

Член-корреспондент НАН РА А. А. Шагинян, Л. Э. Нерсисян, Д. В. Гарибян,
Б. Т. Гарибджанян

Изменения в структуре опухолевой ДНК *in vivo* под влиянием доксорубицина и бактериальной культуры *Escherichia coli*

(Представлено 21/X 2002)

Белок, выделенный из погибших клеток *Escherichia coli* (*E. coli*) здоровых людей, способен вызвать некроз раковых клеток [1]. Обнаружено также, что некоторые бактерии кишечной флоры, выделенные из кишечника здоровых людей, обладают канцеролитическими свойствами; в тех же условиях кишечные палочки, выделенные у онкологических больных *in vitro*, не вызывают некроза раковых клеток, т.е. не обладают этими свойствами [2-5].

В настоящей работе рассматривается возможность повышения эффективности лечения злокачественных опухолей комплексным применением химиопрепаратов с природными соединениями, что может позволить снять побочное токсическое действие химиопрепарата и усилить противоопухолевое действие известных препаратов, применяемых в онкологической практике. Особенно интересны в этом плане противоопухолевые антибиотики, поскольку в механизмах цитотоксического их действия, независимо от того, действуют они непосредственно на этапы синтеза или опосредованно через клеточные системы, угнетение биосинтеза ДНК занимает одно из ведущих мест. При этом очевидна необходимость изучения первичной структуры ДНК и связи между уровнем метилирования ДНК и подавлением роста опухоли. Ставя перед собой такую задачу, мы исходили из того, что энзиматическое метилирование по цитозиновым остаткам является заключительным и важным этапом синтеза ДНК и единственным типом модификации первичной структуры ДНК эукариотической клетки, специфическим механизмом экспрессии генов и клеточной дифференцировки [6-8].

В настоящей работе была исследована первичная структура ДНК опухоли саркома 45 (С-45) до и после воздействия на нее доксорубицина и бактериальной культуры *E. coli* [2] *in vivo* отдельно и при совместном применении.

Эксперименты *in vivo* проводились на крысах линии Вистар массой 100-120 г. На 5-е сутки после перевивки опухоли С-45 известным методом [9-10] животных разделили на 4 группы по 10 крыс в каждой. Животным первой группы вводили внутрибрюшинно доксорубин в дозе 2 мг/кг в течение восьми дней. Вторая группа получала бактериальную культуру перорально в дозе 20 мл/кг. Животных третьей группы лечили доксорубицином в сочетании с бактериальной культурой. Каждый препарат вводили четыре раза, чередуя через день. В этом случае крысы получали половину суммарной дозы обоих препаратов. Четвертая группа служила контролем. На 14-ый день опыта всех животных забили и определили вес животного и опухоли. Из извлеченных после забоя органов и тканей выделяли ДНК. В работе использовали метод экстракции ДНК, разработанный Б.Ф.Ванюшиным, в присутствии 1,5 % SDS, ДНК гидролизovali до оснований [11]. Основания разделяли с помощью тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в растворителе н-бутанол:вода:аммиак (60:10:0,1). Спектрофотометрию элюатов всех оснований (гуанин (Г), цитозин (Ц), 5-метилцитозин (5-МЦ), тимин (Т), аденин (А)) производили против элюатов из соответствующих участков хроматограмм.

В таблице приведены данные по содержанию Г, Ц, А, Т, 5-МЦ в ДНК здоровой печени, печени опухоленосящих животных, опухоли С-45 до и после введения доксорубицина и перорального получения животными бактериальной культуры *E.coli* отдельно и при сочетанном применении с

антибиотиком. Содержание основных пар оснований в изученных ДНК практически одинаково. Выделенные ДНК принадлежат к АТ-типу, количество Г+Ц+МЦ в них составляет 42.6–43.8 мол%. Нуклеотидный состав ДНК соответствует правилам Чаргаффа. Четко выделяется разница в уровне метилирования между изученными образцами ДНК. Как видно из таблицы, уровень метилирования в клетках печени опухоленосящих животных без лечения и особенно после лечения доксорубицином повышен. Бактериальная культура, примененная отдельно, подавляет степень метилирования ДНК клеток печени опухоленосящих животных, приближая ее к норме. При сочетанном применении доксорубицина и бактериальной культуры в тех же условиях намечается тенденция к уменьшению 5-МЦ. Данные о разном содержании 5-МЦ в нормальных клетках (печень) и в клетках печени опухоленосящих животных, опухоли без лечения и при раздельном и

