

О.В. Кеца, М.М. Марченко, И.А. Шмараков

Роль митохондриальной NO-синтазы в реализации противоопухолевых эффектов полиненасыщенных жирных кислот на модели карциномы Герена в условиях *in vivo*

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, Украина

Исследовали NO-синтазную активность и уровень NO в митохондриальной фракции карциномы Герена крыс в условиях различной обеспеченности организма ω -3 и ω -6 полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК).

В качестве модели злокачественного новообразования использовали карциному Герена, трансплантированную путем подкожного введения в участок бедра 0,5 мл 30% суспензии раковых клеток в физиологическом растворе. Интенсивность роста опухоли оценивали на основе измерений размеров и коэффициента массы опухоли.

Показано, что наиболее выраженный противоопухолевый эффект предварительного и посттрансплантационного введения ω -3 ПНЖК наблюдается в период интенсивного роста карциномы Герена в организме крыс. Дополнительное введение крысам ω -6 ПНЖК способствует стимуляции роста опухоли в организме и повышению коэффициента массы опухоли в логарифмическую фазу онкогенеза. Эффект ω -3 и ω -6 ПНЖК зависит от длительности их введения и степени предварительной обеспеченности организма этими нутриентами.

Установлено, что на фоне торможения роста карциномы Герена у крыс, получавших ω -3 ПНЖК, наблюдается повышение NO-синтазной активности и генерации оксида азота в митохондриальной фракции опухоли в логарифмическую фазу онкогенеза. В то же время, введение ω -6 ПНЖК не способствует значительным изменениям компонентов NO-синтазной системы в митохондриальной фракции карциномы Герена в сравнении с крысами-опухоленосителями, не получавшими исследуемые нутриенты.

Ключевые слова: NO-синтаза, митохондриальная фракция, карцинома Герена, коэффициент массы опухоли, ω -3 и ω -6 полиненасыщенные жирные кислоты, крысы

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) принадлежат к эссенциальным нутриентам, играющих важную роль в реализации многочисленных физиологических процессов в организме в норме и при патологических состояниях [4]. ПНЖК служат предшественниками многих био-

логически активных веществ — эйкозаноидов, резолвинов и протектинов, что позволяет использовать эти нутриенты для предупреждения многих заболеваний, в том числе и онкологических [2, 10, 12]. Перспектива применения противоопухолевых препаратов зависит от исследования клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе развития и прогрессии рака. Известно, что NO-синтазная система и оксид азота влияют на развитие трансформированных клеток [11], однако механизмы их действия в условиях *in vivo* до конца не выяснены. Ранняя коррекция этих механизмов с помощью ПНЖК могла бы повысить эффективность противоопухолевого лечения и гипотетически предотвратить развитие и прогресс онкозаболеваний.

В настоящее время единого мнения о степени влияния различных видов ПНЖК на процессы развития в организме злокачественных новообразований нет. Особенное значение имеют ω -3 и ω -6 ПНЖК — два основных семейства ПНЖК, владеющих разнонаправленной биологической активностью [18]. ω -3 ПНЖК преимущественно найдены в морских продуктах и проявляют благоприятные эффекты на человеческий организм. В то же время, ω -6 ПНЖК в большей степени присутствуют в ежедневной диете и могут вовлекаться в развитие многих патологических процессов, включая онкогенез [1]. Изучение зависимости противоопухолевой резистентности крыс от обеспеченности ω -3 и ω -6 ПНЖК и участие в этих процессах митохондриальной NO-синтазной системы, возможно, приведет к стратегии разработки диет с определенным соотношением и дозами этих ПНЖК, предотвращающих онкогенез.

Учитывая изложенное выше, целью исследования было изучение влияния ω -3 и ω -6 ПНЖК на темпы роста карциномы Герена, а также, NO-синтазную активность и уровень NO в митохондриальной фракции карциномы Герена крыс в зависимости от разной обеспеченности ПНЖК.

Материалы и методы

Исследования проводили на самках белых беспородных крыс массой тела 90-110 г. Всего в эксперименте использовано 80 крыс. Рацион животных в течение всего

эксперимента был сбалансированным по всем нутриентам. Содержание экспериментальных животных и манипуляции с ними проводили с соблюдением требований «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для опытных и научных целей» (Страсбург, 1986).

