

УДК 577.115.38+616-006.6+576.851.48

Антиканцерогенная и антиоксидантная активность непатогенного штамма кишечной палочки при асцитной карциноме Эрлиха

**О.Х. Авагян¹, О.А. Мовсесян¹, Н.Х. Алчуджян¹,
Н.О. Мовсесян¹, Л.Г. Мелконян¹, Л.Г. Аванесян²,
Г.А. Геворкян¹**

*¹Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

*²Армянский государственный педагогический университет им. Х. Абовяна
0014, Ереван, пр. Тигран Меци, 17*

Ключевые слова: E. coli, асцитная карцинома Эрлиха, лейкоциты, митохондрии, мозг, перекисное окисление липидов, цитоплазма

Бактерии давно и успешно используются для предотвращения опухолевого роста в организме посредством активирования механизмов врожденной и приобретенной резистентности [14]. Обработка мышей липополисахаридом (ЛПС) или грамотрицательными бактериями, такими как *E. coli*, которые содержат ЛПС в качестве структурного компонента клеточной стенки, вызывает выброс фактора некроза опухоли активированными макрофагами с последующим селективным лизисом опухолевых клеток [16]. При асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ) химиотерапия (комбинированный препарат доксорубина, циклофосфида и фторурацила) в сочетании с фаго- и термолизатами *E. coli* приводит к 80-90% регрессии опухоли, а у 13% животных – полному ее исчезновению, без побочных эффектов бактериальной обработки [18]. Возможность практического использования *E. coli* в терапии злокачественных опухолей требует изучения ее влияния на процессы, вовлеченные в патогенетические механизмы канцерогенеза.

Опухолевая агрессия и особенно химиолучевая терапия вызывают резкое усиление процессов свободнорадикального окисления (СРО) и подавление антиоксидантной системы (АОС) организма, сопровождающиеся развитием иммунодефицитного состояния [6]. Повышенная продукция иммунными клетками активных форм кислорода (АФК) наблюдается у онкобольных, а также в экспериментальных опухолях мышей [31, 33]. В представленной работе впервые на фоне противоопухолевого воздействия

непатогенного штамма *E. coli* изучено ее влияние на процессы оксидативного стресса в брюшной полости, крови и головном мозге мышей с АКЭ.

Материал и методы

Опыты осуществляли с соблюдением правил содержания и обращения с животными, изложенных в Директивах Европейского Сообщества (86/609/EC) и одобренных Комитетом по биомедицинской этике при Институте биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА. Эксперименты проводили на двухмесячных беспородных белых мышах-самцах массой 20-21 г, которые содержались в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа воды и пищи. Животные были разделены на группы: контрольная – здоровые мыши и экспериментальные животные, соответствующие по возрасту и полу контрольным: I – мыши с трансплантированной АКЭ и II – мыши с АКЭ, подвергнутые обработке непатогенным штаммом *E. coli*, выделенном из здорового человека (Медицинский центр «Арменикум»).

Формирование асцитной карциномы Эрлиха у мышей осуществляли перевиванием клеток АКЭ введением в брюшную полость мышей асцитной жидкости в объеме 0,2 мл ($1,5 \times 10^7$ кл/мл), отбираемой у мышей-опухоленосителей, у которых культура клеток АКЭ поддерживалась в асците брюшной полости (Научно-технологический центр органической фармацевтической химии НАН РА).

Через 2 дня после перевивки клеток АКЭ, животных разделяли на две опытные группы и в одной из них осуществляли асептическую однократную обработку поверхности глаза и полости рта ватным шпателем, пропитанным взвесью живых клеток *E. coli* (1×10^9 КОЕ/мл) (использовали смыв с суточных культур кишечной палочки и необходимые концентрации микробных взвесей получали с помощью эталонного бактериального стандарта мутности); параллельная опытная группа мышей с АКЭ служила “контролем” для оценки влияния бактерий. Через 11 дней после трансплантации АКЭ всех опытных животных декапитировали.

