±1,4; для группы контроля «б» – 12,1±1,7; p=0,032 по критерию Манна–Уитни (рис. 1). Интервалы преодоленного расстояния для животных с экспериментальной меланомой B16 в центральной области установки были выше опять же для группы с лимитирующей диетой. Для группы «в» значения составили 14,1±1,1, для группы «г» – 11,3±0,9; p=0,024 по критерию Манна–Уитни (рис. 2).

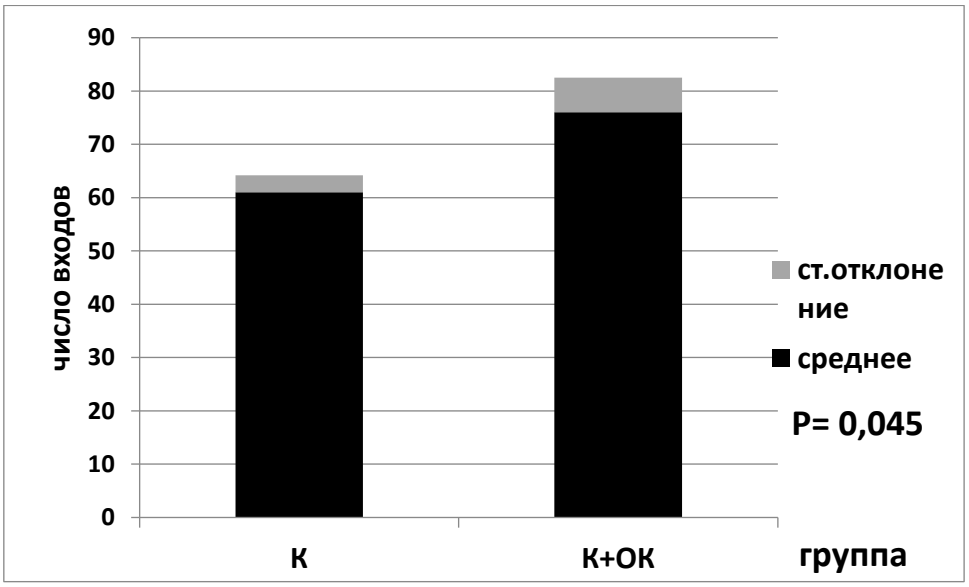

Рис. 3. Количество пересечений границы центральной области арены в контрольной группе на диете ad libitum (К) и в контрольной группе на лимитирующей по калорийности диете (К+ОК). Обозначения: К – контрольная группа; К+ОК – контрольная группа (К) на ограничении калорийности питания (ОК)

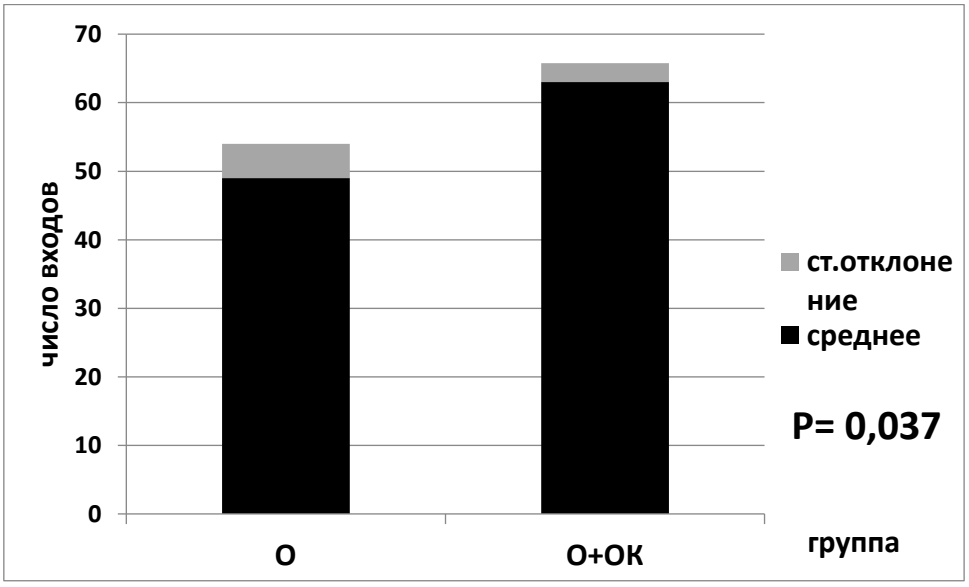

Рис. 4. Количество пересечений границы центральной области арены в опытной группе на диете ad libitum (О) и в опытной группе на лимитирующей по калорийности диете (О+ОК). Обозначения: О – опытная группа с опухолью; О+ОК – опытная группа с опухолью (О) на ограничении калорийности питания (ОК)

Статистически значимая разница показателей «количество пересечений границы центральной области установки» зафиксирована для контрольных групп «а» и «б» с отличиями в диетах. Для группы с диетой ad libitum (рис. 3) показатель составил 62,0±3,21, тогда как для группы с лимитирующей по калорийности диетой показатель был выше и составил 76,0±6,5 (согласно критерию Манна–Уитни p=0,045). Показатели по количеству пересечений границы центральной области арены для групп опытных животных с экспериментальной меланомой демонстрировали аналогичную закономерность. Мыши группы «г» на лимитирующей по питанию диете с опухолевым процессом имели статистически значимо более высокий показатель – 63,0±2,76, чем мыши группы «в» на диете питание ad libitum – 49,0±5,01 (согласно критерию Манна–Уитни p=0,002) (рис. 4).