Как модель злокачественного новообразования использовали карциному Герена. Трансплантацию карциномы осуществляли путем подкожного введения в участок бедра 0,5 мл 30% суспензии раковых клеток в физиологическом растворе по методике [14].

Животные были разделены на группы: I — крысы с трансплантированной карциномой Герена (контроль); II — крысы, которым до и после трансплантации карциномы Герена дополнительно вводили рыбий жир, обогащенный ω -3 ПНЖК; III — крысы, получавшие рыбий жир только до трансплантации опухоли; IV — крысы, получавшие рыбий жир только после трансплантации карциномы Герена; V — крысы, которым до и после трансплантации карциномы Герена дополнительно вводили подсолнечное масло, обогащенное ω -6 ПНЖК; VI — крысы, получавшие подсолнечное масло только до трансплантации опухоли; VII — крысы, получавшие подсолнечное масло только после трансплантации опухоли.

Идентификацию жирных кислот в рыбьем жире и подсолнечном масле проводили методом газовой хроматографии на хроматографе HRGC 5300 (Италия). Общую степень ненасыщенности жирных компонентов определяли методом [9]. Рыбий жир и подсолнечное масло вводили ежедневно в дозе, соответствующей 120 мг ω -3 или ω -6 ПНЖК на кг массы крыс, на протяжении четырех недель до трансплантации карциномы Герена и в период роста опухоли в организме.

Интенсивность роста опухоли оценивали на основе измерений ее параметров, рассчитанных по формуле: $V = \pi/6 \cdot (h \cdot l \cdot w)$, где h — высота опухоли, l — длина опухоли, w — ширина опухоли [15]. Для того, чтобы убедиться, вызваны ли изменения параметров опухоли действием ПНЖК, а не являются следствием изменения веса животных в процессе эксперимента, оценивали отношение массы опухоли (M_o) к массе тела (M_t) (коэффициент массы опухоли): $K = M_o/M_t \times 100\%$.

Декапитацию животных проводили под легким эфирным наркозом на 14-е сутки после трансплантации карциномы Герена, что соответствует логарифмической стадии роста данной опухоли.

Митохондриальную фракцию опухолевой ткани выделяли методом дифференциального центрифугирования [17]. В митохондриальной фракции определяли NO-синтазную активность и уровень NO. Ферментативную активность NO-синтазы определяли как разницу между показателями экстинкции субстратного и безсубстратного окисления NADPH и выражали в нмоль окисленного NADPH / мин на мг белка [16].

Содержание NO определяли путем регистрации содержания нитрит-аниона (NO_2^-), являющегося стабильным метаболитом оксида азота [7]. NO_2^- фиксировали по интенсивности окраски азокомплекса, образующегося в результате реакции между сульфаниловой кислотой, NO_2^- и α -нафтилетиламином. Образованный комплекс регистрировали спектрофотометрически при длине волны 548 нм.

Полученные данные обрабатывали с использованием параметрических методов анализа (критерий Стьюдента). Различия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ввиду неоднозначности результатов исследований относительно антиканцерогенного эффекта ω -3 ПНЖК и проканцерогенного эффекта ω -6

ПНЖК [3, 18], что, вероятно, обусловлено тем, что в качестве моделей использовали опухоли разного генеза, с различием длительности применения и доз ω -3 и ω -6 ПНЖК, нами были исследованы темпы роста карциномы Герена и коэффициент массы опухоли. Проведены исследования с введением дополнительных количеств ω -3 и ω -6 ПНЖК в рацион подопытных животных с трансплантированной карциномой Герена.

Анализ результатов исследований показал, что предварительное четырехнедельное и посттрансплантационное введение в организм рыбьего жира способствует торможению роста карциномы Герена в 1,7 и 1,4 раза в логарифмическую (14-е сутки) и стационарную (21-е сутки) фазы роста опухоли соответственно в сравнении с опухоленосителями, не получавшими дополнительно ω -3 ПНЖК (рис. 1а).