Нуклеотидный состав ДНК органов и тканей опухоленосящих животных

Источник ДНК	Содержание оснований в ДНК, мол %					
	Г	Ц	МЦ ± ζ	А	Т	Г + Ц + МЦ
Печень (норма)	21.7	20.7	1.04±0.01	28.4	28.4	43.4
Опухоленосящие животные						
Печень	21.6	20.1	1.59±0.01	28.3	28.3	43.2
Печень+ бактериальная культура	21.5	20.6	0.98±0.01	28.5	28.5	43.2
Печень+ доксорубицин	21.9	20.0	1.99±0.01	28.1	28.1	43.8
Печень+ бактериальная культура + доксорубицин	21.9	20.2	1.76±0.01	28.1	28.1	43.8
Опухоль (С-45)	21.9	20.1	1.86±0.02	28.1	28.1	43.8
С-45+ бактериальная культура	21.6	20.1	1.55±0.01	28.4	28.4	43.2
С-45+ доксорубицин	21.3	20.8	0.59±0.01	28.7	28.7	42.6
С-45+ бактериальная культура+ доксорубипин	21.3	20.4	0.95±0.01	28.7	28.7	42.8

Примечание. В каждой группе - 10 животных. Число определений — 12. Проведенные изменения статистически достоверны (p<0.005) по сравнению с контролем (печень, опухоль).

совместном лечении доксорубицином и бактериальной культурой согласуются, во-первых, с данными других авторов о разной метилакцепторной способности при метилировании ДНК из разных клеток (опухоль, печень) [12-13], во-вторых, в случае повреждающего действия доксорубицина в печени, по всей вероятности, начинается репаративный синтез ДНК, который сопровождается метилированием. Возможно, индуцируемое препаратом гиперметилирование может явиться прямым ответом клеток печени на препарат. В тех же условиях в опухоли резко понижено содержание 5-МЦ в ДНК при лечении только доксорубицином, а при совместном лечении доксорубицином и бактериальной культурой хотя и наблюдается ингибирование уровня метилирования ДНК опухоли, но он меньше, чем при лечении только антибиотиком, и приближается к норме. Небольшое уменьшение содержания 5-МЦ наблюдается в опухоли и при раздельном пероральном применении бактериальной культуры. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что доксорубицин, интеркалируя между основаниями двойной спирали ДНК, блокирует ДНК-матрицу, препятствуя нормальному функционированию ферментов, в

частности ДНК-метилаз, что может привести к изменению первичной структуры ДНК опухоли путем эксцизии 5-МПЦ, связанной с активацией деметилаз. Деметилирование, которое достигается ферментативным механизмом, может индуцировать дифференцировку клеток [14-15].

Корреляция задержки роста опухоли с уровнем метилирования ДНК очевидна. Установлено, что в первой группе, где применяли только доксорубицин, торможение роста опухоли составляет 52.8%. Вместе с тем препарат оказывает значительное общетоксическое действие на организм животного ($K_p = -9.3\%$). Бактериальная культура не вызывает торможения роста опухоли и не оказывает токсического действия на организм животного ($K_p = +7.7\%$). При сочетанном применении препаратов торможение роста опухоли достигает того же уровня, что и в первой группе, где использовался только доксорубицин ($T = 53\%$), и при этом не отмечено общетоксического действия препаратов ($K_p = +1.3\%$).

Таким образом, можно предположить, что сочетанное применение доксорубицина и бактериальной культуры *E.coli* позволяет снять токсическое влияние антибиотика на организм животного, используя половину суммарной дозы доксорубицина, без снижения его противоопухолевого действия. Исследуемые штаммы бактерий *E.coli* здоровых лиц способны подвергать некрозу опухолевые клетки и индекс некроза довольно высок - 86% [16]. При использовании доксорубицина с бактериальной культурой наблюдается также эффект потенцирования противоопухолевого действия антибиотика без увеличения его токсичности в результате деметилирования и активации репарационных процессов в клетке, что приближает уровень метилирования ДНК к норме.

