

**П.Г. Полищук:** Как вы можете объяснить результаты своего эксперимента? Можете чуть подробнее рассказать об эксперименте и как его результаты соотносятся с выдвигаемой гипотезой? И какие альтернативные гипотезы рассматривались? Мне сложно вообразить механизм деактивации ТРТ путем его прямого взаимодействия с выбранными соединениями. Как я понял из слайдов вы предполагаете, что это основной механизм деактивации антибиотика. Не может ли наблюдаемый эффект быть обусловлен чем-то другим? Какие дополнительные эксперименты следовало бы провести на Ваш взгляд, чтобы подтвердить или опровергнуть гипотезу о механизме потери активности антибиотиком в присутствии этих соединений?

**В.А. Сало:** Оценка степени конденсации хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека по КГГ производилась в соответствии с методикой, которая описана в работе [1]. Клетки, обработанные смесью ТРТ–CAF/FMN/С60 и контрольный образец (клетки без препаратов), были окрашены красителем орсеином. Ядра клеток были исследованы под микроскопом с увеличением 400 раз (на слайде 6 показаны примеры фотографий клеток). Посчитанные значения КГГ далее используются в формуле 2 (слайд 12) для получения фактора AD. Этот фактор соответствует количеству молекул препарата ТРТ, вытесненного из ДНК при добавлении CAF/FMN/С60.

Таким образом, метод оценки степени конденсации хроматина позволяет по КГГ качественно оценить действие вводимой в биосистему смеси антибиотика топотекана и молекулы-интерцептора (CAF/FMN/С60). Ранее нашей группой было показано, что при совместном введении ароматических биологически активных веществ (БАВ), наблюдается биологический синергизм, который, согласно нашей гипотезе, обусловлен процессами нековалентного комплексообразования, т.е. гетероассоциацией БАВ (интерцепторный механизм) и/или их конкуренцией за места посадки на ДНК (протекторный механизм).

Полученные из эксперимента *in vitro* данные изменения КГГ указывают на то, что при совместном введении топотекана и молекул-интерцепторов наблюдается уменьшение действия антибиотика за счёт того, что ТРТ связывается с интерцептором и уже меньшее количество молекул ТРТ способно связаться с ДНК. Наши коллеги показали в эксперименте на мышах, что при введении антибиотика доксорубин совместно с фуллереном С60, наблюдается уменьшение опухоли [2]. Предполагается, что потенциальные механизмы противоопухолевого действия комплекса С60 – Доксорубин включают как его прямое воздействие на опухолевые клетки, вызывая гибель клеток, так и повышение чувствительности к стрессу и иммуномодулирующий эффект.

Таким образом, в этой работе нами предпринята попытка качественного и количественного анализа нековалентного взаимодействия традиционного противоопухолевого препарата с фуллереном С60 (на примере топотекана).

Основная гипотеза работы — это влияние нековалентного комплексообразования БАВ на биологический отклик системы. Альтернативные гипотезы не рассматривались.

Полагаем, что в данной ситуации термин «деактивация» не совсем уместен, поскольку мы используем, скорее, механистический взгляд на молекулы, когда одна молекула перехватывает другую (антибиотик), мешая тем самым последнему реализовывать свою биологическую функцию.

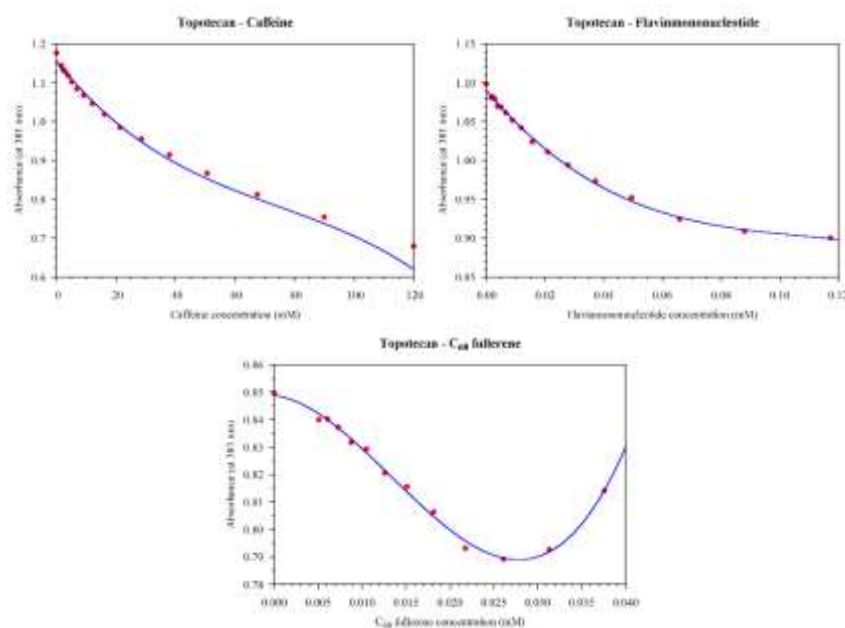
**П.Г. Полищук:** Исходя из каких предпосылок были выбраны эти три соединения-перехватчика?