В то же время, применение подсолнечного масла в качестве дополнительного источника ω -6 ПНЖК до и в период роста опухоли не только не оказывает противоопухолевый эффект, а наоборот, способствует интенсификации опухолевого роста. Подтверждением этого является увеличение размеров опухоли в 1,3 и 1,2 раза в логарифмическую и стационарную фазы онкогенеза по сравнению с контролем (рис. 1б). Вероятно, в организме линолевая кислота через промежуточные γ -линоленовую и дигомо- γ -линоленовую кислоты превращается в арахидоновую кислоту, с которой связывают канцерогенные свойства ω -6 ПНЖК [19]. Такая конверсия ограничивает антипролиферативный эффект ω -6 ПНЖК.

Использование рыбьего жира только до трансплантации карциномы Герена приводит к торможению темпов роста опухоли в организме в 1,4 и 1,2 раза в логарифмическую и стационарную фазы онкогенеза, соответственно, в сравнении с показателями опытного контроля. Следует отметить, что исследуемый показатель не достигает значений группы животных, получавших рыбий жир до и после трансплантации опухоли в организм (рис. 1а). Введение подсолнечного масла только до трансплантации карциномы Герена способствует незначительному увеличению опухоли в организме (рис. 1б).

Введение исследуемых масел только в посттрансплантационный период не влияет на темпы роста новообразования в организме крыс (рис. 1).

Наряду с торможением темпов роста карциномы Герена у животных, получавших рыбий жир до и после трансплантации опухоли, наблюдается снижение коэффициента массы опухоли в 2 раза в сравнении с показателем в группе контроля (рис. 2). Установленный факт является свидетельством того, что уменьшение величины параметров карциномы Герена происходит соб-