Следовательно, сочетанное применение доксорубицина и бактериальной культуры *E.coli* можно считать целесообразным при лечении злокачественных новообразований.

Авторы выражают благодарность О. Г. Карапетяну за предоставление бактериальной культуры.

Работа выполнена при поддержке гранта Международного научно-технического центра (ISTC) «Human Intestinal Microflora and Microbiological Aspect of Its Regulation during Diseases of Digestive Tract» (NA-732).

Институт тонкой органической химии НАН РА

Институт прикладных проблем физики НАН РА

Литература

1. Canadian Scientists Use Deadly *E. coli* bacteria to kill cancer cells. 1995-1999.
2. Гарибян Д. В., Худавердян Н. В., Даниелян И. С., Агаронян А. С., Карапетян О. Г.- Биол. журн. Армении. 2001. Т. 53. N1-2. С. 121-124.
3. Панчишина М. В. В сб.: Вопр. онкологии. Львов. 1967. С. 189-196.
4. Олейник С. Ф., Панчишина М. В.- Врачебное дело. 1968. N5. С. 13-17.
5. Панчишина М. В.- Врачебное дело. 1972. N5. С. 65-68.
6. Counts J. L., Mc Clain R. M., Yoodman J. I.- Carcinog. 1997. Feb. V. 18. N2. P. 97-106.
7. Kay P. H., Spagnolo D. V., Taylor J., Ziman M.- Leuk-Lymphoma. 1997. Jan. V. 24. N 3-4. P. 211-220.
8. Strathdee G., Brown R.- Exp. Rev. Mol. 4 March. 2002.
9. Чернов В. А. В кн.: Методы экспериментальной химиотерапии. М. Медицина. 1971. С. 357-403.
10. Экспериментальная оценка активности противоопухолевых препаратов в СССР и США. М. Медицина. 1980.
11. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А., Галоян А. А., Ванюшин Б. Ф.- ДАН СССР. 1972. Т.205. N3. С. 721-723.
12. Кляшева Р. И. - Вопр. онкологии. 1990. N 10. С. 1186-1189.
13. Laizd R. W., Haenisch R.- Hum. Mol. Genet. 1994. N 3. P. 1487-1495.
14. Мазин А. С.- Мол. биология. 1993. Т. 27. N5. С. 965-979.
15. Ivanetich K. M., Sanfi D. V.- Progr. Nucleic Acid Mol. Biol. 1992. V. 42. P. 127-156.
16. Шахламов В. А., Карапетян А. О., Карапетян О. Г.- Материалы по актуальным вопр. совр. гистологии. М. Медицина. 1988.

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Ա. Ա. Շահինյան, Լ. Է. Ներսեյան, Ջ. Վ. Ղարիբյան,
Բ. Տ. Ղարիբջանյան

**Ուռուցքային ԴՆԹ-ի կառուցվածքային փոփոխությունները դոքսոռուբիցինի և
Escherichia coli բակտերիալ կուլտուրայի ազդեցությամբ in vivo պայմաններում**

Ուսումնասիրվել է առողջ մարդկանց աղիքային ֆլորայի որոշ բակտերիաների հակաուռուցքային ակտիվությունը: Ցույց է տրվել, որ ուռուցքով հիվանդներից անջատված աղիքային ցուպիկները չեն առաջացնում ուռուցքային բջիջների նեկրոզ (in vivo): Քիմիական պատրաստուկների հետ համատեղ բնական նյութերի կիրառումը թույլ է տալիս նվազեցնել պատրաստուկի թունավոր ազդեցությունը և միաժամանակ ուժեղացնել նրա հակաուռուցքային ակտիվությունը: Մեր կողմից ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ, կիրառելով դոքսոռուբիցինի գումարային դոզայի կեսը և բակտերիալ կուլտուրան, հնարավոր է վերացնել հակաբիոտիկի թունավոր ազդեցությունը, չիջեցնելով նրա հակաուռուցքային ակտիվությունը, որը կուտակվում է բակտերիալ կուլտուրայի ազդեցությամբ, շնորհիվ բջջում ռեպարացիոն պրոցեսների ակտիվացման և դեմեթիլացման, որի հետևանքով ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակը մոտենում է նորմային: