

© ФЕФЕЛОВА Ю. А., ЖУКОВ Е. Л., СЕРГЕЕВА Е. Ю., МИХАЙЛОВА А. К.

УДК 616-006.81:613.24

DOI: 10.20333/2500136-2019-6-96-99

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ B16 ПРИ ОГРАНИЧЕНИИ КАЛОРИЙНОСТИ ПИТАНИЯ

Ю. А. Фефелова, Е. Л. Жуков, Е. Ю. Сергеева, А. К. Михайлова

Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск 660022, Российская Федерация

Цель исследования. Исследование морфологических особенностей клеток экспериментальной меланомы B-16 у мышей линии C57/BL6, находящихся на контрольной диете (питание не ограничено) и на диете с 30 % ограничением калорийности.

Материал и методы. Мышам линии C57/BL6 производилась перевивка 5x10⁵ клеток меланомы B-16 в 0,5 мл раствора Хенкса подкожно. После трансплантации опухоли контрольная группа получала базовую диету (ad libitum); опытная группа находилась на режиме ограничения калорийности питания в 70 % от диеты, удовлетворяющей физиологические потребности животных. Забор материала производили на 22 сутки развития опухолевого процесса. Цитоморфометрические исследования гистологических препаратов материалов опухолевой ткани включали измерение площади опухолевых клеток и их ядер с расчетом ядерно-цитоплазматического отношения, измерение численной плотности и митотической активности опухолевых клеток (митотический индекс).

Результаты. При ограничении калорийности питания на 30 % от рациона, соответствующего физиологическим потребностям, отмечалось снижение митотической активности опухолевых клеток и уменьшение их количества на единицу площади опухоли по сравнению с опухолевыми клетками экспериментальной меланомы животных, питавшихся без ограничения калорийности рациона.

Заключение. Выявленные закономерности митотического режима и численной плотности клеток указывают на угнетение прогрессии опухоли при ограничении калорийности питания в экспериментальной модели меланомы B-16.

Ключевые слова: меланома B-16, рацион питания, ограничение калорийности, митотическая активность, ядерно-цитоплазматическое отношение, канцерогенез.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Фефелова ЮА, Жуков ЕЛ, Сергеева ЕЮ, Михайлова АК. Морфологические особенности экспериментальной меланомы B16 при ограничении калорийности питания. *Сибирское медицинское обозрение.* 2019;(6):96-99. DOI: 10.20333/2500136-2019-6-96-99

MORPHOLOGICAL FEATURES OF EXPERIMENTAL B16 MELANOMA IN CASE OF FOOD CALORIES LIMITATION

Yu. A. Fefelova, E. L. Zhukov, E. Yu. Sergeeva, A. K. Mihaylova

Professor V. F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation

The aim of the research is investigation of morphological characteristics of experimental B-16 melanoma cells in C57 / BL6 mice-line on a check diet (nutrition is unlimited) and on a diet with 30 % calorie limitation.

Material and methods. C57 / BL6 mice-lines were subinoculated with 5x10⁵ B-16 melanoma cells in 0.5 ml of Hanks solution subcutaneously. After tumor transplantation, the check group received basic diet (ad libitum); the experimental group had limiting calorie intake in 70 % of the diet, satisfying physiological needs of animals. The material was taken on the 22nd day of the development of tumor process. Cytomorphometric studies of histological preparations of tumor tissue materials included measuring the area of tumor cells and their nuclei with calculation of nuclear-cytoplasmic ratio, measurement of numerical density and mitotic activity of tumor cells (mitotic index).

Results. In case of calorie limitation of nutrition by 30 % of the diet corresponding to physiological needs, there was a decrease in mitotic activity of tumor cells and a decrease in their number per tumor unit area compared to tumor cells of experimental melanoma of animals fed without limitation of calories intake.

Conclusion. The revealed patterns of mitotic regime and numerical density of cells indicate inhibition of tumor progression while limiting calories intake in experimental model of B-16 melanoma.

