

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Южный федеральный университет»

«УТВЕРЖДАЮ»

д.б.н. В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2017 г.

ОТЧЁТ

на тему:

Опыты с биосенсорами по снижению токсичности ускорителя старения цисплатина ферментами пробиотических бактерий

Соглашение РНФ № 16-16-04032 от 11.08.2016 г (вн. № 213.01-03/2016-9) по научному проекту «Замедление репродуктивного старения кур с помощью культур пробиотических микроорганизмов – продуцентов веществ с антиоксидантной и ДНК-протекторной активностью»

Руководитель: д.б.н., В.А. Чистяков

Исполнитель: член-корр. РАН, д.м.н., А.В. Тутельян

Ростов-на-Дону

2017г.

Выбор модели и индуктора для изучения свойств армированных штаммов

Задачей данного этапа было изучение биологической активности армированных вариантов штаммов *Bacillus subtilis* КАТМІРА 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895. Известно, что для исходных штаммов была характерна антиоксидантная и ДНК-протекторная активность [1], поэтому для армированных вариантов изучались те же свойства. Для этого была подобрана адекватная задаче модель с использованием бактериальных биосенсоров и препаратов-индукторов повреждения ДНК.

Известно, что ДНК-тропные агенты, такие, как противораковые препараты, способны вызывать межпочечные сшивки, способны приводить к развитию прогероидных синдромов, иначе говоря, к преждевременному старению [2]. Этот эффект проявляется на клеточном и др. уровнях и в комплексе носит название приобретенного преждевременного прогероидного синдрома (acquired premature progeroid syndrome, APPS).

Повреждение ДНК препаратами платины заключается, помимо прочего, в формировании межпочечных сшивок (МЦС, ICL), что приводит к цитотоксическим эффектам [3,4,5]. МЦС связывают со старением организмов. Одним из основных факторов может быть истощение репликативного потенциала стволовых клеток, клеток-предшественников и нормальных клеток из-за повышенного апоптоза [2].

В наших опытах в качестве индуктора повреждений ДНК, в потенциале ведущих к ускорению старения, мы использовали противораковые препараты «Цисплатин» и «Оксиплат», действующим веществом которых являются цисплатина и оксалиплатин соответственно.

Оксалиплатин (оксиплат) – препарат нового поколения, часто используемый в качестве альтернативы цисплатину. Представляет собой комплекс платины с оксалатом и 1,2-диамино-циклогексаном, обуславливает формирование платиновых внутринитевых «сшивок», что приводит к

остановке клеточного цикла и гибели клеток. Биотрансформируется с образованием водных производных, взаимодействующих с ДНК и нарушающих ее синтез. Побочные эффекты данного препарата менее выражены, чем эффекты цисплатина [6,7].

Действие оксалиплатина сходно с действием цисплатина, однако имеется и ряд важных отличий. Так, имеются данные, что эти препараты по-разному взаимодействуют с системой ММР (мисматч-репарации). Аддукты цисплатина распознаются ею, запуская с-Abl/p73 путь апоптоза, что обеспечивает цитотоксический эффект цисплатина; аддукты оксалиплатина ею не распознаются, по-видимому, из-за неполярности диаминоциклогексанового кольца [7].

Чтобы изучить генотоксичность двух препаратов на основе платины (цисплатина и оксалиплатина) в простой модельной системе, мы использовали линейку бактериальных биосенсоров на основе *E. coli*, реагирующих на окислительный стресс и повреждения ДНК. Эта методика ранее успешно применялась ранее для изучения прооксидантных и антиоксидантных свойств широкого спектра соединений и препаратов [8], а также для изучения механизмов действия физических факторов [9]. Принципиальная возможность определения генотоксичности препаратов платины в аналогичном тесте была показана нашими коллегами из ГосНИИ Генетика [10].

Эксперименты показали, что препараты платины вызывают у *E. coli* индукцию Rec-оперона и ColD генов, т.е., запускают механизм SOS-репарации.

На основании экспериментов с биосенсорами были установлены нелетальные и максимально эффективные дозы препаратов.

Методика. В ходе исследований трем курам из контрольной группы в возрасте 19 недель давали корм с повышенным содержанием пробиотика (в дозе 10% от рациона). Давали препарат, основанный на *B. subtilis* КАТМІРА либо на *B. amyloliquefaciens* В1865. Затем из экскрементов птиц на твердой

питательной среде МПА были выделены прошедшие через желудочный тракт птицы бактерии – так называемые армированные штаммы *B. subtilis* KATMIRA и *B. amyloliquefaciens* B1865 соответственно.

Штаммы *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 и *Bacillus amyloliquifaciens* B-1895 выращивались в течение суток в жидкой среде LB (Luria-Bertani) в термостате при температуре 37°C. Супернатант, лишенный клеток, был получен путем центрифугирования культуры бацилл (Minispin-plus; Eppendorf, Leipzig, Germany) в течение 7 минут на 6000 оборотах в секунду.

Биосенсорные штаммы *Escherichia coli* MG 1655 pRecA-lux, MG 1655 ColD-lux, MG 1655 pKatG-lux, MG 1655 pSoxS-lux выращивали в течение суток на жидкой среде LB (Luria-Bertani) в термостате при температуре 37°C. Через сутки после посева, культуру разбавляли в пробирке до 0,1 единицы по МакФарланду, затем разбавлялась в 100 раз средой LB и выдерживали в термостате в течение 2 часов (до ранней экспоненциальной фазы роста культуры). После чего вносили в планшет в количестве 90 мкл на ячейку и измеряли биолюминесценцию, наблюдаемую при повреждении клеток ципрофлоксацином, с помощью люминометра LM-01T (Immunotech, Praha, Czech Republic).

Результаты. Индукция штамма *E. coli* MG1655 (ColD-lux) цисплатином наблюдалась в диапазоне концентраций 0.005-50мг/мл. Максимальный фактор индукции составил 95.9. Значительной индукции штаммов, реагирующих на окислительный стресс (*E. coli* MG1655 KatG-lux, *E. coli* MG1655 SoxS-lux), не наблюдалось.

Оксалиплатин проявил схожую по характеру активность в биосенсорном тесте с ColD-lux-штаммом (рис. 1), тогда как в тесте с KatG-lux-штаммом его активность была значительно выше, чем у цисплатина (рис. 2).

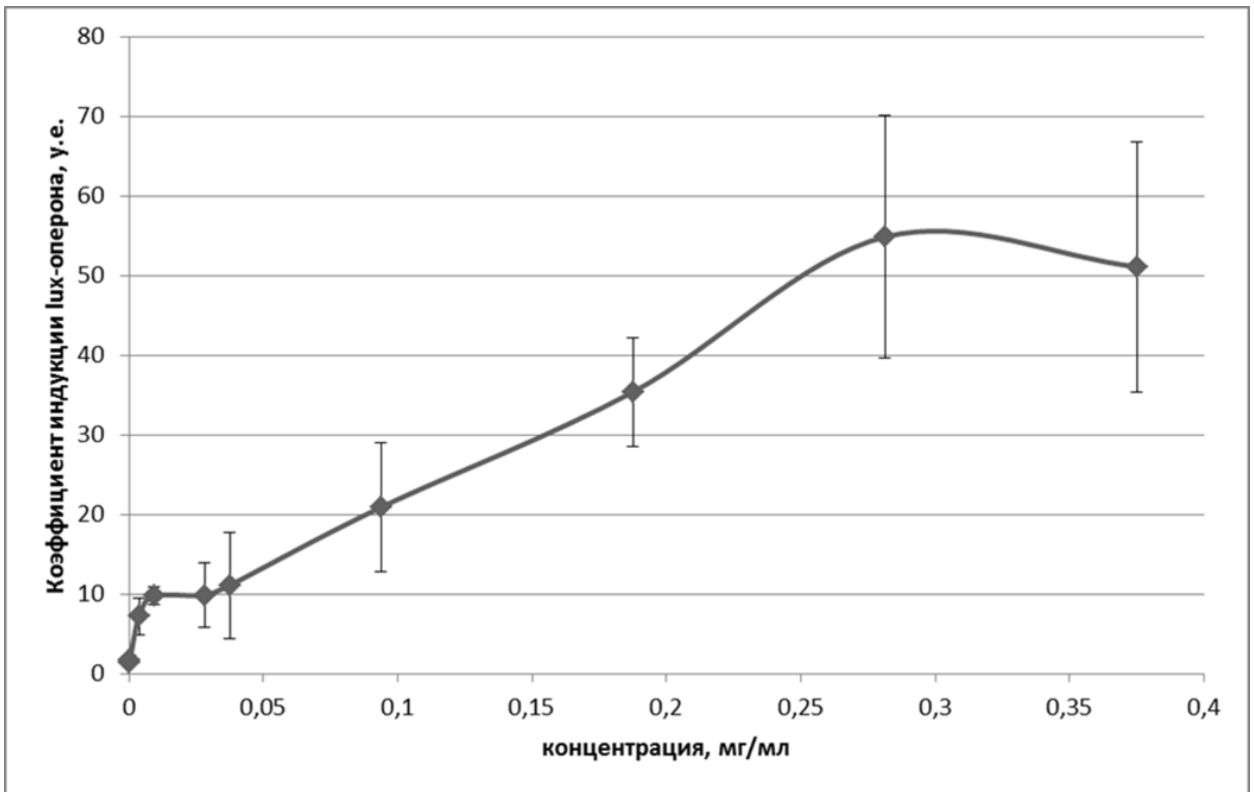


Рис. 1. Индукция штамма *E.coli* MG1655 (CoID-lux) оксалиплатином. Действующие концентрации находились в диапазоне 0.0005-5 мг/мл. Максимальный фактор индукции 54.85.

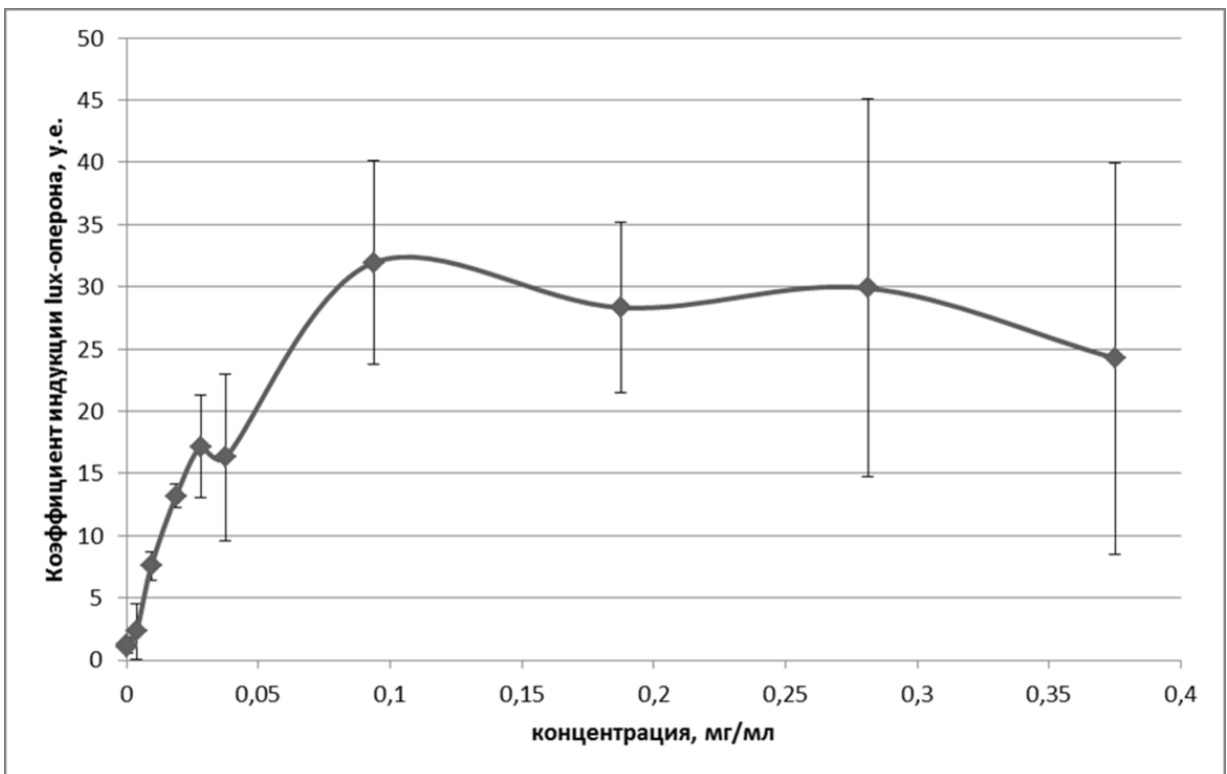


Рис. 2. Индукция штамма *E.coli* MG 1655 (KatG-lux) оксалиплатином. Действующие концентрации находились в диапазоне 0,00001 – 1 мг/мл. Максимальный фактор индукции 31.9.

Последние исследования показывают, что, помимо прямого взаимодействия с ДНК и образования аддуктов, мутагенные и цитотоксические свойства цисплатина могут реализовываться посредством индукции окислительного стресса и генерации активных форм кислорода (АФК), как прямо, так и косвенно [11,12,13]. Это мнение подтверждается, в том числе, и тем фактом, что некоторые антиоксиданты, в частности, аскорбат [14] способны снижать мутагенный потенциал цисплатина.

Препараты платины имеют также мутагенный эффект. Установлено, что подобранные с помощью биосенсорного теста нелетальные для исследованных штаммов дозы данных препаратов вызывают у *E. coli* MG 1655 3--7-кратное увеличение частоты мутантов, устойчивых к антибиотикам [15]

Окислительный стресс играет роль и в реализации эффектов оксалиплатина [12]. Как и в случае с цисплатином, есть данные [16], что природные антиоксиданты силибинин и α -токоферол снижают токсичность препарата.

Как можно видеть из представленных данных, спектр и интенсивность генерации АФК двумя изученными препаратами платины различаются. Цисплатин не демонстрировал активности в опытах с биосенсором, реагирующим на перекись водорода, и проявлял слабую активность в опытах с биосенсором, реагирующим на супероксид-анион-радикал, тогда как оксалиплатин, напротив, вызывал экспрессию соответствующего оперона *KatG-lux*-штамма, демонстрируя способность к генерации перекиси водорода. Поскольку именно с генерацией АФК связывают ряд побочных эффектов препаратов, можно предположить, что и побочные эффекты их различаются по механизмам реализации.

Для дальнейших исследований был выбран оксалиплатин как препарат, вызывающий не только генотоксический, но и прооксидантный эффект.

1.1. Изучение протекторных свойств армированных штаммов.

Было установлено, что армированные штаммы штаммов не теряют присущих исходным вариантам ДНК-протекторной и антиоксидантной активностей (табл.1). Значения протекторных эффектов армированных штаммов в большинстве случаев не имеют статистически значимых отличий от таковых для исходных вариантов штаммов

Таблица 1. Протекторная активность армированных штаммов в сравнении с исходными

Штамм	Биосенсор					
	RecA		ColD		SoxS/KatG	
	Максимальная ДНК-протекторная активность, %	Концентрация, в которой наблюдается эффект (объем от исходного ферментата, %)	Максимальная ДНК-протекторная активность, %	Концентрация, в которой наблюдается эффект (объем от исходного ферментата, %)	Антиоксидантная активность, %	Концентрация, в которой наблюдается эффект (объем от исходного ферментата, %)
В1895	28,8±2,3	1	50,5±4,1	0,1	42,8±5,3	1
В1895 армированный	30,8±3,1	1	48,2±4,8	1	49,1±4,5	1
Katmira 1933	27,1±2,9	0,1	67,5±5,7	0,1	60,2±5,9	0,1
Katmira 1933 Армированный	30,3±3,7	0,1	66,7±6,1	0,1	58,3±4,2	0,1

Таким образом, продемонстрированные в опытах ДНК-протекторная и антиоксидантная активности штаммов *Bacillus subtilis* КАТМИРА 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 сохраняются при колонизации данными штаммами кишечника птиц и могут служить основой для защиты от агрессивных факторов среды, ускоряющих старение.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Churilov M.N., Mazanko M.S., Bren A.B., Volski A., Chikindas M.L. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933. *Lett Appl Microbiol.*, 2015, 61(6): 549-554.
2. Grillari, J., Katinger, H., & Voglauer, R. (2007). Contributions of DNA interstrand cross-links to aging of cells and organisms. *Nucleic acids research*, 35(22), 7566-7576.
3. Brabec, V. and Leng, M. (1993) DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum (II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 5345–5349.
4. Jones, J.C., Zhen, W.P., Reed, E., Parker, R.J., Sancar, A. and Bohr, V.A. (1991) Gene-specific formation and repair of cisplatin intrastrand adducts and interstrand cross-links in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 266, 7101–7107.
5. Roberts, J.J. and Friedlos, F. (1987) Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair in mammalian cells: relationship to toxicity. *Pharmacol. Ther.*, 34, 215–246.
6. Ta, L. E., Espeset L., Podratz J., Windebank A.J. (2006) Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum–DNA binding. *Neurotoxicology*. 27(6), 992–1002.
7. Орлова Р.В. (2002) Новые лекарственные средства в лечении колоректального рака. *Практическая онкология*. 3(4), 273– 281.
8. Чистяков В.А., Празднова Е.В., Гутникова Л.В., Сазыкина М.А., Сазыкин И.С. (2012) Супероксидустраниющая активность производного пластохинона - 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1). *Биохимия*. 77(7), 932-935.

9. Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Sazykina M.A., Sazykin I.S. (2014) Study of Prooxidant Action of Ultraviolet Radiation with Wavelength 258 Nm Using Bacterial Biosensors. *MEJSR* **21**(8), 1333–1340
10. Манухов И.В., Котова В.Ю., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Бельков А.П., Завильгельский Г.Б. (2008) Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *Escherichiacoli* растительными экстрактами: роль гидроперекисей и эффект синергизма при совместном действии с цисплатиной. *Микробиология*. **77**(5), 590–597.
11. Miyajima A., Nakashima J., Yoshioka K., Tachibana M., Tazaki H., Murai M. (1997) Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br J Cancer*. **76**(2), 206–210.
12. Laurent A., Nicco C., Chéreau C., Goulvestre C., Alexandre J., Alves A., Lévy E., Goldwasser F., Panis Y., Soubrane O., Weill B., Batteux F. (2005) Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer res*. **65**(3), 948–956.
13. Godwin A.K., Meister A., O'Dwyer P.J., Huang C.S., Hamilton T.C., Anderson M.E. (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**(7), 3070–3074.
14. Giri A., Khyriam D., Prasad S.B. (1998) Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutat Res*. **421**(2), 139–148.
15. В. А. Чистяков, Е. В. Празднова, М. С. Мазанко, М. Н. Чурилов, В. К. Чмыхало Развитие резистентности к антибиотикам у бактерий при противоопухолевой терапии препаратами на основе платины //Молекулярная биология, 2018, №.2 – в печати
16. Di Cesare Mannelli L., Zanardelli M., Failli P., Ghelardini C. (2012) Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin. *J Pain*. **13**(3), 276–284.