

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПЕРВЫЙ САНКТ-
ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И. П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БЕРДИЧЕВСКИЙ
Григорий Михайлович

**КОНЬЮГАТЫ НАНОАЛМАЗОВ С ЦИТОСТАТИКАМИ
(ДОКСОРУБИЦИН, ДИОКСАДЭТ): БИОЛОГИЧЕСКАЯ И
ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д. м. н., доцент Л. В. Васина

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2023

	5
ВВЕДЕНИЕ	
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Наноалмазы детонационного синтеза	15
1.1.1 Визуализация наноалмазов в клетке	15
1.1.2 Цитотоксичность наноалмазов детонационного синтеза	16
1.1.3 Биораспределение наноалмазов детонационного синтеза в организме животных	17
1.2 Доксорубицин и диоксадэт в качестве противоопухолевых агентов	19
1.2.1 Доксорубицин	19
1.2.2 Диоксадэт	21
1.3 Наноалмазы - носители противоопухолевых агентов	24
1.3.1 Механизмы противоопухолевой лекарственной устойчивости	28
1.3.2 Роль наноалмазов детонационного синтеза в преодолении лекарственной устойчивости злокачественных опухолей	28
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	35
2.1. Характеристика ДНА–Докс и ДНА–Диокс	36
2.1.1. Идентификация конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс	36
2.1.2. Структурная характеристика наноалмазов и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс	36
2.1.3. Распределение наночастиц ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс по размерам в водных дисперсиях и в бедной тромбоцитами плазме	36
2.2. Исследование биологической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс <i>in vitro</i>	37
2.2.1. Пробоподготовка для исследования гемосовместимости ДНА–Докс и ДНА–Диокс	37
2.2.1.1. Исследование АДФ-, адреналин-, и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов	38
2.2.1.2. Плазмо-коагуляционный гемостаз	38
2.2.1.3. Спонтанный гемолиз эритроцитов	40
2.2.1.4. Связывание с человеческим сывороточным альбумином	41
2.3. Изучение влияния ДНА–Докс и ДНА–Диокс на функцию митохондрий	41
2.3.1. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F_1F_0 <i>E. coli</i> (штамм DK-8)	41
2.3.2. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$)	43
2.4. Исследование цитотоксической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс <i>in vitro</i>	44
2.4.1. МТТ-тест	44

2.4.2.	Изучение механизмов эндоцитоза ДНА–Докс и ДНА–Диокс на модели клеточной линии карциномы шейки матки HeLa	45
2.4.3.	Статистический анализ	46
Глава 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	47
3.1.	Твердотельная ¹³ C ЯМР спектроскопия	47
3.2.	Структурная характеристика ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс	49
3.3.	Распределение наночастиц ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в воде и бедной тромбоцитами плазме человека	50
3.4.	Исследование гемосовместимости ДНА–Докс и ДНА–Диокс	52
3.4.1.	Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на индуцированную агрегацию тромбоцитов	52
3.4.2.	Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на показатели плазмо-коагуляционного гемостаза	54
3.4.3.	Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на спонтанный гемолиз эритроцитов	56
3.4.4.	Исследование связывания ДНА–Докс и ДНА–Диокс с человеческим сывороточным альбумином	56
3.5.	Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на функцию митохондрий	59
3.5.1.	Влияние ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F ₁ F ₀ <i>E. coli</i>	59
3.5.2.	Влияние ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс на митохондриальный мембранный потенциал (ΔΨ _m)	62
3.6.	Изучение цитотоксической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс на клеточных линиях аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, глиобластомы T98G и карциномы шейки матки HeLa	63
3.6.1.	Результаты МТТ-теста	63
3.6.2.	Исследование механизмов эндоцитоза ДНА–Докс и ДНА–Диокс на модели клеточной линии карциномы шейки матки HeLa	67
	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	70
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
	ВЫВОДЫ	84
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	85
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	86
	БЛАГОДАРНОСТИ	104

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ	биологически активные вещества
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
Диокс	Диоксадэт
ДНА	наноалмазы детонационного синтеза
ДНА–Диокс	конъюгат диоксадэта с наноалмазами детонационного синтеза
ДНА–Докс	конъюгат доксорубицина с наноалмазами детонационного синтеза
Докс	Доксорубицин
ЛВ	лекарственное вещество
ЛП	лекарственный препарат
МЛУ	множественная лекарственная устойчивость
МПД	максимально переносимая доза
НА	Наноалмазы
ФС	фармацевтическая субстанция
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ЧСА	человеческий сывороточный альбумин
СССР	(2-[2-(3-хлорфенил)гидразинилиден]пропандинитрил)
ФССР	карбонилцианид- <i>n</i> -трифторметоксифенилгидразон
EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	рецептор эпидермального фактора роста
EPR (Enhanced Permeation and Retention Effect)	эффект повышенной проницаемости и удерживания
P–gp	P- гликопротеин
РТХ	паклитаксел

ВВЕДЕНИЕ

Со времени открытия детонационных наноалмазов (ДНА) – частиц углерода размером 4–6 нм – прошло более 50 лет [1]. В последнее десятилетие наблюдается возрождение интереса к ДНА, связанное с поиском путей их практического применения [2].

Возможность использования детонационных наноалмазов в биомедицине обусловлена наличием у них определенных свойств, а именно: наноалмазы обладают большой удельной площадью поверхности, стабильной флуоресценцией, биосовместимостью, способностью к адсорбции или конъюгированию с лекарственными веществами [3, 4].

Также существует возможность стандартизации и унификации промышленно выпускаемых детонационных наноалмазов [5]. Наличие различных функциональных групп на поверхности ДНА обеспечивает возможность присоединения различных молекул, которые в свою очередь могут выполнять роль терапевтических агентов [6, 129].

Наночастицы для создания лекарственных препаратов должны быть биосовместимы (отсутствие иммунного ответа при контакте с клетками и тканями живого организма) и способны к биодegradации (растворимость) [7].

Низкая стоимость, химическая инертность и способность преодолевать лекарственную устойчивость позволяют рассматривать возможность применения ДНА в качестве носителя в системах доставки цитостатиков [8, 154].

В экспериментах *ex vivo* установлено, что ДНА выводятся из органов животных в течение месяца [9]. Данное свойство является преимуществом, позволяющим бороться с множественной лекарственной устойчивостью путем создания на основе ДНА пролонгированных противоопухолевых лекарственных форм [10,11,12].

В настоящее время проведен целый ряд экспериментальных исследований, результаты которых свидетельствуют о повышении эффективности и снижении токсичности противоопухолевых лекарственных средств в результате

конъюгирования с ДНА. Чаще всего модифицируют антибиотик антрациклинового ряда Доксорубин (Докс), поскольку он остаётся одним из наиболее эффективных и широко применяемых химиотерапевтических препаратов [8, 13, 83].