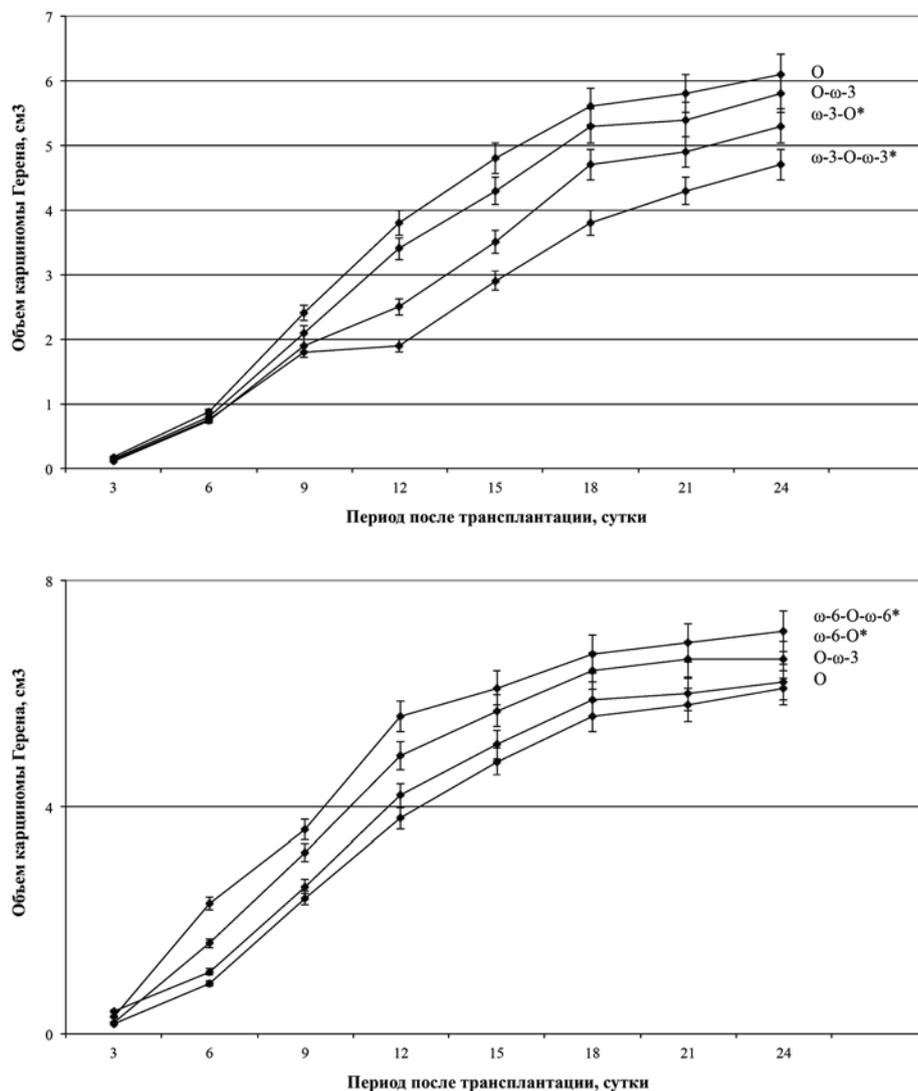


Рис. 1. Темпы роста карциномы Герена в организме крыс, получавших ω -3 (а) и ω -6 (б) полиненасыщенные жирные кислоты
 Примечание: O — крысы с трансплантированной карциномой Герена; ω -3-O- ω -3 — крысы, которым до и после трансплантации карциномы Герена дополнительно вводили рыбий жир, обогащенный ω -3 ПНЖК; ω -3-O — крысы, получавшие рыбий жир только до трансплантации опухоли; O- ω -3 — крысы, получавшие рыбий жир только после трансплантации карциномы Герена; ω -6-O- ω -6 — крысы, которым до и после трансплантации карциномы Герена дополнительно вводили подсолнечное масло, обогащенное ω -6 ПНЖК; ω -6-O — крысы, получавшие подсолнечное масло только до трансплантации опухоли; O- ω -6 — крысы, получавшие подсолнечное масло только после трансплантации опухоли; * — статистически достоверная разница в сравнении с показателем крыс-опухоленосителей ($P \leq 0,05$)

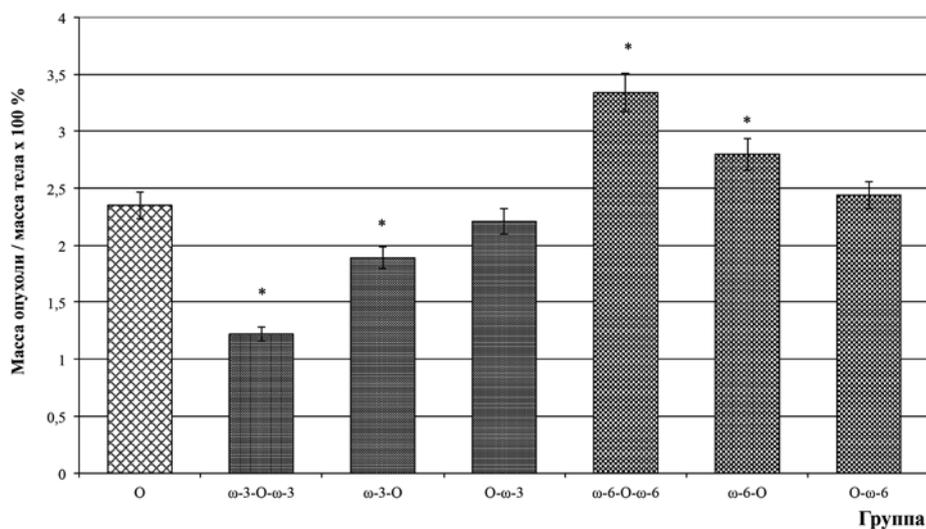


Рис. 2. Коэффициент массы карциномы Герена крыс в условиях введения разных видов полиненасыщенных жирных кислот