Противоопухолевый эффект. Влияние бактериальной обработки оценивали по изменению объема асцитной жидкости и массы тела, а также среднему времени выживаемости (СВВ) и проценту продления СВВ (ПСВВ), которые контролировали в каждой опытной группе путем ежедневной регистрации смертности, и рассчитывали согласно уравнениям:

$$СВВ = (\text{день первого случая смерти} + \text{день последнего случая смерти})/2;$$

$$ПСВВ = [(СВВ \text{ группы АКЭ}/E. coli / СВВ \text{ группы АКЭ}) - 1] \times 100 \text{ [1]}.$$

Забор биологического материала. Мышей декапитировали, извлекали головной мозг, осуществляли забор крови и асцитной жидкости из брюшной полости мышей-опухоленосителей по методической разработке Красноярского гос. ун-та [9]. Контрольных мышей после декапитации фиксировали на пенопластовом столике и в брюшную полость порциями вводили шприцем по 3-5 мл 20 мМ HEPES буфера (pH 7,4) и с помощью шприца собирали суспензию клеток, которую центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM (жидкая среда (1x) с Na_2CO_3 , без глутамина), культивировали в термостате при 37°C в течение 24 ч, и иммунные клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин, дважды промывали 20 мМ HEPES буфером (pH 7,4). Из брюшной полости мышей-опухоленосителей вытягивали шприцем асцитную жидкость, из которой клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин и промывали 20 мМ HEPES буфером (pH 7,4). Клетки, полученные из брюшной полости контрольных и опытных животных, ресуспендировали в 20 мМ HEPES буфере (pH 7,4) и выделяли субпопуляции перитонеальных лейкоцитов.

Выделение лейкоцитов и плазмы крови. Кровь стабилизировали антикоагулянтом, 5% цитратом натрия (в соотношении 5:1 по объему) и для седиментации эритроцитов смешивали с 6% декстраном (мол. вес=70000), приготовленном на 0,9 % NaCl, в соотношении 1:2 (по объему), инкубировали 1 ч при 37°C (при наклоне под углом 45 градусов), после чего верхний слой, содержащий взвесь лейкоцитов и тромбоцитов в плазме, декантировали и выделяли лейкоциты и плазму. Плазму получали в супернатанте центрифугированием декантированного слоя при 6000 об/мин 10 мин при 4°C.

Субпопуляции лейкоцитов брюшной полости и крови получали центрифугированием ресуспендированных в 20 мМ HEPES буфере (pH 7,4) клеток в двуступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина (1,129 и 1,087 г/см³) при 3000 об/мин 20 мин [4]. Мононуклеары (лимфоциты и моноциты/макрофаги) и гранулоциты (полиморфоядерные лейкоциты) получали из верхнего и нижнего интерфазных колец, соответственно, и дважды промывали.

Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракций лейкоцитов брюшной полости и крови осуществляли методом дифференциального центрифугирования [4]. Фракции мононуклеаров и гранулоцитов объединяли, разводили в 20 мМ HEPES буфере, содержащем 0,25 М сахарозу (pH 7,4), гомогенизировали (1500 об/мин) в течение 3-5 мин и из гомогенатов осаждали ядра центрифугированием при 1200 об/мин 10 мин при 4°C. Далее надосадочную жидкость центрифугировали при 11000 об/мин 20 мин при 4°C, в осадке получали митохондриальную фракцию и в супернатанте – цитоплазматическую.

Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракций тканей головного мозга. Головной мозг рассекали ножницами и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (1500 об/мин) в течение 3 мин в 10-кратном объеме 20 мМ HEPES буфера, содержащем 0,25 М сахарозу (рН 7,4). Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядерной фракции, и из супернатанта последующим центрифугированием при 15000 об/мин 20 мин при 4°C, в осадке получали митохондриальную фракцию и в супернатанте – цитоплазматическую [17].