Вместе с тем Докс обладает выраженной кардиотоксичностью и способствует развитию химиорезистентности [14, 15].

Развитие резистентности к терапии обуславливает актуальность поиска химических веществ с цитостатическими свойствами. Сложности с разработкой новых противоопухолевых средств заставляют исследователей возвращаться к препаратам, полученным ранее [16].

Перспективным противоопухолевым агентом представляется отечественный препарат Диоксадэт (Диокс), который является производным симметричного триазина и относится к группе алкилирующих соединений – этилениминов. Диокс, синтезированный и прошедший доклиническое и клиническое изучение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» МЗ РФ в 1986 году, продемонстрировал свою противоопухолевую эффективность у пациентов с распространенными формами злокачественных новообразований различных локализаций [17]. Диокс является веществом с амфифильными свойствами, что позволяет вводить препарат в масляных и в водных растворах, обладает контактной противоопухолевой активностью.

Существенным побочным эффектом применения Диокс в терапевтическом режиме является миелосупрессия [17].

Представляет интерес получение конъюгата на основе ДНА и фармацевтической субстанции лекарственного препарата диоксадэт (5-((4,6-ди(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)амино)-2,2-диэтил-1,3-диоксан-5-ил)метанол) (нанодиоксадэт)) для исследования биологической активности модифицированной нано формы диоксадэта.

На сегодняшний день достаточно хорошо изучен молекулярно-клеточный механизм действия системы доставки Докс в комплексе с ДНА, что позволяет

использовать Докс в качестве цитостатика сравнения при изучении биологических свойств Диокс в составе конъюгатов с ДНА [14,18].

Степень разработанности научной проблемы

Ряд работ посвящен адсорбционной иммобилизации Докс (в виде гидрохлорида) на поверхности ДНА [19] Установлено, что адсорбция Докс на ДНА позволяет повысить его эффективность по отношению к опухолям печени (LT2-Мус) и молочной железы (4Т1) мышей линии BALB/с в эксперименте *in vivo* [20].

Показано, что адсорбция Докс на ДНА возможна только при высоких значениях рН. При создании такого комплекса отмечалось снижение токсического действия антибиотика и увеличение его специфической активности [20].

При изучении эффективности лекарственной формы на основе ДНА, содержащей два химиотерапевтических агента (Докс и противомаларийное средство маляридин, являющееся ингибитором Р - гликопротеина (Pgp)) было установлено, что такой комплекс препятствует развитию резистентности опухоли к нескольким цитостатикам [21].

Докс и *транс*-ретиноевая кислота, адсорбированные на поверхности ДНА, демонстрируют более выраженный противоопухолевый эффект, чем ЛВ в отсутствие носителя [22]

В работе [23] авторы исследовали механизм связывания Докс и НА–Докс тромбоцитами. Было установлено, что тромбоциты являются эффективными носителями противоопухолевых нано препаратов за счет большой грузочной способности, хорошей переносимости лекарственного препарата, стабильного удержания конъюгатов, длительной циркуляции комплекса в крови и отсутствия воздействия на здоровые ткани, что приводит к повышению терапевтического эффекта и снижению побочного действия Докс.

В литературе имеется значительное число публикаций по ковалентной прививке противоопухолевых препаратов, в том числе Докс, на поверхность ДНА.

В работе [23] авторами в результате ковалентной прививки был получен комплекс Докс и фолиевой кислоты с наноалмазами. Было установлено, что такие частицы взаимодействуют с фолатными рецепторами опухолевых клеток, вызывая их гибель, и могут быть успешно использованы в качестве наноконтейнеров для доставки противоопухолевого препарата.

Предпринимались попытки получения и наноформ Диокс. Так, с целью изучения новых возможностей применения цитостатика «Диоксадэт» в научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ в Санкт-Петербурге был разработан инновационный противоопухолевый препарат на основе монодисперсных сферических нанопористых частиц кремнезема и фармацевтической субстанции (5-((4,6-ди(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)амино)-2,2-диэтил-1,3-диоксан-5-ил)метанол) (Нанодиоксадэт).

Противоопухолевая активность нанодиоксадэта была изучена на модели канцероматоза брюшной полости у крыс с перевиваемым раком яичника. Было показано, что максимально переносимая доза (МПД) нанодиоксадэта в 10 – 20 раз выше, чем у субстанции, что позволяет вводить наноформу в более высоких дозах и получать противоопухолевый эффект, значительно превышающий действие субстанции, вводимой в МПД. На модели канцероматоза брюшной полости у крыс с перевиваемым раком яичника противоопухолевое действие нанодиоксадэта в 2 -3 раза выше, чем у субстанции, причем с помощью нанодиоксадэта удастся полностью вылечить 23-30 % животных, чего не наблюдается при лечении субстанцией.

Нанодиоксадэт, вводимый однократно в МПД, практически не угнетает кроветворение, тогда как исходная фармацевтическая субстанции, вводимая однократно в МПД, статистически значимо снижала число лейкоцитов периферической крови на 40-70 % (данные были представлены в докладе

заведующего лабораторией химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ профессора Беспалова В.Г. «Отечественный противоопухолевый препарат «Диоксадэт» в наноформах - увеличение противоопухолевой активности и снижение токсичности» на научном семинаре кафедры общей и биоорганической химии и кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ имени акад. И.П. Павлова» МЗ РФ 31 октября 2019 года).

Перспективные результаты по изучению противоопухолевой активности нанодиоксадэта послужили основанием для создания нано формы Диокс на основе ДНА.

Цель исследования: сравнить биологические свойства противоопухолевых препаратов с различным механизмом действия (доксорубицин и диоксадэт) в составе конъюгатов с наноалмазами детонационного синтеза *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Оценить гемосовместимые свойства ДНА–Докс и ДНА–Диокс (влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на агрегацию тромбоцитов, показатели плазмокоагуляционного гемостаза, связывание с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), спонтанный гемолиз эритроцитов);

2. Исследовать влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli* и митохондриальный мембранный потенциал;

3. Сравнить цитотоксические свойства ДНА–Докс и ДНА–Диокс на клеточных линиях аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, глиобластомы T98G и карциномы шейки матки HeLa;

4. Определить механизмы поступления ДНА–Докс и ДНА–Диокс в клетки с помощью ингибиторов эндоцитоза на модели клеточной линии карциномы шейки матки HeLa.

Научная новизна

Данная работа является первым систематическим исследованием биосовместимости конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс для сравнения их свойств.

Установлено, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс не оказывают воздействия на плазмо-коагуляционный гемостаз, функциональную активность тромбоцитов и мембрану эритроцитов, а также способны связываться с ЧСА, поскольку обладают хорошей гемосовместимостью.