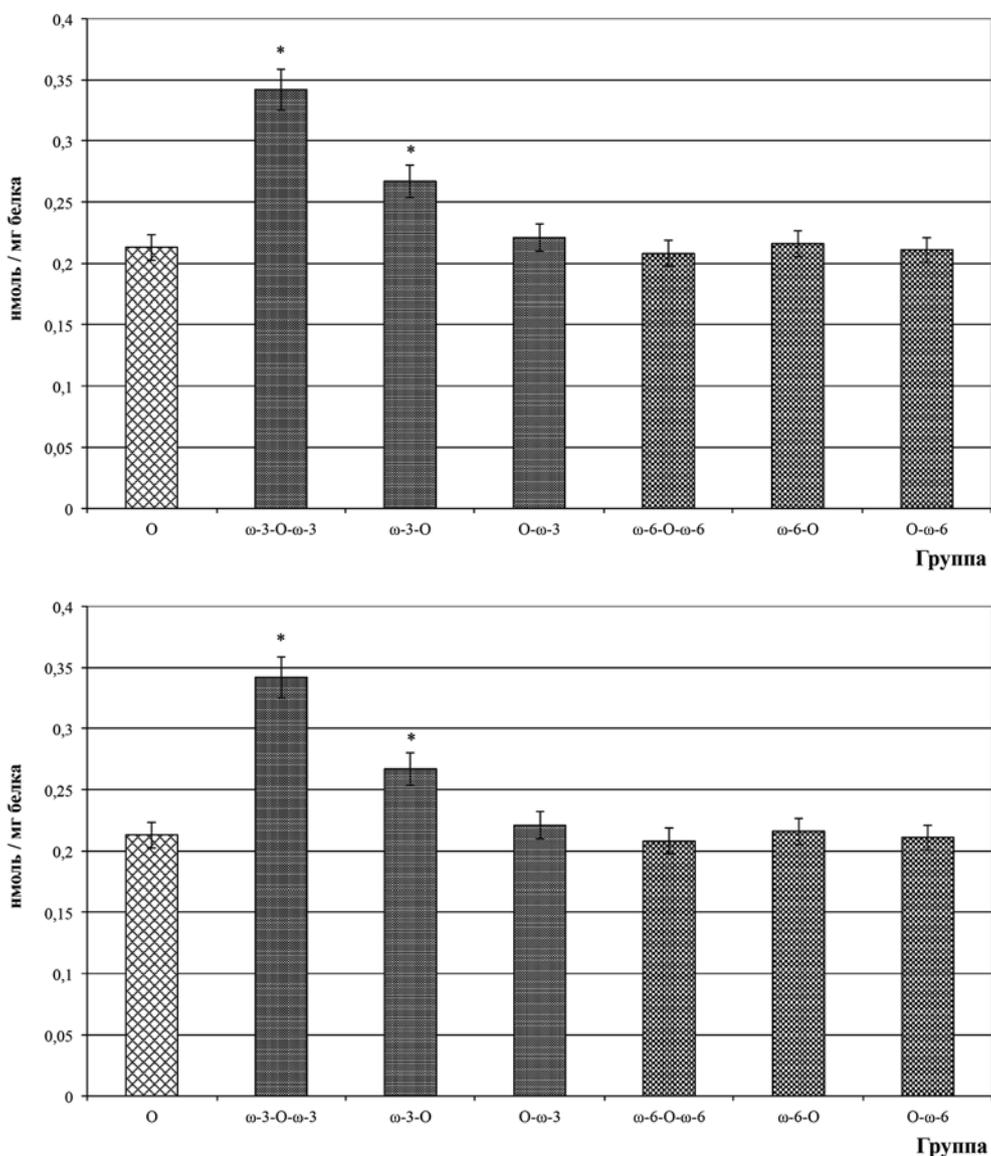


Рис. 3. NO-синтазная активность (а) и уровень NO (б) в митохондриальной фракции карциномы Герена крыс в условиях введения разных видов полиненасыщенных жирных кислот

ственно за счет торможения роста неоплазмы, а не является артефактом изменений массы животных в процессе эксперимента.

Использование подсолнечного масла оказалось стимулирующим фактором для роста опухоли, поскольку в логарифмическую фазу онкогенеза повышается коэффициент массы карциномы Герена (рис. 2). Увеличение размера опухоли при дополнительном использовании ω-6 ПНЖК, вероятно, является следствием синтеза эйкозаноидов, стимулирующих пролиферацию опухолевых клеток [5].

