

**МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКА МИТОКСАНТРОНА В СМЕСИ С ФУЛЛЕРЕНОМ:  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Сало В.А., Гаврилова В.А., Лантушенко А.О.  
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»  
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ  
e-mail: viktoriya\_salo@mail.ru

**Аннотация.** В настоящей работе были изучены механизмы синергетического действия противоопухолевого антибиотика новатрона и немодифицированного фуллерена  $C_{60}$ . Исследована гетероассоциация антибиотика новатрона с фуллереном. Определены константы гетероассоциации молекул, позволяющие рассчитать изменение биологической активности препарата при добавлении лиганда в определенном соотношении концентраций. Полученные экспериментальные зависимости количества гранул гетерохроматина от концентрации лигандов хорошо описываются в рамках теории интерцепторно-протекторного действия.

**Ключевые слова:** фуллерен  $C_{60}$ , новатрон, гетероассоциация.

**MECHANISM OF ACTION OF ANTIBIOTICS OF MITOXANTRON IN MIXTURE WITH FULLEREN:  
EXPERIMENTAL AND THEORETICAL ASPECTS**

Salo V.A., Gavrilova V.A., Lantushenko A.O.  
Sevastopol State University  
Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia  
e-mail: viktoriya\_salo@mail.ru

**Summary.** In this paper, the mechanisms of synergistic action of the antitumor antibiotic novatron and unmodified fullerene  $C_{60}$  have been studied. The hetero-association of the antibiotic novatron with fullerene was investigated. The hetero-association constants of the molecules have been determined, allowing one to calculate the change in the biological activity of the preparation when a ligand is added in a certain concentration ratio. The obtained experimental dependences of the amount of heterochromatin granules on the concentration of ligands are well described within the framework of the theory of interceptor-protector action.

**Key words:**  $C_{60}$  fullerene, novatrone, hetero-association.

В последнее десятилетие отмечается повышенный интерес к изучению физико-химических свойств наночастиц углерода – фуллеренов  $C_{60}$ , а также эффектов их воздействия на биологические системы. Фуллерен представляет собой сферическую молекулу, полностью состоящую из атомов углерода. Ранее было показано, что фуллерен проявляет антиоксидантные свойства, способен подавлять рост злокачественных опухолей [1].

Антибиотик митоксантрон (новатрон, NOV) является противоопухолевым антибиотиком ДНК-направленного действия и широко используемым в клинической практике, при этом характеризующийся побочной токсичностью при химиотерапии. По структуре молекула новатрона является модифицированным аналогом антибиотиков антрациклинового семейства и в целом проявляет несколько меньшую, чем антрациклины, противоопухолевую активность. Однако побочные эффекты кардиотоксичности NOV существенно снижены по сравнению, например, с дауномицином, что предполагает перспективность более широкого применения антибиотика в клинической практике. Предполагается, что фармакологическое действие новатрона связано с интеркаляцией его в двухцепочечную спиральную ДНК, в результате чего происходят разрывы цепи, и таким путём ингибируя синтез ДНК и РНК.

Введение в организм больных раком мышей растворенного в воде фуллерена совместно с противоопухолевым препаратом доксорубицином, как показано в работе [2], усиливает действие последнего и приводит к торможению роста метастаз, увеличению продолжительности жизни животных и усилению защитных эффектов на различных клеточных уровнях. В работе [3] было предположено, что ключевым механизмом, обуславливающим данный медико-биологический синергизм, является нековалентное комплексообразование (гетероассоциация) фуллерена с антибиотиком. Таким образом, при комбинировании антибиотиков с ароматическими соединениями их медико-биологическая активность может изменяться.

Существует теория интерцепторно-протекторного действия (ИПД), которая позволяет оценить долю вытесненного из ДНК препарата при введении молекулы-интерцептора относительно доли комплексов ДНК-Препарат в отсутствие молекулы-интерцептора [4]. В основе теории ИПД лежит система уравнений баланса масс. Вычисляемый из неё фактор  $A_p$ , позволяет оценить действие молекулы перехватчика по отношению к препарату.