При изучении влияния ДНА–Докс и ДНА–Диокс на функцию митохондрий, а именно: на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli* (модель - протеолипосомы) и величину мембранного митохондриального потенциала (модель - культура клеток РАНС-1) установлено, что эффект конъюгатов обусловлен присутствием ДНА в их составе. Показано, что ДНА–Докс по сравнению с ДНА–Диокс статистически значимо снижал митохондриальный мембранный потенциал, что, по-видимому, обусловлено ингибирующим эффектом ДНА на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli* в совокупности с Докс-зависимой генерацией активных форм кислорода.

На клеточной модели глиобластомы линии Т98G показано, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс демонстрируют большую цитотоксичность при меньшей концентрации Докс и Диокс в составе конъюгатов по сравнению с индивидуальными препаратами; при этом цитотоксический эффект ДНА–Диокс статистически значимо превосходил ДНА–Докс при всех изученных концентрациях.

Получены данные о том, что интернализация ДНА–Докс и ДНА–Диокс в клетки HeLa осуществляется преимущественно с помощью актин-зависимого механизма, а для ДНА–Докс также возможен и клатрин-зависимый путь эндоцитоза.

Большинство из приведенных в работе результатов были получены и описаны впервые.

Теоретическая и практическая значимость

В настоящем исследовании получены данные, что ДНА–Диокс по сравнению с ДНА–Докс обладает максимальной цитотоксичностью по отношению к клеткам глиобластомы T98G. Большая цитотоксичность при меньшей концентрации Диокс в составе конъюгата по сравнению с индивидуальным препаратом делает перспективным дальнейшие исследования специфической противоопухолевой активности и острой токсичности ДНА–Диокс в моделях глиобластомы *in vivo*.

Понимание роли митохондриальной дисфункции определяет возможность использования митохондрий как мишеней при различного рода воздействиях, что может служить биохимической основой для разработки новых противоопухолевых средств. Установлено, что карбоксилированные ДНА оказывают ингибирующий эффект на активность АТФазы. Обнаружена способность Докс снижать уровень мембранного потенциала (модель - культура клеток РАНС-1), не оказывая при этом влияния на активность АТФазы (модель – протеолипосомы). Показано, что ДНА–Диокс в отличие от ДНА–Докс не влияет на митохондрии.

Установлено, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс поступают в клетки HeLa преимущественно с помощью неспецифического актин-зависимого механизма, а для ДНА–Докс возможен еще и клатрин-зависимый путь эндоцитоза, что позволяет в дальнейшем рассматривать возможность использования данных конъюгатов для интратуморального введения.

Методология и методы исследования

Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на показатели тромбоцитарного и плазмо-коагуляционного звена гемостаза оценивали с помощью турбидиметрического и оптико-механического методов. Воздействие ДНА–Докс и ДНА–Диокс на функцию митохондрий, а именно (АТФазную активность $F_1F_0 E$.

coli и митохондриальный мембранный потенциал) и связывание ДНА–Докс и ДНА–Диокс с ЧСА исследовали с помощью метода спектрофлуоресценции. Для оценки влияния ДНА–Докс и ДНА–Диокс на мембрану эритроцитов, а также для изучения цитотоксических свойств ДНА–Докс и ДНА–Диокс на клеточных линиях аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, глиобластомы T98G и карциномы шейки матки HeLa и механизмов поступления ДНА–Докс и ДНА–Диокс в клетки с помощью ингибиторов эндоцитоза применяли метод спектрофотометрии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Отсутствие влияния конъюгатов на плазмо-коагуляционный гемостаз, функциональную активность тромбоцитов и мембрану эритроцитов, а также высокое сродство ДНА к альбумину определяют хорошую гемосовместимость ДНА–Докс и ДНА–Диокс.
2. Эффект действия ДНА–Докс и ДНА–Диокс на митохондрии связан с присутствием ДНА в составе конъюгатов.
3. Цитотоксические свойства ДНА–Диокс по отношению к клеткам глиобластомы T98G обеспечивают его преимущество по сравнению с ДНА–Докс для дальнейшего изучения.
4. ДНА–Диокс интернализируется в клетки HeLa преимущественно посредством неспецифического актин-зависимого механизма, а для ДНА–Докс возможны актин- и клатрин-зависимые пути эндоцитоза.

Апробация работы

Основные материалы диссертации представлены в 9 публикациях, среди которых 1 статья в журнале, индексируемом в международных базах цитирования (Scopus и Web of Science), 2 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК, а также 6 тезисов докладов, представленных на международных конференциях.

Результаты диссертации доложены на конференциях: VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019», Санкт-Петербург, 2019; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине», Санкт-Петербург, 3 декабря 2020; XXVI Всероссийская конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2020», Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020; XXVII Всероссийская конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021», Санкт-Петербург, 25-26 марта 2021; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева», Рязань, 26-27 января 2022 г.

Апробация диссертации была проведена на заседании кафедры биологической химии (протокол № 4 от 30.03.2022) и Проблемной комиссии №11 Патология с секцией биологических наук ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ (протокол № 4 от 13.04.2022).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта «Новые композиционные материалы на основе наноалмазов с цитостатиками для лечения онкологических заболеваний: физико-химические и биохимические свойства, цитостатическая активность и биосовместимость» № 20-315-90116.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 104 страницах, содержит 12 таблиц и 18 рисунков. Список литературы включает 156 ссылок.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

Достоверность научных результатов

Воспроизводимость используемых методов исследования подтверждает достоверность научных результатов. Аргументы и выводы, основанные на полученных результатах, совпадают с результатами независимых исследований в литературе.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

На сегодняшний день существует более 400 видов наночастиц, потенциально пригодных для использования в системах доставки ЛП, однако практическое применение в медицине получили лишь липосомы, и, в меньшей степени, дендримеры и нанокристаллы [24]

Среди наноматериалов для биомедицинского применения исследователи уделяют повышенное внимание углеродным наноструктурам, и, в частности, наноалмазам [25].

Уникальные физико-химические свойства ДНА, а именно: высокая удельная площадь ($250 - 350 \text{ м}^2 / \text{г}$), размер частиц (4-6 нм), химически инертное кристаллическое ядро и возможность направленной модификации поверхности для ковалентной или адсорбционной иммобилизации биологически активных веществ (БАВ) и ЛВ, а также относительно низкая стоимость их производства делают ДНА перспективным объектом для использования в системах доставки [26,27].

1.1. Наноалмазы детонационного синтеза

1.1.1. Визуализация наноалмазов в клетке

Наноалмазы обладают фотолюминесценцией, обусловленной дефектами в структуре кристаллической решетки. Эти дефекты формируют локализованные возбужденные состояния при поглощении квантов света в видимом диапазоне [28, 29].