Key words: B-16 melanoma, diet, calorie limitation, mitotic activity, nuclear-cytoplasmic ratio, carcinogenesis.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Fefelova YuA, Zhukov EL, Sergeeva EYu, Mihaylova AK. Morphological features of experimental B16 melanoma in case of food calories limitation. *Siberian Medical Review.* 2019;(6):96-99. DOI: 10.20333/2500136-2019-6-96-99

Введение

Значительное количество исследований в последние десятилетия показали защитное действие ограничения калорийности питания на организм при развитии таких заболеваний как сахарный диабет [1], нейродегенеративные патологии [2], болезни системы кровообращения [3] и различные виды рака [4, 5, 6].

В условиях воздействия стресс факторов в экспериментальных моделях на животных, в частности при

ограничении калорийности питания, организм переходит в режим поддержания жизнеспособности, что реализуется за счет включения программ стрессоустойчивости и приостановки роста и репродукции [7]. Ограничение калорийности (ОК), вероятно, является наиболее эффективным режимом питания для подавления процесса канцерогенеза. Для дальнейшего определения профилактических и терапевтических стратегий рака у человека необходимо изучение клю-

чевых биологических механизмов положительных эффектов ОК в экспериментальных моделях на животных [8].

Злокачественная меланома – наиболее агрессивная форма опухоли [9]. В группе злокачественных новообразований кожи на долю меланомы приходится 4 %, однако она является причиной 80 % смертей в данной группе [10]. Изучение влияния характера питания на процессы развития меланомы является перспективным научным направлением [11], однако патоморфологические аспекты меланомы кожи при экспериментальном ограничении калорийности исследовались не достаточно. Целью нашей работы явилось исследование морфологических параметров клеток экспериментальной меланомы В-16 у мышей линии С57/BL6, находящихся на контрольной диете и на диете с 30 % ограничением калорийности.

Материал и методы

Объект исследования – мыши, самки линии С57/BL6 массой 20-22 гр. Мышей содержали при постоянной температуре 20-22 °С со световым периодом 12 часов в индивидуальных клетках [12]. Диета животных была строго сбалансирована, для чего использовался гранулированный полнорацционный 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).

Животным подкожно перевивали 5x10⁵ кле-

ток меланомы В-16 в 0,5 мл раствора Хенкса. После трансплантации опухоли меланомы В-16 мыши случайным образом были разделены на 2 группы. 1 группа: 7 мышей – контрольная – получала базовую диету (ad libitum); 2 группа: 8 мышей – опытная – имела ограничение калорийности питания в 70 % от диеты, удовлетворяющей физиологические потребности животных, с сохранением содержания микронутриентов и минорных компонентов питания.

На 22 сутки, после эвтаназии животных, опухоль иссекали в пределах неповрежденных тканей, фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартным методикам пропитывали парафином и изготавливали гистологические препараты окрашенные гематоксилин-эозином [13].

Цитоморфометрические исследования были выполнены на микроскопе Nikon Eclipse Ni-U с насадкой для фото-видео документации Nikon DS-Fi2 и пакетом программного обеспечения NIS-Elements Document.

В гистологических препаратах измеряли площадь опухолевых клеток и их ядер в квадратных микрометрах (кв.мкм) с расчетом ядерно-цитоплазматического отношения, подсчитывали количество клеток на 1 квадратный миллиметр (кв.мм) площади гистологического среза, рассчитывали митотический индекс опухоли. Численную плотность опухолевых клеток измеряли в 10 полях зрения. Митотическую активность определяли как процент митозов на 1000 опухолевых клеток (митотический индекс).