**В.А. Сало:** Сравнительно недавно было обнаружено, что немодифицированный фуллерен С<sub>60</sub> способен оказывать интерцепторное действие на ароматические соединения (доксорубин, ландомицин А, ICR-191), проявляющееся *in vitro*, *in vivo*. Поэтому можно также ожидать проявление подобного механизма действия фуллерена С<sub>60</sub> по отношению к топотекану. Кофеин и флавин-мононуклеотид были взяты для сравнительного анализа как классические ароматические интерцепторы.

**П.Г. Полищук:** Какие выводы можно сделать из слайда 11? Как вы интерпретируете эти спектры?

**В.А. Сало:** По представленным на слайде 11 спектрам поглощения смесей ТРТ–CAF/FMN/С<sub>60</sub> при различных концентрациях интерцепторов мы находили параметры гетероассоциации каждой пары «антибиотик – интерцептор». Для этого использовали не все спектры, а только

концентрационную зависимость оптической плотности смеси, снятую на длине волны, соответствующей максимуму поглощения чистого топотекана (см. рисунки ниже).



Далее полученные кривые аппроксимировали с помощью статистико-термодинамических моделей из работ [3,4] (для анализа гетероассоциации ТРТ( $X$ )–CAF/FMN( $Y$ )):

$$A = \varepsilon^{(m)} x_0 - (\varepsilon^{(m)} - \varepsilon^{(h)}) \frac{K_h x_1 y_1}{1 - K_Y y_1} \left( 1 + \frac{2 K_h y_1}{1 - K_Y y_1^2} \right);$$

$$\begin{cases} x_0 = x_1 \left( 1 + \frac{K_h y_1}{1 - K_Y y_1} + \frac{K_h^2 y_1^2}{(1 - K_Y y_1)^2 (1 + K_Y y_1)} \right) \\ y_0 = \frac{y_1}{(1 - K_Y y_1)^2} \left( 1 + K_h x_1 + K_h^2 x_1 y_1 \frac{2 + K_Y y_1 + K_Y^2 y_1^2}{(1 - K_Y y_1)(1 + K_Y y_1)^2} \right) \end{cases};$$

и [5] (для анализа комплексообразования ТРТ( $X$ )–C<sub>60</sub>( $C$ )):

$$D_{opt} = \varepsilon_m x_1 + \varepsilon_{h1} K_{h1} C'_{R1} x_1 B + \varepsilon_{h2} (x_0 - x_1 - K_{h1} C'_{R1} x_1 B);$$

$$\begin{cases} \frac{C_0}{r} = C'_{R1} B + K_{h1} C'_{R1} x_1 B + \frac{C'_{M0}}{r} + \frac{C'_{M0} B K'_R C'_{R1}}{r (1 - K'_R C'_{R1})} \\ x_0 = x_1 + K_{h1} C'_{R1} x_1 B + \frac{C'_{M0} H K_{h2} x_1}{r (1 - K_{h2} x_1)} \end{cases}.$$

Аппроксимация кривой производилась путем подгонки нескольких параметров, среди которых главную роль играет равновесная константа ассоциации. Впоследствии полученные значения констант подставляются в систему уравнений для нахождения фактора  $A_D$  по формуле 1 слайда 12.

### Литература

- [1] Shckorbatov Yu.G., Pasiuga V.N., Kolchigin N.N., Grabina V.A., Batrakov D.O., Kalashnikov V.V., Ivanchenko D.D., Bykov V.N. The influence of differently polarised microwave radiation on

- chromatin in human cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 2009, 85(4), 322–329. DOI: 10.1080/09553000902781113
- [2] Prylutska S.V. *et al.* Complex of C<sub>60</sub> fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy // *Nano. Res. Let.* 2015, 10(1), 1-7. DOI: 10.1186/s11671-015-1206-7
- [3] Buchelnikov A.S., Khrustalev A.F., Evstigneev M.P. Development of an analytical approach to study a three-component hetero-association by means of spectrophotometry // *Appl. Spectrosc.* 2013, 67(1), 29–35. DOI: 10.1366/12-06619
- [4] Buchelnikov A.S., Evstigneev V.P., Evstigneev M.P. Hetero-association models of non-covalent molecular complexation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019, 21(15), 7717–7731. DOI: 10.1039/c8cp03183e
- [5] Mosunov A., Evstigneev V., Buchelnikov A., Salo V., Prylutsky Yu., Evstigneev M. General up-scaled model of ligand binding with C<sub>60</sub> fullerene clusters in aqueous solution // *Chem. Phys. Lett.* 2019, 721, 22–26. DOI: 10.1016/j.cplett.2019.01.051