Были разработаны и запатентованы способы визуализации ДНА – использование собственной или приобретенной люминесценции, введение на поверхность ДНА радиоактивной (триций) или рентгеноконтрастной (3,4,6-трийодбензиловый спирт) меток [30].

Показано, что использование наноалмаза с тритиевой меткой возможно в любых экспериментах *in vitro* и *ex vivo*. На сегодняшний день этот метод визуализации ДНА является лучшим по своим характеристикам [31].

Установлено, что частицы ДНА в клетке образуют цепочечные агрегаты, свободно расположенные в цитоплазме. При короткой инкубации ДНА не проникают в ядро или митохондрии, однако через 24 ч частицы ДНА были обнаружены в ядре, что может быть связано с митозом клетки [32].

Zurbuchen и соавт. продемонстрировали технику субклеточной мультимодальной визуализации (с помощью оптической и электронной микроскопии), которая облегчает локализацию наноалмазов, имеющих флуоресцентные центры. Благодаря флуоресцентным свойствам наноалмазов показана возможность их использования в качестве агентов для диагностики заболеваний нервной системы [33].

1.1.2. Цитотоксичность наноалмазов детонационного синтеза

Данные о токсичности ДНА *in vitro* и *in vivo* неоднозначны и зависят от степени очистки ДНА, функционального состава поверхности, размеров частиц и других характеристик.

Цитотоксичность ДНА изучали на линиях нормальных и опухолевых клеток, а именно: клетках аденокарциномы легких человека [34]; клетках HeLa (карцинома шейки матки человека) [35]; кератиноцитах [36]; клетках нейробластомы [36]; клетках РС-12 [36]; фибробластах легких [34]; эмбриональных фибробластах [37]; клетках почек человека [38]; остеопрогениторных клетках [37]; макрофагах [36]; нейтрофилах [39].

В целом не отмечалось влияние ДНА на жизнеспособность клеток, целостность их мембран, а также отсутствовала активация внутриклеточного окислительного стресса, характерного для фуллеренов и нанотрубок. Однако в литературе есть данные [10], что ДНА обладают существенной цитотоксичностью по отношению к клеткам эндотелия.

В единственной работе [40] была изучена острая токсичность ДНА и определено значение LD_{50} (мыши, per os), составившее более 7,5 г/кг.

1.1.3. Биораспределение наноалмазов детонационного синтеза в организме животных

В ряде работ были определены основные органы накопления и пути выведения ДНА из организма экспериментальных животных. Так, Zhang et al [41] с помощью радиоактивного изотопа ^{188}Re было установлено, что у мышей при интрахеальном введении, ДНА с размером частиц 2 – 8 нм распределяются в селезенке, печени, костях и сердце при максимальном накоплении в легких после 48 часов наблюдения.

При интрахеальном введении мышам ДНА с размером 5 нм в течение 28 суток исследователями не были обнаружены какие-либо признаки повреждения легочной ткани. По мнению авторов, выведение ДНА из легких связано с поглощением их альвеолярными макрофагами с последующим клиренсом в трахею, а затем в глотку [42].

Аналогичные результаты были получены при изучении гистологического строения сердца, легких, печени и почек кроликов после однократного внутривенного введения 5 мл 1% раствора ДНА в 5% растворе глюкозы. Через 15 минут конгломераты наночастиц в наибольшем количестве визуализировались в капиллярах легких, несколько реже – в капиллярах печеночных долек, наименьшее количество наночастиц – в капиллярах почек.

В сосудистом русле миокарда конгломераты наночастиц не визуализировались [43].

Можно предположить, что наноалмазы, попав в кровеносное русло, теряют свою коллоидную устойчивость, агрегируя между собой и формируют крупные, видимые с помощью световой микроскопии, конгломераты, которые в той или иной степени задерживаются капиллярной сетью легких. Отсутствие

конгломератов ДНА в сосудах сердца и наличие их в синусоидных капиллярах печени и сосудистом клубочке почечных телец обусловлено присутствием макрофагов – клеток Купфера в печеночных дольках и мезангиоцитов почечных телец. Необходимо учитывать роль и альвеолярных макрофагов легких в биораспределении ДНА в организме экспериментальных животных [43].

Выводятся ДНА из всех органов практически в течение месяца, что делает возможным их использование в биофармацевтической практике для разработки пролонгированных лекарственных форм. Чрезвычайно важным является тот факт, что ДНА способны проникать в мозг, преодолевая гематоэнцефалический барьер [30].

При изучении биораспределения [³H]-ДНА *ex vivo* в организме крыс от 15 мин до 24 ч при введении в бедренную вену также были получены данные о максимальном накоплении ДНА в легких, а следующим органом по количеству накопленного ДНА стала селезенка. Фармакокинетическая кривая накопления ДНА в крови свидетельствует о постепенном снижении их концентрации с течением времени. По мнению авторов, ДНА выводятся через желудочно-кишечный тракт, в который они поступают уже через 30 мин и где их концентрация постепенно увеличивается в течение 24 ч в 4 раза – с 0,05 до 0,2 %/г [44].

Таким образом, ДНА при попадании в кровь могут захватываться макрофагами и выводиться из кровеносного русла в органы ретикуло-эндотелиальной системы (печень, легкие, селезенка). Возможность длительной циркуляции в крови определяют размер, заряд и морфология поверхности ДНА.

Надо отметить, что биораспределение ДНА *in vivo* и влияние ДНА на органы и ткани экспериментальных животных изучены только в норме.

1.2. Доксорубин и диоксадэт в качестве противоопухолевых агентов

1.2.1. Доксорубин

Докс (адриамицин) является антибиотиком антрациклинового ряда. Природные антрациклины продуцируются микроорганизмами *Streptomyces coeruleorubidus*, *Streptomyces peucetius*, *Actinomadura carminata* и др. Докс был впервые выделен из культуры актиномицетов *Streptomyces peucetius var. Caesius* в ходе исследований компании Farmitalia Research Laboratories (Милан, Италия) в начале 1960-х годов [45].

Докс в качестве монотерапии или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами остается терапией первой линии различных видов солидных опухолей: рака предстательной железы, рака яичников, рака молочной железы, в том числе метастатического, мочевого пузыря и легких, саркомы Капоши (саркома мягких тканей) и др. Кроме того, Докс широко используется для лечения опухолей у детей (например, нефробластома), лейкозов, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы и других видов злокачественных новообразований [46].

Антрациклиновые антибиотики с химической точки зрения являются гликозидами, агликоновый остаток которых представляет собой замещенный тетрагидронафтаценхинон (антрациклинон), а углеводный - аминосахар, как правило, даунозамин (Рисунок 1). Благодаря такому строению антрациклины имеют характерный желтый или красный цвет [47].

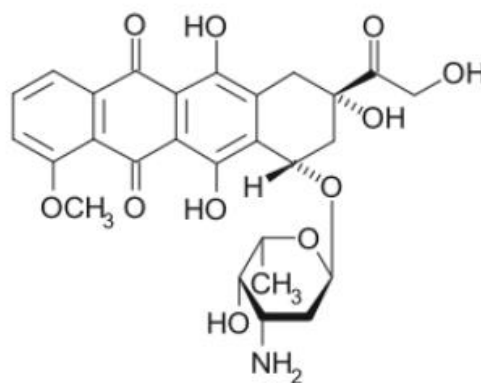


Рисунок 1. Химическая структура доксорубина

Для увеличения растворимости в воде аминогруппу гликозидной части молекулы протонируют путем образования доксорубина гидрохлорида. Молекула Доксо является амфотерной (кислотные фенольные группы и основные группы даунозамина) и амфифильной (ядро антрахинона – липофильная часть; даунозамин – гидрофильная часть). Такие свойства Докс обеспечивают связывание молекулы с клеточными мембранами и белками.

Установлено, что Докс проникает в опухолевые клетки путем простой диффузии, затем в цитоплазме связывается с протеасомой. Образованный комплекс транслицируется через ядерные поры в ядро и после диссоциации комплекса Докс встраивается (интеркалирует) в ДНК [48, 49].

Несмотря на широкое клиническое применение, механизмы цитотоксического действия антрациклинов на опухолевые клетки окончательно не установлены.

К наиболее изученным механизмам относятся интеркаляция антрациклинов в ДНК, ингибирование топоизомеразы II и последующий запуск апоптоза, генерация свободных радикалов, активация p53 и запуск апоптоза, влияние на активность хеликазы [50, 51, 47].

Докс и в настоящее время применяется в качестве химиотерапии первой линии целого ряда онкологических заболеваний. Попытки снизить кардиотоксичность Докс привели к синтезу большого количества его аналогов, но только некоторые из них (идарубицин, эпирубицин и негликозидный аналог митоксантрон) нашли практическое применение. На сегодняшний день активно продолжаются экспериментальные исследования, целью которых является поиск путей повышения эффективности лечения онкологических заболеваний за счёт использования Докс в сочетании с ДНА в качестве носителя.

1.2.2. Диоксадэт

Перспективным противоопухолевым препаратом для интраперитонеальной химиотерапии диссеминированного рака яичника (РЯ) является отечественный противоопухолевый лекарственный препарат диоксадэт. Фармацевтическая субстанция (ФС) лекарственного препарата диоксадэт (5-((4,6-ди(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)амино)-2,2-диэтил-1,3-диоксан-5-ил)метанол) представляет собой производное симметричного триазина и относится к группе алкилирующих соединений – этилениминов (Рисунок 2).

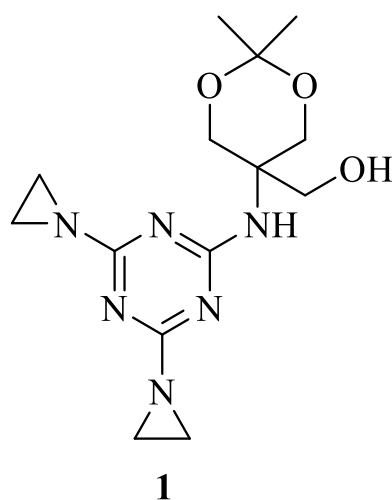


Рисунок 2. Химическая структура фармацевтической субстанции диоксадэт

Преимуществами данного вещества являются его амфифильность, которая позволяет вводить препарат в масляных и в водных растворах, а также наличие выраженного контактного противоопухолевого действия, а его местное и системное токсическое действие значительно меньше, чем у препаратов на основе координационных соединений платины [52].

Выраженный противоопухолевый эффект Диокс демонстрировал в экспериментах *in vitro* на моделях клеточных линий глиобластомы [53].

В работах [54, 55] был проведен сравнительный анализ противоопухолевой активности Диокс, цисплатина и их комбинации на модели асцитной опухоли яичника у крыс-самок линии Вистар. Противоопухолевая активность тестируемых

препаратов оценивалась по увеличению продолжительности жизни животных. Было показано, что Диокс и цисплатин проявили сопоставимую противоопухолевую активность, увеличив продолжительность жизни животных на 63,1 % и 48,1% соответственно. При этом отмечалось синергическое противоопухолевое действие тестируемых соединений при меньшей токсичности и лучшей переносимости по сравнению с цисплатином [54]. Подобные результаты были получены при изучении противоопухолевого действия комбинации гемцитабина и Диокс на моделях мышей с асцитической опухолью Эрлиха. Была отмечена более высокая противоопухолевая активность при использовании комбинации препаратов на фоне отсутствия повышения токсичности, что выражалось в достоверно большем увеличении времени появления асцита и увеличением медианы выживаемости [56]. В экспериментах по изучению увеличения противоопухолевой активности региональной гипертермической интраперитонеальной химиотерапии (НІРЕС) при комбинации с цитостатиками было показано, что применение Диокс статистически значимо увеличивает среднюю выживаемость животных по сравнению с цисплатином [57].

Эффективность Диокс была показана в рамках фрагментарных клинических испытаний, проведенных у пациентов с распространенными формами злокачественных новообразований различных локализаций: рак молочной железы, рак легкого немелкоклеточный, рак легкого мелкоклеточный, рак легкого недифференцированный, рак желудка, меланома кожи, рак почки, рак толстой кишки, рак шейки матки, рак печени, остеогенная саркома, саркомы мягких тканей, лимфогранулематоз, неходжкинские лимфомы, рак яичников [58]. Особенно сильным противоопухолевым эффектом Диокс оказался в лечении распространенных форм рака яичников и молочной железы, в том числе у больных с асцитом и ранее леченных другими алкилирующими агентами [58]. Дополнительно были проведены клинические испытания Диокс в качестве противоопухолевого средства для химиоэмболизации печеночной артерии у пациентов с первичным раком печени и метастазами в печень [59],

колоректального рака и при операбельных и распространенных формах рака почки [60]. Была показана эффективность проведения химиоэмболизации при использовании Диокс в виде достижения объективного противоопухолевого ответа и увеличения выживаемости больных [59, 60]. Результаты кооперированного клинического изучения Диокс во II фазе дают основание заключить, что, будучи примененным в разовых дозах 15 мг внутривенно струйно или внутривнутрибрюшинно с интервалами в 72–96 ч до суммарной дозы 90–120 мг, препарат является весьма эффективным для химиотерапии распространенных форм эпителиальных злокачественных опухолей яичника III–IV стадий, в том числе сопровождающихся асцитом. Дополнительно, была показана эффективность применения Диокс у пациентов, ранее получавших лечение другими алкилирующими агентами, в частности – тиофосфамидом. Диокс отличается меньшей токсичностью по сравнению с препаратами на основе координационных соединений платины (стандартом в лечении рака яичников) и в отличие от них не вызывает осложнений в виде спаечного процесса [58].

Существенным побочным эффектом применения Диокс в терапевтическом режиме является миелосупрессия [58], тогда как другие побочные эффекты не носят выраженного характера в отличие от других цитотоксических препаратов, которые даже при внутривнутрибрюшном введении оказывают гематотоксическое, ототоксическое, нейротоксическое и нефротоксическое действие [61]. При местном применении (внутрибрюшинном и внутривнутриплевральном) Диокс не оказывает склерозирующего действия, тогда как введение цисплатина приводит к осложнениям в виде спаечного процесса. Особенностью Диокс является то, что он в процессе биотрансформации не образует метаболитов, что важно для интраперитонеальной химиотерапии рака яичников [61].

Следует особенно отметить, что к настоящему времени, несмотря на клиническую апробацию Диокс, его механизм действия окончательно не установлен, как и его биосовместимость с организмами человека и животных.

Таким образом, изучение биологических свойств Диокс в составе конъюгата с ДНА является перспективным и своевременным.

1.3. Наноалмазы как носители противоопухолевых препаратов

Существует достаточно много экспериментальных исследований, где рассматриваются пути повышения эффективности лечения онкологических заболеваний за счёт использования химиопрепаратов в сочетании с ДНА [62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70].

Известно, что НА увеличивают растворимость противоопухолевых препаратов пурваланол А и 4-гидрокситамоксифен, используемых в терапии рака печени и рака молочной железы [71].

Было обнаружено, что изменение концентрации ионов в растворе позволяет изменять концентрации веществ, адсорбированных на поверхности НА. Так, в результате электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными ДНА (большое количество групп ОН и СООН на поверхности) и катионом Докс – NH_3^+ в присутствии NaCl был получен комплекс Докс – ДНА с содержанием Докс 10 масс%. Обнаружено, что при создании такого комплекса снижается токсичность Докс и увеличивается цитотоксический эффект в отношении клеток колоректального рака человека линии HT-29 [72].

Показано, что кластеры наноалмазов способны окружать противоопухолевые препараты (например, 7-этил-10-гидрокамптотecin), препятствуя их взаимодействию со здоровыми клетками. Такой подход позволяет большей части введенной дозы препарата достичь целевой области, увеличивая таргетность воздействия [73]. С этой же целью при получении комплекса НА с эпирубицином и моноклональными антителами к рецептору эпидермального фактора роста (Epidermal growth factor receptor, EGFR) использовали липиды для создания тонкой пленки на поверхности НА [74].

На примере опухоли молочной железы (4T1) мышей установлено, что Докс в составе конъюгатов с ДНА не вызывал такого значимого побочного эффекта

химиотерапии, как миелосупрессия. Все эти исследования показывают, что НА могут применяться в качестве носителя для длительного лечения Докс [20].

Zhang et al. разработали меченные флуоресцеином dT-нуклеотиды для загрузки паклитаксела (PTX) и моноклональных антител против EGFR для селективного нацеливания олиго-PTX на поверхность НА с гетеробифункциональным сшивающим агентом сульфосукцинимидил 6- (3'- [2-пиридилдитио]-пропионамидо) гексаноатом [76].

Было показано, что комплексная молекула PTX-DNA/mAb@ND в большей степени поглощается опухолевыми клетками линии MDA-MB-231 с гиперэкспрессией EGFR по сравнению с клетками линии MCF7, имеющих базальный уровень экспрессии EGFR.

Комплекс НА – цисплатин демонстрирует снижение токсических побочных эффектов в результате перераспределения цисплатина: в крови его концентрация уменьшается, а в цитоплазме при $pH < 7,4$ увеличивается за счет высвобождения цисплатина.

В отношении клеток рака шейки матки человека препарат, высвобождаемый из композита, сохраняет ту же цитотоксичность, что и свободный цисплатин [77].

Воздействие композита НА-PTX на клетки карциномы легких человека A549 при концентрации 0,1–50,0 мкг / мл в течение 24 ч дозозависимым образом снижало их жизнеспособность в результате остановки митоза и индукции апоптоза. Кроме того, на модели ксенотрансплантата рака легких у мышей с иммунодефицитом (SCID) было установлено, что НА-PTX заметно блокировал рост опухоли [64]. Alhaddad et al. синтезировали флуоресцентный вектор НА с двумя различными катионными покрытиями для доставки siRNA в клетки саркомы Юинга (EWS) [78]. Этот вектор обеспечил более высокую эффективность трансфекции, чем традиционный агент трансфекции липофектамин, за счет ингибирования экспрессии EWS-Flil в сочетании с более низкой токсичностью для клеток.

В работе [79] сообщалось о другом интересном исследовании, в котором использовалось EGFR-специфическое моноклональное антитело цетуксимаб (Cet) в качестве молекулы-мишени. Это антитело, пришитое на НА, доставляло РТХ в клетки рака толстой кишки человека *in vivo* (ксенотрансплантат у nude мышей). РТХ является ингибитором микротрубочек и его доставка в раковые клетки индуцирует митотическую катастрофу и снижение роста опухоли. Также воздействие комплекса НА-РТХ-Cet вызвало митотическую катастрофу в культуре клеток колоректального рака (CRC) человека линий HCT116, SW620 и RKO. Это исследование предполагает, что совместная доставка РТХ и Cet с помощью НА усиливает эффекты митотической катастрофы и апоптоза *in vitro* и *in vivo* [79].

Антрациклины (в частности, Докс, даунорубицин и эпирубицин) чаще других противоопухолевых препаратов пришивают на поверхность НА. В ряде исследований было показано, что связывание антрациклинов с НА значительно снижает эффективную дозировку цитостатиков, и, следовательно, уменьшает побочные эффекты [80, 14].

Поскольку антрациклины вызывают серьезные побочные эффекты, необходимо предотвратить преждевременное высвобождение препаратов с поверхности НА до поступления в опухолевую клетку [80]. Особенно важна стабильность комплекса после контакта с белками сыворотки крови, поскольку высвобождение препарата в кровь может вызвать вышеупомянутую токсичность, аналогичную свободному препарату. Wang et al. [80] изучали высвобождение эпирубина с поверхности НА после воздействия белков сыворотки крови при физиологическом pH. Авторы не обнаружили эпирубицин в сыворотке в течение шести часов после введения. После того, как раковые клетки интернализировали комплексы, кислая внутриклеточная среда вместе с внутриклеточными белками способствовала высвобождению препарата из наноалмазного ядра.

Нельзя не учитывать влияние комплексов ЛВ и НА на клетки крови при их системном введении. Несмотря на то, что связывание НА с белками обеспечивает

защиту комплексов от поглощения макрофагами, возможно их взаимодействие с эритроцитами [81] или гранулоцитами [82]. В работе Madamsetty VS et al. [83] было показано, что НА-ПЭГ-Докс не оказывал токсического действия на макрофаги клеточной линии лейкемии PLB-985. Вместе с тем необходимо отметить, что влияние НА-ПЭГ-Докс на макрофаги *in vitro* может отличаться от ситуации *in vivo*, учитывая возможность развития ПЭГ-опосредованной гиперчувствительности [84]. Křivohlavá et al. [82] был использован альтернативный подход: исследуемый комплекс содержал наноалмазное ядро, полиэтиленимин, интерферирующую РНК и трансферрин в качестве опухолеспецифического маркера. Авторы показали эффективное накопление нагруженного носителя в опухоли после системного введения с последующим специфическим нокдауном онкогенной микроРНК-135b в опухолевых клетках. Наноалмаз-опосредованные побочные эффекты оценивали *ex vivo* в аспиратах клеток периферической крови и перитонеальных макрофагов. После системного применения также были протестированы образцы плазмы и ткани. В итоге авторы не выявили какой-либо значимой токсичности в отношении макрофагов, но отметили возможность взаимодействия данного комплекса с гранулоцитами и спленоцитами [82].

Примечательно, что наноалмазы как носители лекарств были использованы в качестве одного из подходов фенотипической персонализированной медицины (PPM-DD). Эта платформа фокусируется на разработке фармпрепаратов без риска для здоровья человека благодаря систематическому рациональному проектированию оптимальных терапевтических комбинаций лекарств и включает в себя как традиционные методы, так и нанотехнологии [85].

1.3.1. Механизмы противоопухолевой лекарственной устойчивости

Оптимизация современных подходов к лечению определяет необходимость их пересмотра с целью предотвращения формирования лекарственной устойчивости злокачественных опухолей.

МЛУ (множественная лекарственная устойчивость) к химиотерапевтическим препаратам может предшествовать лечению (предсуществующая МЛУ), а также возникать в результате лекарственной терапии (индуцированная МЛУ). Механизмы лекарственной устойчивости обусловлены наличием в опухоли резистентных популяций клеток стволовых клеток опухоли [86], усилением выброса препарата из клетки [87], инактивацией препарата, мутацией лекарственной мишени, усиленным восстановлением повреждений ДНК [88], ингибированием механизма апоптоза [89], эпителиально-мезенхимальный переходом [90]. Вклад микроокружения опухоли, особенно стромальных клеток, также чрезвычайно важен в развитии МЛУ [91].

В последнее время для борьбы с МЛУ все больше внимания ученые уделяют наноматериалам благодаря их свойствам обеспечивать целенаправленную, контролируемую и эффективную доставку и высвобождение лекарства в клетках-мишенях.

1.3.2. Роль наноалмазов детонационного синтеза в преодолении лекарственной устойчивости злокачественных опухолей

Способность ДНА препятствовать развитию МЛУ обусловлена наличием у них уникальных свойств.

Известно, что большое количество противоопухолевых препаратов разных классов, включая новые таргетные препараты (ингибиторы киназ), выводится из клеток АВС-транспортерами (АТР binding cassette)). Наноалмазы удерживают ЛП в клетках-мишенях, поскольку эти белки не могут распознавать и переносить усеченную октаэдрическую структуру наноалмазов [20]. Благодаря этому комплексы носитель-препарат остаются внутри клеток. Задерживаясь в клетке,

наноалмазно-лекарственный комплекс попадает в кислую внутриклеточную среду, что способствует высвобождению препарата из носителя. Накопление и высвобождение препарата внутри раковых клеток уменьшает побочные эффекты лекарств на окружающие ткани [11]. Так, Wang et al. [80] в своей работе изучали свойства эпирубицина, связанного с 5 нм наноалмазными ядрами. Этот комплекс эффективно нацеливался не только на опухолевые, но и на раковые стволовые клетки, что предотвращало образование вторичных опухолей в модели ксенотрансплантата рака печени. Важно отметить, что в составе комплекса с наноалмазами эпирубицин может быть использован при максимальной концентрации, соответствующей смертельной дозе. Это означает, что разработанная формула препарата в перспективе может применяться у пациентов, которые не могли переносить обычный свободный препарат из-за его токсических побочных эффектов.

Отток препарата из опухолевых клеток также может быть предотвращен путем использования специального пептида – сигнала локализации в митохондриях (MLS, mitochondria localization signal) [91]. Chan MS et al использовали ПЭГилированные флуоресцентные наноалмазы, нагруженные Докс, которые были одновременно покрыты структурами, нацеленными на раковые клетки (фолиевой кислотой) и митохондрии (пептиды MLS). После выхода из эндосом пептид MLS облегчал транспортировку терапевтического комплекса непосредственно в митохондрии, где Докс индуцировал запрограммированную гибель клеток.

Установлено, что для предотвращения развития МЛУ большое значение имеет размер наноалмазов. Парадоксальным образом даже контролируемая агрегация комплексов на основе наноалмазов играет положительную роль в борьбе с МЛУ. Конечный размер комплекса, содержащего наноалмазное ядро и лекарственное средство, обычно превышает пределы почечного клиренса, и нагруженные наноалмазы циркулируют в периферической крови в течение длительного времени, что способствует накоплению терапевтических комплексов

в опухоли за счет эффекта усиленного проникновения и удержания (EPR-эффект от англ. Enhanced permeability and retention effect), что приводит к постоянному воздействию препарата на опухоль [20].

Эта гипотеза нашла своё подтверждение в работе Чанг и др. [97] Эти авторы впервые доказали, что самоагрегация детонационных наноалмазных частиц в значительной степени способствовала повышению эффективности терапии лекарственно-устойчивых опухолей.

Было показано, что агрегаты детонационных наноалмазов с антрациклинами, размер которых достигал 80 нм в диаметре, увеличивают период полураспада препарата-носителя в 10 раз, что приводит к внутриопухолевой задержке препарата [97]. Аналогичные результаты были получены Toh et al. [65], которые обнаружили усиленное удержание митоксантрона, связанного с наноалмазом, химиорезистентными клетками рака молочной железы.

Большинство солидных опухолей имеют кровеносные сосуды с дефектным строением и обычно вырабатывают большое количество разнообразных факторов проницаемости сосудов, и поэтому сосуды опухоли проявляют повышенную проницаемость. Благодаря EPR молекулы размером более 40 kDa избирательно проникают из сосудов опухоли и накапливаются в опухолевой ткани, чего не происходит в нормальных тканях. Способность наноалмазов повышать внутриклеточные уровни активных форм кислорода и кальция (Ca^{2+}) приводит к усилению капиллярной проницаемости. Это явление может быть использовано в опухолях с низким EPR, которые демонстрируют уменьшение накопления лекарств. Наноалмазы стимулируют проникновение противоопухолевого препарата через сосудистый эндотелий и позволяют препарату достигать опухоли-мишени [93].