Однако для показателя «временной интервал пребывания в центральной области арены» статистически значимой разницы для контрольных групп с различиями в диете не зафиксировано. Показатель для группы «а» составил 136,0±25,05, для группы «б» – 145,0±24,07. Для опытных групп животных также не зафиксировано статистически значимой разницы показателей для животных на диете питание ad libitum (129,0±19,1) и для животных на лимитирующей по калорийности диете (135,0±21,07).

Резюмируя полученные закономерности, можно сделать вывод, что применение лимитирующей по калорийности диеты в группах контрольных мышей и в группах животных с опухолевым процессом приводило к положительным изменениям ориентировочно-исследовательской активности животных по показателям «интервалы преодоленного расстояния в центральной области установки» и «количество пересечений границы центральной области установки». Более высокие значения показателей пересечения границ центральной зоны арены для групп животных на лимитирующих по калорийности диетах позволяют сделать заключение о существенно более низких уровнях тревожности и беспокойства этих групп мышей, тогда как у животных, находящихся на базовой диете, отмечалась специфическая траектория с преобладанием перемещения по периферическим зонам арены. Сообщается, что ограничение калорийности питания можно рассматривать как стрессогенный фактор для организма, который переключает метаболические процессы в пользу снижения секреции инсулина, гормонов щитовидной железы и лептина, а кроме того, повышает эффективность использования энергии митохондрий [10]. Группой авторов

обнаружен интересный факт, заключающийся в том, что при наложении двух стрессогенных ситуаций (первая из которых – рестрикция питания, вторая – кратковременная иммобилизация крыс) никаких дополнительных эффектов на изучаемые параметры (изменение веса надпочечников и тимуса, повышение уровня кортикостерона в плазме, уровня перекисного окисления липидов в печени и сердце) не выявлено. Следовательно, дополнительная стрессогенная ситуация, помимо рестрикции питания, а именно помещение мышей в освещенную открытую арену в исследовании авторов, приводила к выраженному более низкому уровню тревожности и беспокойства по сравнению с животными на базовой диете. Адаптационные перестройки метаболических процессов в пользу стрессоустойчивости проявились большей приспособленностью животных к дополнительной новой стрессогенной ситуации при применении лимитирующей по калорийности диеты. Обращают на себя внимание данные о том, что ограничение калорийности питания способствует эндотелийзависимой вазодилатации путем активации эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS – endothelial nitric oxide synthase) и повышения уровня оксида азота (NO) посредством множественных каскадов, включающих модуляцию окислительного стресса, аутофагии и воспаления [11, 12]. И это тоже может указывать на компенсаторные сдвиги в регуляторных процессах кровообращения и сердечной деятельности при режиме ограничения калорийности на дополнительный стрессовый стимул. Также имеются исследования влияния ограничения калорий на когнитивные функции [13]; и опять же, авторы свидетельствуют об улучшении рабочей памяти, физической активности и показателей расхода энергии. B.C. Jarvie и соавторы показали в исследовании на мышах, что ГАМК-эргический фенотип проопиомеланокортиновых нейронов (POMC-нейронов) чувствителен к энергетическому состоянию и изменяется при дефиците калорий [14]. Таким образом, исследования авторов укладываются в модель представлений о включении программ сторессоустойчивости как у контрольных групп мышей, так и у опытных с трансплантацией опухоли B16 при диете с ограничением калорийности питания. Кроме того, можно предполагать включение адаптивных программ при диете с рестрикцией питания для восприятия нового стрессогенного фактора, а именно тестирования испытуемых животных в установке «Открытое поле». На рисунке 5 приведены треки движения мышей при исследовании ориентировочно-исследовательской активности. На первом слайде видно, что мышь предпочитает оставаться на периферии арены, тогда как на втором слайде очевидными являются перемещения животного и по центральным зонам арены.

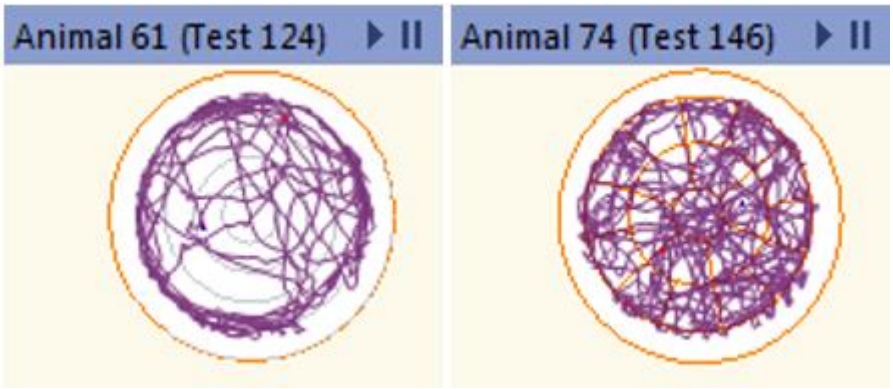

Рис. 5. Трек перемещений и нахождения животного по зонам арены для мыши из группы «а» и мыши из группы «б» на лимитирующей диете

Следует отметить, что опухолевый процесс оказывал влияние на уровни тревожности и беспокойства животных, о чем можно судить по тенденции к снижению показателей «интервалы преодоленного расстояния в центральной области установки» и «количество пересечений границы центральной области установки» в группах мышей с опухолевым процессом. Однако то, что рестрикция питания так существенно влияла на данные показатели, указывает на благоприятные изменения в организме животных не только без опухолевого процесса, но и с экспериментальной меланомой B16.

Заключение

Существенно более низкие уровни тревожности и беспокойства как компоненты ориентировочно-исследовательского поведения мышей фиксировались при содержании животных на ограниченной по калорийности диете. Подобная закономерность прослеживалась в контрольной группе и в опытной группе с трансплантацией клеток экспериментальной меланомы B16 и развитием опухолевого процесса. Перепрограммирование метаболизма в ответ на лимитирующую по калорийности диету определяет выраженную адаптационную приспособленность как к новой стрессогенной ситуации при тестировании животных в установке «Открытое поле», так и к опухолевому процессу.

Список литературы

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

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 // J. Cancer Prev. 2021. Vol. 26. Is. 4. P. 224-236. DOI: 10.15430/JCP.2021.26.4.224.

3. Mishra A., Giuliani G., Longo V.D. Nutrition and dietary restrictions in cancer prevention // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2024. Vol. 1879. Is. 1. P. 189063.
DOI: 10.1016/j.bbcan.2023.189063.

4. Isaac-Lam M.F., DeMichael K.M. Calorie restriction and breast cancer treatment: a mini-review // Mol Med (Berl). 2022. Vol. 100. Is. 8. P. 1095-1109. DOI: 10.1007/s00109-022-02226-y.

5. Kökten T., Hansmannel F., Ndiaye N.C., Heba A.C., Quilliot D., Dreumont N., Arnone D., Peyrin-Biroulet L. Calorie Restriction as a New Treatment of Inflammatory Diseases // Adv. Nutr. 2021. Vol. 12. Is. 4. P. 1558-1570. DOI: 10.1093/advances/nmaa179.

6. Robertson B.M., Fane M.E., Weeraratna A.T., Rebecca V.W. Determinants of resistance and response to melanoma therapy // Nat Cancer. 2024. Is. 5. P. 964-982.
DOI: 10.1038/s43018-024-00794-1.

7. 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 // J Nutr. 2015. Vol. 145. Is. 8. P. 1800-1807. DOI: 10.3945/jn.114.209320.

8. Фефелова Ю.А., Сергеева Е.Ю., Шерстнев А.П., Мутьев Н.С., Полякова Т.С. Поведенческие функции мышей с экспериментальной меланомой B16 при режиме рестрикции питания // Современные проблемы науки и образования. 2024. № 3. URL: https://science-education.ru/article/view?id=33470 (дата обращения: 07.02.2025).
DOI: 10.17513/spno.33470.

9. Seibenhener M.L., Wooten M.C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice // Journal of Visualized Experiments. 2015. Vol. 96. P. e.52434. DOI: 10.3791/52434.

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. Al Attar A.A., Fahed G.I., Hoballah M.M., Pedersen S., El-Yazbi A.F., Nasser S.A., Bitto A., Orekhov A.N., Eid A.H. Mechanisms underlying the effects of caloric restriction on hypertension // Biochem Pharmacol. 2022. Vol. 200. P. 115035. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115035.

12. Di Daniele N., Marrone G., Di Lauro M., Di Daniele F., Palazzetti D., Guerriero C., Noce A. Effects of Caloric Restriction Diet on Arterial Hypertension and Endothelial Dysfunction // Nutrients. 2021. Vol. 13. Is. 1. P. 274. DOI: 10.3390/nu13010274.

13. Leclerc E., Trevizol A.P., Grigolon R.B., Subramaniapillai M., McIntyre R.S., Brietzke E., Mansur R.B. The effect of caloric restriction on working memory in healthy non-obese adults // Randomized Controlled Trial CNS Spectr. 2020. Vol. 25. Is. 1. P. 2-8.
DOI: 10.1017/S1092852918001566.

14. Jarvie B.C., King C.M., Hughes A.R., Dicken M.S., Dennison C.S., Hentges S.T. Caloric restriction selectively reduces the GABAergic phenotype of mouse hypothalamic proopiomelanocortin neurons // J Physiol. 2017. Vol. 595. Is 2. P. 571-582. DOI: 10.1113/JP273020.