Для описания полученных данных использовали

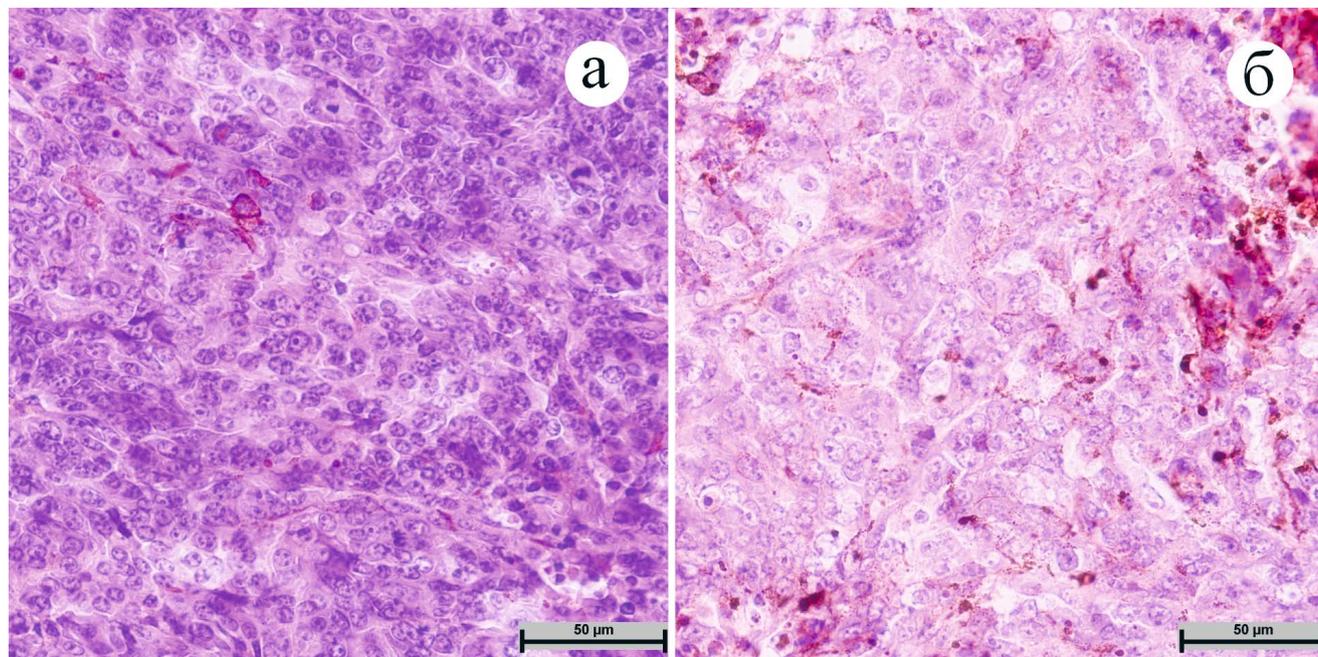


Рисунок. Меланома В-16 в коже мышей: а – контрольная группа, б – группа с ограничением калорийности рациона (окраска гематоксилин-эозин, Х400).

Figure. Melanoma B-16 in mice skin: a - check group, b - group with limitation of calories intake (hematoxylin-eosin stain, X400).

Таблица

Цитоморфометрические параметры клеток меланомы B-16 животных экспериментальной и контрольной групп, Ме [Q1;Q3]

Table

Cytomorphometric parameters of B-16 melanoma cells in animals of experimental and check groups, Me [Q1; Q3]

Параметр	Контрольная группа животных	Группа животных с ограничением калорийности	p
Площадь опухолевой клетки, в кв.мкм	63,52[49,35;82,47]	76,37[55,49;98,50]	p=0,00
Площадь ядра опухолевой клетки, в кв.мкм	19,67[15,06;27,66]	31,89[21,52;42,01]	p=0,00
Ядерно-цитоплазматическое отношение опухолевой клетки	0,33 [0,27;0,39]	0,42 [0,35;0,48]	p=0,00
Количество опухолевых клеток на 1 кв.мм.	12932[11392;14526]	9965[8389;11572]	p=0,00
Митотический индекс, в промилле	17,93[14,78;24,76]	12,76 [9,32;14,06]	p=0,015

медиану (Ме) и первый и третий квартили [Q1;Q3], сравнение проводили с помощью критерия Манна-Уитни (U-тест), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В гистологических препаратах от всех животных наблюдался рост опухолевой ткани, имеющей типичные характерные черты меланомы (рис.).