В настоящей работе исследовано совместное действие ароматического лиганда фуллерена  $C_{60}$  и противоопухолевого антибиотика митоксантрона. Исследования проводились в 2 этапа: анализ на клеточных системах буккального эпителия и изучение взаимодействия митоксантрона и фуллерена методами спектрофотометрии в рамках теории ИПД.

**Клеточные эксперименты.** В качестве экспериментального материала использовали клетки буккального эпителия человека. Соскоб клеток буккального эпителия делали с внутренней поверхности щеки донора с помощью тупого стерильного шпателя. Затем клетки помещали в 3.03 ммоль/л фосфатный буфер (pH=7.0) с добавлением 2.89 ммоль/л хлорида кальция. Исследование совместного эффекта действия митоксантрона и фуллерена  $C_{60}$  проводилось путём оценки состояния хроматина в них по количеству гранул гетерохроматина (КГГ) в ядрах клеток после окрашивания орсеином. Изучение процесса гетерохроматинизации позволяет оценить изменения функциональной активности

клеточного ядра. Исследовалось изменение показателей КГГ в клетках буккального эпителия человека в системе NOV-Фуллерен  $C_{60}$  в зависимости от концентрации фуллерена при постоянной концентрации новатрона. Величина КГГ в каждом варианте эксперимента определялась в 30 ядрах. По отклонению полученного в опыте значения от контрольного значения КГГ делался вывод о среднем значении КГГ. Для проведения эксперимента производили отбор клеток у трех доноров А, В, С. Доноры некурящие, женского и мужского пола 22 и 25 лет. В качестве негативного контроля рассматривались значения КГГ клеток в буфере без препарата, в качестве позитивного контроля - КГГ клеток в растворе новатрона без добавления фуллерена.

Спектрофотометрический анализ. При проведении спектрофотометрического анализа снимали спектры поглощения новатрона при его неизменной концентрации и варьируемой концентрации фуллерена. При исследовании гетероассоциации NOV- $C_{60}$  осуществлялось титрование фуллерена  $C_{60}$  новатроном в широком диапазоне концентраций  $C_{C_{60}} = (1.36 \cdot 10^{-4} - 7 \cdot 10^{-7})$  М. По аналогии с изученными ранее системами фуллерен  $C_{60}$ -Лиганд расчёты проводились в той части спектров, где наблюдалось уменьшение оптической плотности с ростом концентрации фуллерена, что свидетельствует об образовании комплексов новатрон- $C_{60}$ . Концентрация антибиотика в смешанном растворе поддерживалась постоянной  $C(NOV) = 2.3 \cdot 10^{-5}$  М.

Результаты и обсуждение. Проведено исследование действия антибиотика новатрона в смеси с фуллереном на клетки буккального эпителия человека. С ростом концентрации фуллерена наблюдалось снижение показателя КГГ по отношению к позитивному контролю и при концентрации  $6.6 \cdot 10^{-5}$  М оно в пределах погрешности совпадало с КГГ для негативного контроля. Результаты экспериментов показаны на рисунке 1.

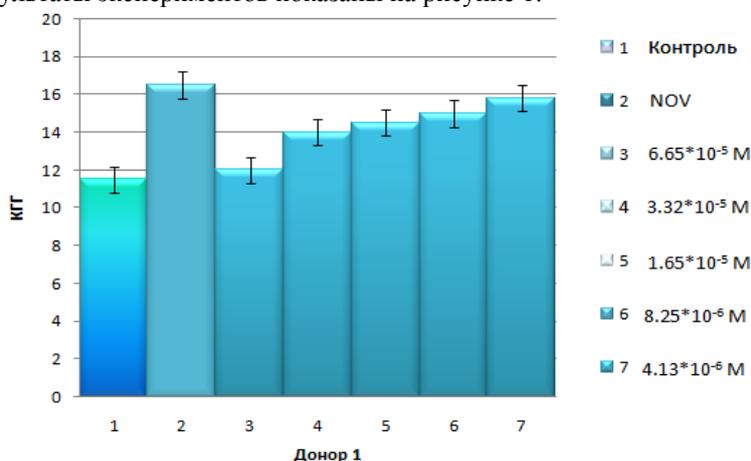


Рисунок 1 – Временная зависимость показателя КГГ при постоянной концентрации NOV равной  $2.95 \cdot 10^{-8}$  М и переменной концентрации фуллерена