Определение показателей оксидативного стресса. Пробы депротеинизировали 10% ТХУ и в супернатантах, полученных после центрифугирования при 15000 об/мин 5 мин, определяли ТБК-активные продукты, по методу Владимирова и Арчакова [3]. К супернатантам добавляли 0,72% ТБК и 0,6N HCl (в пропорции 1:0,8:0,2), смесь инкубировали 15 мин в кипящей водяной бане и после охлаждения содержание основного конечного продукта ПОЛ, малонового диальдегида (МДА) в пробах определяли спектрофотометрически при длине волны 535 нм. Одновременно, *in vitro*, в модельной системе неферментативного аскорбатзависимого ПОЛ изучали интенсивность свободнорадикального окисления, индуцируемого двухвалентным железом [5]. Пробы инкубировали в течение 1ч при 37°C в 20 мМ HEPES буфере (рН 7,4), 0,8 мМ аскорбиновой кислоте и 1,2 мкМ соли Мора ($\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (в соотношении 1:1 по объему), депротеинизировали 10% ТХУ и в супернатантах, полученных после центрифугирования при 15000 об/мин 5 мин, определяли прирост МДА.

Содержание белка определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [23].

Статистика. Достоверность различий оценивали с использованием параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и последующим постдисперсионным анализом Холм-Сидака с помощью пакета программ SigmaStat 3.5 for Windows. В качестве критерия достоверности принимали $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

АКЭ – модель злокачественного новообразования, сходного с опухолями человека, чувствительными к химиотерапии, которые также недифференцированы и быстро растут [29]. Накопление свободных радикалов и продуктов их реакций при канцерогенезе приводит к неконтролируемому повреждению иммунных клеток и формированию стойкого иммунодефицитного состояния. В процессе роста асцитных опухолей в циркулирующей крови увеличивается число и удельная активность лейкоцитов, которые накапливаясь в зоне опухолевого роста продуцируют АФК для оказания цитотоксического воздействия на опу-

холевые клетки, но при этом происходит самоповреждение лейкоцитов, усиленное подавленной в них АОС, а также деструкция клеток организма, что может явиться причиной гибели организма-опухоленосителя [8].

Для оценки оксидативного повреждения тканей при АКЭ изучали уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических системах. Первичные продукты ПОЛ, гидропероксиды, изменяют текучесть клеточных мембран, нарушают нормальное функционирование мембранных белков, влияя на клеточную проницаемость; к вторичным продуктам ПОЛ относят альдегиды (малоновый диальдегид (МДА) составляет их основную долю), которые имеют достаточно продолжительное время жизни, чтобы диффундировать внутри клетки и в близлежащие клетки, вступая в реакции с различными биомолекулами [13]. МДА образует шифровые основания с аминокгруппами белков, формируя нерастворимые липид-белковые комплексы [20].

Таблица 1

Влияние *E. coli* на перекисное окисление липидов в брюшной полости мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ)

Перитонеальные лейкоциты	а) пмоль МДА /мг белка		
	контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	21.1 ± 4.5	165.3 ± 26.4***	85.2 ± 25.7**
Цитоплазма	15.4 ± 3.8	632.6 ± 65.8***	196.5 ± 27.3***
Митохондрии	18.9 ± 4.3	212.7 ± 34.2***	118.6 ± 23.7**
Клетки АКЭ		82.0 ± 11.2	97.0 ± 12.9#
Перитонеальные лейкоциты	б) пмоль МДА /мг белка/ч		
	контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	4.7 ± 1.8	191.1 ± 29.7***	40.7 ± 9.0***
Цитоплазма	16.7 ± 3.4	431.6 ± 44.3***	181.4 ± 27.5**
Митохондрии	13.5 ± 2.3	209.1 ± 30.6***	168.3 ± 25.2*
Клетки АКЭ		14.8 ± 3.5	22.4 ± 4.1*

Примечание. Здесь и в последующих таблицах результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$, достоверность (p) различий результатов, оцениваемых при АКЭ, определялась по сравнению с контрольными значениями, а результатов, полученных при *E. coli*-обработке, – по сравнению с таковыми для неинфицированных мышей-опухоленосителей. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) перитонеальные лейкоциты: гомогенат – $F=13.8$, $p<0.001$, цитоплазма – $F=59.3$, $p<0.001$, митохондрии – $F=16.1$, $p<0.001$; клетки АКЭ: $t=-0.74$, $p=0.46$; б) перитонеальные лейкоциты: гомогенат – $F=29.2$, $p<0.001$, цитоплазма – $F=48.0$, $p<0.001$, митохондрии – $F=20.3$, $p<0.001$; клетки АКЭ: $t=-2.95$, $p=0.006$