При оценке цитометрических показателей опухолевых клеток было выявлено, что при ограничении калорийности рациона питания происходит статистически значимое увеличение площади опухолевой клетки, ее ядра и ядерно-цитоплазматического отношения (табл.).

Таким образом, клетки экспериментальной меланомы при ограничении калорийности питания в 1,2 раза больше по площади, чем клетки контрольной группы. Имеют значительно более крупное ядро, площадь которого в 1,62 раза превышает площадь ядра клеток контрольной группы и, соответственно, более высокое ядерно-цитоплазматическое отношение – больше в 1,27 раза. Эти результаты указывают, что развитие меланомы B-16 при условиях ограничения калорийности идет по пути увеличения габаритных параметров клеток и их ядра.

При оценке количества клеток на единицу площади гистологического среза отмечается, что в экспериментальной группе животных их содержится статистически значимо меньше (в 1,3 раза), чем в контрольной группе (табл.).

Митотическая активность опухолевых клеток при режиме ограничения калорийности питания статистически значимо снижается – в 1,4 раза, это позволяет предположить, что ограничение калорийности оказывает тормозящее влияние на рост опухоли (табл.). Также следует отметить, что макроскопическое исследование опухоли показало тенденцию к уменьшению объема опухолевого поражения при ограничении калорийности питания.

Заключение

Эффект влияния ограничения калорийности питания на рост опухоли в экспериментальных моделях на животных различен в зависимости от типа рака [14]. При меланоме кожи одним из направлений терапевтической стратегии может быть комбинация противораковых препаратов с ограничением калорийности питания [15]. Проведенное нами исследование позволяет сделать следующие выводы: при ограничении калорийности питания в экспериментальной модели меланомы B-16 у мышей линии C57/BL6 происходит снижение митотической активности опухолевых клеток, увеличение размеров клеток опухоли и, соответственно, уменьшение количества опухолевых клеток в единице объема опухоли.

Митотический индекс первичной опухоли (меланомы) включен в руководства по определению стадий рака (AJCC) и является важнейшим независимым прогностическим показателем. Чем выше митотический индекс, тем более агрессивна меланома первичного очага поражения. Полученные нами данные позволяют сделать заключение о снижении прогрессии опухоли при режиме 30 % ограничения калорийности питания в модели меланомы B-16, что указывает на важную роль диеты в процессах развития экспериментальной меланомы.

Литература / References

1. Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. *Journal of Experimental Biology*. 2015;218(1):59-70. DOI:10.1242/jeb.107110
2. O'Flanagan CH, Smith LA, McDonnell SB, Hursting SD. When less may be more: calorie restriction and response to cancer therapy. *BMC Medicine*. 2017;15(1):106. DOI: 10.1186/s12916-017-0873-x
3. Ikizler TA, Robinson-Cohen C, Ellis C, Headley SAE, Tuttle K, Wood RJ, Evans EE, Milch CM, Moody KA, Germain M, Limkunakul C, Bian A, Stewart TG, Himmelfarb J. Metabolic effects of diet and exercise in

patients with moderate to severe CKD: A randomized clinical trial. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2018;29(1):250-9. DOI: 10.1681/ASN.2017010020

4. Antunes F, Corazzari M, Pereira G, Fimia GM, Piacentini M, Smaili S. Fasting boosts sensitivity of human skin melanoma to cisplatin-induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;485(1):16-22. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.149

5. Cadoni E, Marongiu F, Fanti M, Serra M, Laconi E. Caloric restriction delays early phases of carcinogenesis via effects on the tissue microenvironment. *Oncotarget*. 2017;8(22):36020-36032. DOI:10.18632/oncotarget.16421

6. Solon-Biet SM, Mitchell S, de Cabo R, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ. Macronutrients and caloric intake in health and longevity. *Journal of Endocrinology*. 2015;226(1):R17-28. DOI:10.1530/JOE-15-0173

7. Москалев АА, Прошкина ЕН, Белый АА, Соловьев ИА. Генетика старения и долголетия. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(4):426-40. Moskalev AA, Proshkina EN, Belyi AA, Solovyev IA, Genetics of aging and longevity. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):426-40. (In Russian)]

8. Harvie MN, Howell T. Could Intermittent Energy Restriction and Intermittent Fasting Reduce Rates of Cancer in Obese, Overweight, and Normal-Weight Subjects? A Summary of Evidence. *Advances in Nutrition*. 2016;7(4):690-705. DOI:10.3945/an.115.01176

9. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CS, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014;28(6):1005-1011.

10. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica (Cairo)*. 2013;(2013):635203. DOI:10.1155/2013/635203

11. Grigura V, Barbier M, Zarov AP, Kaufman CK. Feeding amount significantly alters overt tumor onset rate in a zebrafish melanoma model. *Biology Open*. 2018;(1):1905-10. DOI:10.1242/bio.030726

12. Каркищенко НН, Грачева СВ. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль-2С; 2010. 354 с. [Karkishchenko NN, Gracheva SV. The guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology. Moscow : Profil' -2S; 2010. 354 p. (In Russian)]

13. Коржевский ДЭ. Морфологическая диагностика: подготовка материала для морфологического исследования и электронной микроскопии : руководство. СПб. : СпецЛит; 2013. 126 с. [Korzhevsky DE. Morphological diagnostics: preparation of material for morphological investigation and electron microscopy : guide. St. Petersburg : SpetsLit; 2013. 126 p. (In Russian)]

14. Rubio-Patiño C, Bossowski JP, De Donatis GM, Mondragón L, Villa E, Aira LE, Chiche J, Mhaidly R, Lebeauapin C, Marchetti S, Voutetakis K, Chatziioannou A, Castelli FA, Lamourette P, Chu-Van E, Fenaille F, Avril T, Passeron T, Patterson JB, Verhoeven E, Bailly-Maitre B, Chevet E, Ricci JE. Low-Protein Diet Induces IRE1 α -Dependent Anticancer Immunosurveillance. *Cell Metabolism*. 2018;27(4):828-842.e7. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.02.009

15. Antunes F, Corazzari M, Pereira G, Fimia GM, Piacentini M, Smaili S. Fasting boosts sensitivity of human skin melanoma to cisplatin-induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;485(1):16-22. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.149

Сведения об авторах

Фефелова Юлия Анатольевна, д.б.н., доцент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2283649; e-mail: fefelovaja@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5434-7155>

Жуков Евгений Леонидович, к.м.н., доцент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201422; e-mail: evgen_patolog@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2783-733X>

Сергеева Екатерина Юрьевна, д.б.н., профессор, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2283649; e-mail: e.ye.sergeeva@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2089-6022>

Михайлова Анна Константиновна, к.м.н., ассистент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2283649; e-mail: anna5566@mail.ru

Author information

Yuliya A. Fefelova, Dr.Biol.Sci., Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2283649; e-mail: fefelovaja@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5434-7155>

Evgeniy L. Zhukov, Dr.Med.Sci., Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391) 2201422; e-mail: evgen_patolog@mail.ru

Ekaterina Yu. Sergeeva, Dr.Biol.Sci., Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2283649; e-mail: e.ye.sergeeva@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2089-6022>

Anna K. Mihaylova, Cand.Med.Sci., Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2283649; e-mail: anna5566@mail.ru

Поступила 22.06.2018 г.
Принята к печати 11.10.2019 г.

Received 22 June 2018
Accepted for publication 11 October 2019



This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.