Таким образом, наиболее выраженный антиканцерогенный эффект ω-3 ПНЖК наблюдается в крыс, получавших исследуемый нутриент предварительно до трансплантации карциномы Герена и на протяжении всего роста опухоли в организме, что наиболее выражено в логарифмическую фазу онкогенеза. В то же время ω-6

ПНЖК, наоборот, стимулируют темпы роста карциномы Герена в организме крыс.

Одним из механизмов противоопухолевого действия ω-3 ПНЖК может быть стимуляция NO-синтазы митохондрий — органелл, запускающих апоптотическую гибель клеток.

Результаты проведенных исследований показали, что предварительное и посттрансплантационное введение ω-3 ПНЖК приводит к повышению NO-синтазной активности в митохондриальной фракции карциномы Герена по сравнению с крысами-опухоленосителями (рис. 3а). Повышение NO-синтазной активности может быть следствием активации экспрессии генов ее индуцибельной изоформы, которая продуцирует большое количество NO. В подтверждение этого установлено повышение уровня NO в митохондриальной фракции карциномы Герена исследуемой группы животных (рис. 3б).

Гиперпродукция NO может проявлять выраженный цитотоксический эффект в результате образования пероксинитрита — продукта взаимодействия оксида азота и супероксидного анион-радикала. Пероксинитрит способствует деструктивным изменениям ферментов митохондрий путем модификации тирозиновых остатков белковых молекул [13]. С другой стороны, действие NO *in vivo* может быть направлено на модуляцию потенциала и блокирование митохондриальных пор, что приводит к нарушению работы митохондриальной электрон-транспортной цепи с усиленной генерацией супероксидного радикала и последующей апоптической гибелью опухолевых клеток [6, 8].

Анализ результатов показал, что дополнительное введение ω -6 ПНЖК не сопровождается существенными изменениями NO-синтазной активности и уровня NO в митохондриальной фракции карциномы Герена у всех исследуемых групп (рис. 3).

Таким образом, при исследовании особенностей развития злокачественного новообразования в условиях обеспеченности организма разными видами ПНЖК установлено, что добавление к рациону ω -3 ПНЖК может угнетать опухолевую прогрессию. В то же время дополнительное введение ω -6 ПНЖК вызывает стимулирование роста карциномы Герена в организме и повышение коэффициента массы опухоли. Эффект зависит от длительности введения ПНЖК и степени предварительной обеспеченности организма ω -3 или ω -6 ПНЖК.