Как видно из табл. 1, при АКЭ содержание МДА повышается в главных клеточных компартментах перитонеальных лейкоцитов в 7.8, 41.1 и 11.3 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно также, как и образование *in vitro* МДА в модельной системе неферментативного ПОЛ, уровень которого возрастает в 40.7, 25.8 и 15.5 раза, а в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно по сравнению с контролем. В развитие оксидативного стресса при АКЭ вносят свой вклад стимулирование СРО и подавление функционирования АОС, обусловленное конформационными перестройками антиоксидантных ферментов, вызванных АФК или продуктами липопероксидации, которые уменьшают сродство ферментов к субстрату и кофактору. Продукция АФК опухолевыми клетками и выброс их во внеклеточное пространство также способствуют активированию ПОЛ во всех клетках, взвешенных в асцитной жидкости. При этом в стационарной фазе развития АКЭ в самих опухолевых клетках повышается активность ферментов утилизации АФК и липидных пероксидов, что связано с необходимостью убрать радикал кислорода, как один из пролиферативных стимулов [10].

Высокая активность АОС в клетках АКЭ подтверждается детектируемым в них относительно низким уровнем МДА и его аскорбатзависимого образования *in vitro*, которые в 2 и 12.9 раза ниже соответственно, по сравнению с гомогенатами перитонеальных лейкоцитов. Высокая активность антиоксидантных ферментов в опухолевых клетках является одной из причин их устойчивости к оксидативному стрессу и может служить фактором развития резистентности опухолей к терапевтическим воздействиям, в основе которых лежит свободнорадикальный механизм [27].

E. coli-обработка подавляет СРО в перитонеальных лейкоцитах, на что указывает снижение содержания МДА в 1.9, 3.2 и 1.8 раза и его синтеза *in vitro* в 4.7, 2.4 и 1.2 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно, по сравнению с мышами-опухоленосителями. Обработка кишечной палочкой, активируя АОС и подавляя СРО, препятствует иммуносупрессии и ПОЛ-индуцированным разрушительным процессам, характерным для канцерогенеза. Благодаря положительному влиянию бактериальной обработки, функциональная активность лейкоцитов повышается. Это проявляется и в возрастании процессов ПОЛ в клетках АКЭ, в которых вдвое увеличивается образование МДА *in vitro*. Отметим, что процессы ПОЛ вызывают образование липидных рафтов (микродоменов) как в бислойных липидных мембранах, так и в нативных клеточных мембранах [15]. Кластеризация опухолевых клеток липидными рафтами снижает их резистентность к лигандиндуцированному апоптозу и является возможной альтернативой для эффективной стратегии элиминации опухолевых клеток [30].

Одним из механизмов подавления АКЭ-индуцированных процессов СРО при бактериальной обработке может быть антиоксидантная активность полиаминов самой *E. coli*. Эксперименты *in vitro* выявили способность полиаминов перехватывать АФК, что подтверждается данными о повышенном содержании супероксид аниона в клетках *E. coli*, дефектных по синтезу полиаминов [11]. Дефектные штаммы отличаются от диких пониженным уровнем активности *soxS* регулона, обеспечивающего индукцию кислородпротекторных механизмов, и антиоксидантная активность полиаминов складывается из перехвата радикалов и активирования транскрипции протекторных белков, за счет взаимодействия полиаминов с ДНК [12]. Авторы показали, что первый механизм работает при слабых уровнях свободнорадикальной атаки, а второй – включается при собственном окислительном стрессе, что, по-видимому, имеет место при АКЭ. Отметим, что у мышей и пациентов с раком ингибирование продукции АФК иммунными клетками аннулирует их супрессорное действие [25].

Следует отметить, что при АКЭ наблюдается сверхэкспрессия индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и гиперпродукция NO иммунными клетками [26]. Нами также сообщалось о повышении более чем вдвое тотальной активности NOS в цитоплазме и митохондриях перитонеальных лейкоцитов мышей с АКЭ [1]. iNOS/NO вызывает элиминацию кишечной палочки и нарушает микробиоту [19]. *E. coli* вырабатывает ряд необходимых для человека витаминов: B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, K, оказывает влияние на обмен холестерина, билирубина, холина, желчных и жирных кислот, всасывание железа и кальция в ЖКТ млекопитающих и является основным конкурентом по заселению кишечника условнопатогенной микрофлорой, кроме того, она поддерживает жизнедеятельность индигенной микрофлоры, забирая из просвета кишечника кислород, который вреден для строго анаэробных полезных бифидо- и лактобактерий [22]. Ранняя колонизация кишечника непатогенными штаммами *E. coli* стимулирует иммунную систему слизистой оболочки – выработку специфических антител и неспецифических секреторных иммуноглобулинов [32]. АКЭ-индуцированное активирование нитрергического ответа будет угнетать рост *E. coli* в ЖКТ, и введение бактерии позволит противостоять такому воздействию, способствуя восстановлению микробиома, сохранению целостности слизистой кишечника и активируя механизмы иммунной защиты, которые нарушаются при канцерогенезе.

Антиоксидантное действие *E. coli* проявляется и в крови, в которой процессы ПОЛ подавляются после бактериальной обработки (табл. 2). При АКЭ в лейкоцитах крови возрастают показатели уровня МДА в 5.8, 7.2 и 5.1 раза и образования *in vitro* МДА в 13.2, 17 и 40 раз в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно, по сравнению с контролем. В плазме крови содержание МДА и его образование *in vitro* также по-

вышаются в 4.6 и 2.9 раза соответственно, по сравнению со здоровыми животными. Примечательно, что в лейкоцитах крови активирование процессов ПОЛ менее выражено, по сравнению с перитонеальными лейкоцитами, которые локализованы в асцитной жидкости и непосредственно контактируют с клетками АКЭ.

E. coli снижает уровень МДА в субклеточных фракциях лейкоцитов крови и плазме. Еще большее подавление ПОЛ проявляется в отношении образования *in vitro* МДА, которое снижается в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови в 2.2, 2.3 и 11 раз соответственно и в плазме в 6.6 раза, по сравнению с больными животными. В митохондриях лейкоцитов *E. coli*-обработка нормализует процессы ПОЛ. Одновременно в плазме содержание МДА снижается примерно в 1.5 раза, а образование *in vitro* МДА падает вдвое ниже контрольных значений.

Таблица 2

Влияние *E. coli* на перекисное окисление липидов в крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ)

Лейкоциты крови	а) пмоль МДА /мг белка		
	контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	56.0 ± 11.5	323.6 ± 36.4***	247.7 ± 32.7*
Цитоплазма	46.5 ± 9.8	333.4 ± 35.8***	187.7 ± 25.8*
Митохондрии	52.9 ± 10.3	271.3 ± 26.2***	96.6 ± 13.7***
Плазма	85.3 ± 14.2	391.8 ± 42.9***	266.2 ± 29.6**
Лейкоциты крови	б) пмоль МДА /мг белка/ч		
	контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	33.6 ± 9.9	443.8 ± 48.2***	200.4 ± 24.7***
Цитоплазма	14.9 ± 3.4	252.5 ± 38.9***	111.6 ± 17.6**
Митохондрии	3.7 ± 1.2	147.7 ± 24.8***	13.3 ± 3.6***
Плазма	5.6 ± 1.4	16.4 ± 4.5**	2.5 ± 1.5***

Примечание. Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) лейкоциты крови: гомогенат – F=26.9, $p<0.001$, цитоплазма – F=30.2, $p<0.001$, митохондрии – F=40.9, $p<0.001$; плазма: F=24.4, $p<0.001$; б) лейкоциты крови: гомогенат – F=42.1, $p<0.001$, цитоплазма – F=23.4, $p<0.001$, митохондрии – F=30.9, $p<0.001$; плазма: F=6.53, $p=0.003$.

Таблица 3

Влияние *E. coli* на перекисное окисление липидов в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ)

Головной мозг	а) пмоль МДА/мг белка		
	контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	50.8 ± 7.5	113.1 ± 16.4**	108.4 ± 15.7#
Цитоплазма	110.8 ± 11.8	289.9 ± 32.8***	148.8 ± 17.3***
Митохондрии	49.9 ± 8.3	183.3 ± 24.2***	124.3 ± 12.9*
Головной мозг	б) пмоль МДА/мг белка/ч		
	контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	41.5 ± 15.4	225.1 ± 26.9***	174.0 ± 23.4#
Цитоплазма	34.5 ± 10.6	314.0 ± 34.7***	229.9 ± 22.6*
Митохондрии	59.7 ± 13.2	287.4 ± 31.3***	218.2 ± 24.9*

Примечание. Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) ткани головного мозга: гомогенат – $F=6.3$, $p=0.004$, цитоплазма – $F=17.6$, $p<0.001$, митохондрии – $F=16.3$, $p<0.001$; б) ткани головного мозга: гомогенат – $F=17.9$, $p<0.001$, цитоплазма – $F=33.8$, $p<0.001$; митохондрии – $F=23.0$, $p<0.001$

Нарушение взаимодействия между кишечником, ее микрофлорой и нервной системой характерно для патофизиологии заболеваний ЖКТ [28]. Ранее нами было показано, что у мышей с АКЭ в мозговой ткани наблюдается очаговая пролиферация нейроцитов и мелкие очаги межклеточного отека [2]. При этом в тканях головного мозга возрастает содержание МДА в 2.2, 2.6 и 3.7 раза и образование *in vitro* МДА в 5.4, 9.1 и 4.8 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно, по сравнению с контрольными значениями.

E. coli-обработка снижает уровень МДА в 1.95 и 1.45 раза и его образование *in vitro* 1.37 и 1.32 раза в цитоплазме и митохондриях клеток мозга соответственно, по сравнению с неинфицированными мышами-опухоленосителями. При АКЭ возрастание окислительных реакций в головном мозге менее выражено по сравнению с лейкоцитами крови и брюшной полости, и бактериальная обработка оказывает меньшее антиоксидантное действие, не проявляясь в гомогенатах, что, возможно, обусловлено высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот в мембранах нервных клеток, которые вовлекаются в процессы ПОЛ и маскируют ингибирующий эффект *E. coli*.

В условиях окислительного стресса накопление продуктов ПОЛ в мембранах нервных клеток приводит к нарушению ионного гомеостаза с последующим развитием эксайтотоксичности и их гибели [13]. В то же время АФК участвуют в редокс-регуляции ионного гомеостаза нейронов, вовлекая в эти процессы продукты ПОЛ, которые, повышая активность потенциалзависимых кальциевых каналов плазматической мембраны, индуцируют длительную потенциацию, лежащую в основе когнитивных

функций мозга, и влияют на высвобождение медиаторов и экспрессию генов [7, 24]. В нервных тканях липидные рафты участвуют в процессах клеточной адгезии и сигнальной трансдукции, а в нейронах к тому же и в росте аксонов и дендритов, везикулярном транспорте и синаптической передаче [21]. Бактериальная обработка умеренно снижает окислительные реакции в головном мозге, как это отражается на ПОЛ-индуцированных адаптационно-защитных механизмах, включающихся при АКЭ, еще предстоит выяснить.

Системное подавление кишечной палочкой процессов ПОЛ при АКЭ препятствует оксидативному повреждению лейкоцитов и тканей организма и вносит свой вклад в механизмы ее противоопухолевого воздействия, что открывает новые перспективы использования *E. coli* в онкотерапии.

Поступила 27.03.15

***Escherichia coli*-ի ոչ պաթոգեն շտամի հակառուռուցքային և հակաօքսիդանտային ազդեցությունը Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի ժամանակ**

**Հ.Խ. Ավագյան, Հ.Ա. Մովսեսյան, Ն.Խ. Ալշուջյան,
Ն.Հ. Մովսեսյան, Լ.Հ. Մելքոնյան, Լ.Գ. Ավանեսյան, Գ.Ա. Գևորգյան**

E. coli-ի ոչ պաթոգեն շտամը ցուցաբերում է էական հակառուռուցքային ակտիվություն Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի (ԷԱԿ) ժամանակ, որն ուղեկցվում է ԷԱԿ-ինդուկցված լիպիդների գերօքսիդացման (ԼԳ) արգելակմամբ՝ իջեցնում մալոնային դիալդեհիդի (ՄԴԱ) մակարդակը և *in vitro* ՄԴԱ-ի գոյացման գործընթացը (ոչ ֆերմենտային ԼԳ մոդել) որովայնի և արյան լեյկոցիտների ու գլխուղեղի հյուսվածքների բջջապլազմայի և միտոքոնդրիումների մեջ և արյան պլազմայում: Միաժամանակ, *E. coli*-ն խթանում է ՄԴԱ-ի *in vitro* գոյացման գործընթացը ուռուցքային բջիջներում՝ նվազեցնելով իրենց դիմադրողականությունը:

Ստացված արդյունքները նոր հեռանկարներ են բացում *E. coli*-ի հետագա օգտագործման համար չարորակ ուռուցքների բուժման մեջ:

Anticarcinogenic and antioxidant effects of nonpathogenic *Escherichia coli* strain in Ehrlich ascites carcinoma

**H.Kh. Avagyan, H.A. Movsesyan, N.Kh. Alchujyan, N.H. Movsesyan,
L.H. Melkonyan, L.G. Avanesyan, G.A. Kevorkian**

Non-pathogenic *E. coli* exerts a significant antitumor activity in Ehrlich ascites carcinoma (EAC) accompanied by a significant decrease of EAC-induced lipid peroxidation (LP) processes, reducing the level of malondialdehyde (MDA) and *in vitro* MDA formation (in a non-enzymatic LP model system) in the cytoplasm and mitochondria of peritoneal and blood leucocytes and brain tissues, as well as in blood plasma. Simultaneously, *E. coli* increases twice the MDA *in vitro* formation in tumor cells pointed to a diminished resistance to therapy. The data obtained offer a potential for further study of *E. coli* to advance therapeutic treatment of malignant tumors.

Литература

1. Авагян О.Х., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О., Агабабова А.А. Метаболический профиль L-аргинина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха и влияние противоопухолевой терапии авирулентными штаммами *Escherichia coli*: синтаза оксида азота. Сообщение 2. Докл. НАН РА, 2013, т. 113, 4, с. 378-386.
2. Агабабова А.А., Мовсесян Н.О., Акопян А.М., Авагян О.Х. Морфогистохимические изменения при асцитной карциноме Эрлиха на фоне воздействия кишечной палочки. Докл. НАН РА, 2013, т. 113, 3, с. 303-310.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
4. Дижее Г.П., Ещенко Н.Д., Дижее А.А., Красовская И.Е. Введение в технику биохимического эксперимента. СПб., 2003.
5. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечнососудистой системы. М., 2001.
6. Лебедев В.В. Супероксидная теория патогенеза и терапии иммунных расстройств. Вестник РАМН, 2004, т. 2, с. 34-40.
7. Питлик Т.Н., Булай П.М., Денисов А.А., Афанасенков Д.С., Черенкевич С.Н. Редокс-регуляция ионного гомеостаза в нейронах. Биохимия, 2009, т. 26, 2, с. 104-110.
8. Поцелуева М.М., Пустовидко А.В., Ковалева Е.В., Шаталин Ю.В., Евдотьенко Ю.В. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки при развитии асцитной опухоли *in vitro* и *in vivo*. Цитология, 2005, т. 47, 1, с. 57-63.
9. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха. Метод. разработка Красноярск. гос. ун-та. Сост. Е.В. Инжеваткин, Красноярск, 2004.
10. Смирнова Л.П., Кондакова И.В. Зависимость активности антиоксидантных систем от выраженности процессов пролиферации и типа тканевой организации карциномы Эрлиха. Биомед. хим., 2004, т. 6, с. 566-575.
11. Ткаченко А.Г. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от токсического эффекта параквата, индуцирующего супероксидный стресс. Биохимия, 2004, т. 69, с. 234-242.
12. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от силы стрессорных воздействий супероксидных радикалов. Биохимия, 2007, т. 72, с. 109-116.

13. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В. Свободнорадикальное окисление и старение. СПб., 2003.
14. Alibek K., Bekmurzayeva A., Mussabekova A., Sultankulov B. Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. *Infect. Agents Cancer*, 2012, vol. 7, 1, p. 33–37.
15. Ayuyan A.G., Cohen F.S. Lipid peroxides promote large rafts: effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. *Biophys. J.*, 2006, vol. 91, 6, p. 2172–2183.
16. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, vol. 72, p. 3666–3670.
17. Bustamante J., Czerniczyniec A., Lores-Arnaiz S. Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. *Front. Biosci.*, 2007, vol. 12, p. 1034–1040.
18. Gambashidze K., Khorava P., Azaladze T. et al. Antitumor and adjuvant effects of phagelysates of E.coli in mice with Ehrlich carcinoma. *Exp. Oncol.*, 2012, vol. 34, 2, p. 107–111.
19. Chakravorty D., Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microb. Infect.*, 2003, vol. 5, p. 621–627.
20. Gerritsen W.B., van Boven W.-J.P., Boss D.S. Malondialdehyde in plasma, a biomarker of global oxidative stress during mini-CABG compared to on- end off-pump CABG surgery: a pilot study. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surgery*, 2006, vol. 5, p. 27–31.
21. Hering H., Lin C.C., Sheng M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.*, 2003, vol. 23 (8), p. 3262–3271.
22. Hudault S., Guignot J., Servin A.L. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection. *Gut*, 2001, vol. 49, 1, p. 47–55.
23. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265–275.
24. Lu C., Chan S.L., Fu W., Mattson M.P. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal facilitates opening of voltage-dependent Ca²⁺ channels in neurons by increasing protein tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 27, p. 24368–24375.
25. Montero A.J., Diaz-Montero C.M., Kyriakopoulos C.E., Bronte V., Mandruzzato S. Myeloid-derived suppressor cells in cancer patients: a clinical perspective. *J. Immunother.*, 2012, vol. 35, 2, p. 107–115.
26. Nishikawa M., Chang B., Inoue M. Inducible NO synthase inhibits the growth of free tumor cells, but enhances the growth of solid tumors. *Carcinogenesis*, 2004, vol. 25, 11, p. 2101–2105.
27. Oberley T., Schultz S., Li N. Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Rad. Biol. Med.*, 1995, vol. 19, p. 53–65.
28. O'Mahony S.M., Hyland N.P., Dinan T.G., Cryan J.F. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacol. (Berlin)*, 2011, vol. 214 (1), p. 71–88.
29. Ozaslan M., Karagöz I.D., Guldur M.E. Ehrlich ascites carcinoma. *African J. Biotechnol.*, 2011, vol. 10, 13, p. 2375–2378.
30. Pajak B., Wojewódzka U., Gajkowska B., Orzechowski A. Lipid rafts in anticancer therapy: Theory and practice (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2008, vol. 1, 2, p. 167–172.
31. Szuster-Ciesielska A., Hryciuk-Umer E., Stepulak A., Kupisz K., Kandefer-Szerszen M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol.*, 2004, vol. 43, p. 252–258.
32. Vanciková Z., Lodinová-Zádníková R., Radl J., Tlaskalová-Hogenová H. The early postnatal development of salivary antibody and immunoglobulin response in children orally colonized with nonpathogenic, probiotic strain of E. coli. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2003, vol. 48, 2, p. 281–287.
33. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.*, 2006, vol. 5, p. 14–16.