Спектрофотометрический анализ. По данным спектрофотометрии были построены графики: зависимости оптической плотности новатрона  $A$  от концентрации фуллерена  $C_{60}$  в смешанном растворе NOV- $C_{60}$  (см. рис. 2)

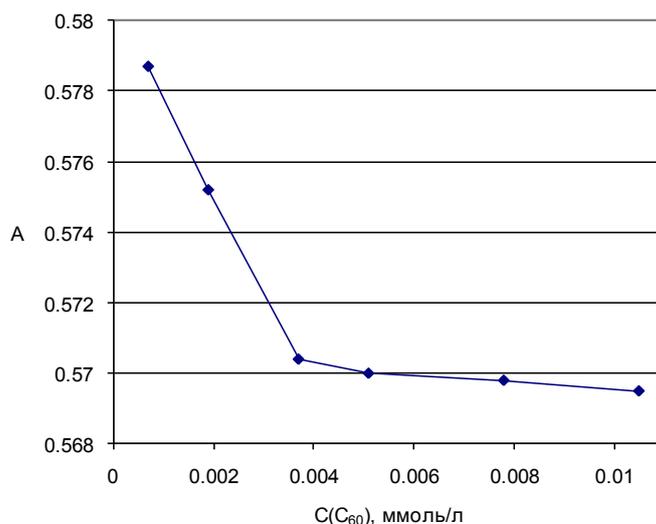


Рисунок 2 – График зависимости величины оптической плотности  $A$  от концентрации фуллерена  $C_{60}$  в смешанном растворе NOV- $C_{60}$

Анализ ассоциации молекул NOV( $Y$ ) и  $C_{60}$ ( $X$ ) проведен по концентрационной зависимости молярного коэффициента поглощения NOV на длине волны, соответствующей максимуму поглощения мономера антибиотика.

Уравнения материального баланса молекул NOV и  $C_{60}$  в состоянии равновесия имеют вид:

$$[X_0] = [X_1] + 2K_X[X_1]^2 + K_C[X_1][Y_1], \quad (1)$$

$$[Y_0] = [Y_1] + 2K_Y [Y_1]^2 + K_C [X_1][Y_1], \quad (2)$$

где  $[X_0]$ ,  $[Y_0]$  — исходные молярные концентрации  $C_{60}$  и NOV;  $[X_1]$ ,  $[Y_1]$  — равновесные молярные концентрации лигандов в мономерной форме. В качестве  $X_0$  используется массив концентраций  $C_{60}$ , а  $Y_0$  известен как  $2.3 \cdot 10^{-5} M$ . Экспериментальная оптическая плотность может быть представлена в виде:

$$A = \varepsilon_m [Y_1] + 2\varepsilon_d [Y_1] + \varepsilon_c [Y_c] \quad (3)$$

где  $\varepsilon_m$ ,  $\varepsilon_d$ ,  $\varepsilon_c$  — молярные коэффициенты поглощения лиганда  $Y$  в мономерной (m), димерной (d) формах и в составе гетерокомплекса,  $l$  — длина оптического пути в кювете, равная 1 см. Известно, что  $\varepsilon_m = 19500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

Были получены значения: для константы гетероассоциации  $K_C = 73600 M^{-1}$ , для коэффициента экстинкции в комплексе  $\varepsilon_c = 14900 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Полученное значение константы гетероассоциации  $C_{60}$ -NOV близко к значению  $C_{60}$ -DOX ( $61900 M^{-1}$ ) и существенно превышает константы гетероассоциации для других систем  $C_{60}$ -лиганд, исследованных ранее.

Следовательно, можно предположить, что существует непосредственное взаимодействие молекул новатрона с молекулами  $C_{60}$ , которое снижает биологический эффект, производимый NOV на ядра клеток, что косвенно согласуется теорией интерцепторно-протекторного действия, т.е. интерцепторно-протекторный механизм взаимодействия в системах «NOV- $C_{60}$ -ДНК» проявляется на клеточном уровне.

Таким образом, результаты экспериментального и теоретического рассмотрения подтвердили исходное ожидание, основанное на результатах физико-химического эксперимента предыдущих исследований, показавших, что фуллерен и новатрон проявляют выраженное биологическое взаимодействие при совместном введении в биосистему. Важность этого эффекта напрямую связана с усилением противоопухолевой активности NOV, что допускает потенциальную возможность использования водной смеси фуллерена и новатрона в качестве новой лекарственной формы этого препарата.

#### Список литературы / References:

1. Prylutska S, Grynyuk I, Matyshevska O, Prylutskyi YI, Ritter U, Scharff P. Anti-oxidant properties of  $C_{60}$  fullerenes in vitro. *Fuller nanotub Carbon nanostr.*, 2008, vol. 16, no. 5–6, pp. 698-705.
2. Prylutska S, Burlaka A, Prylutskyi YI. Comparative study of antitumor effect of pristine  $C_{60}$  fullerenes and doxorubicin. *Biotechnol.*, 2011, vol. 4, no. 6, pp. 82-87.
3. Evstigneev M.P., Buchelnikov A.S., Voronin D.P., Rubin Y.V., Belous L. F., Prylutskyi Y., Ritter U. Complexation of  $C_{60}$  Fullerene with Aromatic Drugs. *J. ChemPhysChem.*, 2013, vol. 14, pp. 568-578.
4. Evstigneev M., Lantushenko A., Evstigneev V., Mykhina Y. V., Davies D. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs. *Biophysical chemistry.*, 2008, vol. 132, no. 2, pp. 148-158.

#### ДНК-ТРАНСПОЗОНЫ IS630/TC1/MARINER У ГРЕБНЕВИКА MNEMIOPSIS LEIDYI

Пузаков М.В., Пузакова Л.В.

ФГБУН Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, РФ

e-mail: puzakov@ngs.ru

**Аннотация.** Суперсемейство ДНК-транспозонов *IS630/Tc1/mariner* является одним из самых широкопредставленных, как у наземных, так и водных организмов. В геноме *Mnemiopsis leidyi* нами обнаружены семь новых элементов, принадлежащих к данной группе мобильных генетических элементов. Филогенетический анализ и анализ каталитических доменов транспозаз обнаруженных элементов показал, что они представляют три семейства (*rosa*, *mariner*, *pogo*) из восьми, входящих в суперсемейство *IS630/Tc1/mariner*.

**Ключевые слова:** *Mnemiopsis leidyi*, мобильные генетические элементы, ДНК-транспозоны, *IS630/Tc1/mariner*, транспозаза.

#### DNA TRANSPOSONS IS630/TC1/MARINER IN THE GENOME MNEMIOPSIS LEIDYI

Puzakov M.V., Puzakova L.V.

The A.O.Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nakhimova av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: puzakov@ngs.ru

**Abstract.** The superfamily of DNA transposons *IS630/Tc1/mariner* is one of the most widely represented, both terrestrial and aquatic organisms. In the genome of *Mnemiopsis leidyi*, we found new seven elements belonging to this group of transposable elements. Phylogenetic analysis and analysis of the transposase catalytic domains of the detected elements showed that they represent three families (*rosa*, *mariner*, *pogo*) of the eight included in the *IS630/Tc1/mariner* superfamily.

**Key words:** *Mnemiopsis leidyi*, transposable elements, DNA transposons, *IS630/Tc1/mariner*, transposase.

ДНК-транспозоны являются мобильными генетическими элементами (МГЭ) класса II. МГЭ - это последовательности ДНК с характерной структурой, способные перемещаться по геному. К настоящему времени МГЭ обнаружены во всех исследованных организмах [1,2]. Перемещения МГЭ оказывают значимое воздействие на геном, в