Снижение темпов роста опухоли в условиях дополнительного введения рыбьего жира, обогащенного ω -3 ПНЖК, может быть следствием инициации NO-синтазной активности митохондрий с последующей генерацией NO, что способствует окислению биомолекул исследуемых органелл и запуску апоптической гибели опухолевых клеток [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Arem H., Neuhaus M.L., Irwin M.L. et al. Omega-3 and omega-6 fatty acid intakes and endometrial cancer risk in a population-based case-control study // *Eur. J. Nutr.* — 2013. — Vol. 52. — P. 1251-1260.
2. Bannenberg G., Serhan C.N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2010. — Vol. 1801. — P. 1260-1273.
3. Brown M.D., Hart C., Gazi E. et al. Influence of omega-6 PUFA arachidonic acid and bone marrow adipocytes on meta-static spread from prostate cancer. // *Br. J. Cancer.* — 2010. — Vol. 102. — P. 403-413.
4. Calder P.C. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* — 2014. — Vol. 116. — P. 1280-1300.
5. Davidson J., Rotondo D., Rizzo M.T., Leaver H.A. Therapeutic implications of disorders of cell death signalling: membranes, micro-environment, and eicosanoid and docosanoid metabolism // *Br. J. Pharm.* — 2012. — Vol. 166. — P. 1193-1210.
6. Gu C., Yao J., Sun P. Dynamin 3 suppresses growth and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by activating inducible nitric oxide synthase production // *Oncology letters.* — 2017. — Vol. 13. — P. 4776-4784.
7. Hwang S., Lope C.A., Heck D.E. et al. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 264. — P. 711-715.
8. Kornfeld S., Goupille C., Vibet S. et al. Reducing endothelial NOS activation and interstitial fluid pressure with n-3 PUFA offset tumor chemoresistance // *Carcinogenesis.* — 2012. — Vol. 33. — № 2 — P. 260-267.
9. Kruatian T., Jitmanee K. Simple spectrophotometric method for determination of iodine value of vegetable oils / *Chiang. Mai. J. Sci.* — 2013. — Vol. 40. — P. 419-426.
10. Molinari R., D'Eliseo D., Manzi L. et al. The n3-polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid induces immunogenic cell death in human cancer cell lines via pre-apoptotic calreticulin exposure // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2011. — Vol. 60. — № 10. — P. 1503-1507.
11. Oliveira G. A., Cheng R.Y.S., Ridnour L.A. et al. Inducible nitric oxide synthase in the carcinogenesis of gastrointestinal cancers // *Antioxidants and redox signaling.* — 2017. — Vol. 26. — № 18. — C. 1059-1077.
12. Qu Q., Xuan W., Fan G.-H. Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation // *Cell Biol. Int.* — 2015. — Vol. 39. — P. 3-22.
13. Scarel-Caminaga R.M., Cera F.F., Pigossi S.C. et al. Inducible nitric oxide synthase polymorphisms and nitric oxide levels in individuals with chronic periodontitis // *Int. J. Mol. Sci.* — 2017. — Vol. 18. — P. 1128-1139.
14. Shmarakov I.A., Katan N.V. The Induction of Guerin's carcinoma cytochrome P450 hydroxylase activity by retinoids. // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* — 2011. — Vol. 5. — № 4. — P. 371-377.
15. Tomayko M.M., Reynold C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer. Chemother. Pharmacol.* — 1989. — Vol. 24. — P. 148-154.
16. Vodovotz Y., Know S., Popischil M. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide // *J. Immunol.* — 1994. — Vol. 152. — № 8. — P. 4110 — 4118.
17. Weinbach T.C. A procedure for isolating stadle mitochondria from rat liver and kidney // *Anal. Biochem.* — 1961. — Vol. 2. — P. 335-343.
18. Williams C.D., Whitley B.M., Hoyo C. et al. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer // *Nutr. Res.* — 2011. — Vol. 31. — P. 1-8.
19. Xu Y., Qian S. Y. Anti-cancer activities of ω -6 polyunsaturated fatty acids // *Biomed. J.* — 2014. — Vol. 37. — № 3. — P. 112-119.

Поступила в редакцию 02.08.2017 г.

O.V. Ketsa, M.M. Marchenko, I.A. Shmarakov

Role of mitochondrial NO-synthase in the implementation of antitumor effects of polyunsaturated fatty acids in the model of Guerin's carcinoma under in vivo conditions

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Ukraine

NO-synthase activity and NO level in the mitochondrial fraction of rats Guerin's carcinoma under conditions of different ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) supplementation has been investigated. Guerin's carcinoma was used as a cancer model. 0.5 ml of 30% carcinoma cell suspension in normal saline was implanted subcutaneously into thigh of a hind leg. The intensity of tumor growth was evaluated based on measurements of subcutaneous tumor size and coefficient of tumor mass. It was showed that ω -3 PUFAs supplementation before and after transplantation of Guerin's carcinoma resulted in the decreases of tumor growth and coefficient of tumor mass in an organism. Additional ω -6 PUFA supplementation can stimulate tumor progression and increase tumor mass in body in the logarithmic phases of carcinogenesis as compared to the tumor-bearing rats. The effect depends on duration of ω -3 and ω -6 PUFAs administration and on the level of preliminary provision of an organism with these PUFAs. We found increased NO-synthase activity and NO content in mitochondrial fraction of Guerin's carcinoma in animals of the group that was administered ω -3 PUFAs both before and post-implantation of the carcinoma during logarithmic phase of carcinogenesis. At the same time, the ω -6 PUFA administration does not contribute to significant changes in the NO-synthase system components in the mitochondrial fraction of Guerin's carcinoma in comparison with the tumor-bearing rats.

Key words: NO-synthase, mitochondrial fraction, Guerin's carcinoma, coefficient of tumor mass, ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids, rats