Установлено свойство наноалмазов в комплексе с антрациклинами изменять экспрессию белков-транспортёров, ответственных за отток лекарств из опухолевых клеток. В частности, наноалмазные ядра, связанные с Докс и ПЭГ, снижали экспрессию ABCG2, члена семейства транспортёров ABC [83].

Способность наноалмазов эффективно доставлять антрациклины в раковые клетки и преодолевать их немедленный отток является перспективным подходом доставки для лечения раковых стволовых клеток [65, 80].

Установлено, что наноалмазы, загруженные препаратом цитроптен, изменяли его антимитотическое действие. Цитроптен является природным соединением, обнаруженным в цитрусах, и обладает способностью стимулировать апоптоз раковых клеток. Также цитроптен в комплексе с наноалмазами, нарушает функцию актиновых нитей, участвующих в митозе [98]. Поэтому цитроптен-наноалмазные комплексы ингибировали пролиферацию быстро делящихся раковых клеток, при этом не оказывая токсического действия на здоровые ткани.

Снижение побочных токсичных эффектов путем связывания препаратов с наноалмазами обсуждалось выше в случае антрациклинов. Это может быть полезным терапевтическим подходом при быстро растущих опухолях, даже если конъюгирование не решает проблему существования покоящихся раковых стволовых клеток.

И, наконец, наноалмазы способны активировать противоопухолевый иммунитет. Yuan SJ et al. [14] опубликовали интересные данные в 2019 году. Объектом исследования стал тройной негативный рак молочной железы, который характеризуется, как правило, плохим прогнозом и развитием химиорезистентности. Поскольку иммуносупрессия играет важную роль в развитии этого вида рака, авторы исследовали изменения в опухолевой среде и смежных иммунологических параметрах. Было установлено, что комплекс наноалмазов с Докс и полиглицерином не стимулировал регуляцию P-gr или IL-6, которые оба действуют как медиаторы резистентности к Докс. Важно отметить, что применение комплексов на основе наноалмазов привело к снижению секреции гранулоцитарно-колониестимулирующего фактора, продуцируемого опухолью, и к снижению производства миелоидных супрессорных клеток (MDSC). MDSC - это миелоидные клетки, перепрограммированные опухолью для

подавления противоопухолевых иммунных реакций. Эта благоприятная среда привела к активации макрофагов, дендритных клеток и лимфоцитов, которые эффективно запускали противоопухолевый ответ [14]. Это исследование является одним из лучших, описывающих иммунологические аспекты применения наноалмазов на сегодняшний день.

В таблицах 1 и 2 представлены результаты исследования эффектов наноалмазов в комплексе с противоопухолевыми препаратами на линии опухолевых клеток с фенотипом МЛУ *in vitro* и *in vivo*.

Таблица 1. Результаты исследований влияния конъюгатов наноалмазов с противоопухолевыми препаратами на линии опухолевых клеток с фенотипом МЛУ *in vitro*

Автор	Опухоль/модель	Ядро НА (размер и заряд)	Конъюгат/размер	Эффект
[20]	Рак печени (Huh7, LTM2)	45 нм (динамическое рассеяние света)/17 мВ	НА–Докс	Снижение оттока Докс/регрессия опухоли
[76]	Различные солидные опухоли (HeLa, HepG2, MCF-7, CHO)	166 нм (динамическое рассеяние света)/-30 мВ	НА–ПЭГ–гидразин–фолиевая кислота–Докс/264 нм, (динамическое рассеяние света, гидродинамический параметр)	Внутриклеточное рН-активированное высвобождение препарата, быстрое накопление в раковых клетках
[79]	Рак толстой кишки (RKO, HCT116, SW620)	3-5 нм	НА–паклитаксел, НА–паклитаксел–цетуксимаб	Индукция гибели клеток, содержащих митохондрии
[80]	Рак печени (LT2-MYC)	11 нм/48 мВ (динамическое рассеяние света)	НА–эпирубицин/89 нм	Длительная задержка препарата
[14]	Рак молочной железы (4T1)	5 нм (динамическое рассеяние света)	Докс–полиглицерин/84нм	Препятствует иммуносупрессии
[76]	Рак молочной железы (MDA-MB-231)	50 нм/15 мВ (динамическое рассеяние света)	Флуоресцентный НА–олигопаклитаксел–анти ЭГФР (рецептор эпидермального фактора роста)	Специфическая доставка в раковые клетки
[83]	Протоковая карцинома поджелудочной железы	35 морских миль	НА–полиэтиленгликоль–Докс/76 нм	Повышение эффективности препарата и снижение побочных эффектов
[92]	DOX-RS рак	37 нм/-93 мВ	Флуоресцентный	Нацеливание на

Автор	Опухоль/модель	Ядро НА (размер и заряд)	Конъюгат/размер	Эффект
	молочной железы (MCF-7)		НА–ПЭГ–фолиевая кислота–Докс /279 нм	митохондрии, увеличение поглощения Докс
[65]	MTX-RS Рак молочной железы (MDA-MB-231)	23 нм (динамическое рассеяние света)/56 мВ	НА–Митоксантрон	Усиленный лекарственный рефлюкс
[93]	Первичные эндотелиальные клетки, MDA-MB-468	5 нм/-24 мВ	НА и Докс, ковалентно не связаны	Увеличение проницаемости сосудов при опухолях с низким ЭПР
[94]	Лейкоз ДНР-РС (K562)	51 нм (динамическое рассеяние света)	НД–Даунорубин/93 нм	Повышение эффективности препарата и снижение побочных эффектов
[95]	Рак желудка (BGC-823)	Нет данных	(НА–Сорафениб) липосомы/128 нм (динамическое рассеяние света)	Улучшение биодоступности препарата, снижение роста опухоли, подавление метастазирования

Таблица 2. Результаты исследований эффектов конъюгатов наноалмазов с противоопухолевыми препаратами *in vivo*

Автор	Тип рака	Ядро ND (размер и заряд)	Конъюгат/размер	Эффект
[20]	Рак печени (LTM2)	45 нм (динамическое рассеяние света)/17 мВ	НА–Докс	Снижение оттока Докс/регрессия опухоли
[96]	Рак печени (HepG2)	166 нм (динамическое рассеяние света)/-30 мВ	НА–полиэтиленгликоль–гидразин–фолиевая кислота–Докс/264 нм, -19 мВ (динамическое рассеяние света)	Специфическое накопление в опухоли, снижение роста опухоли, более низкая токсичность, чем у свободного Докс
[79]	Рак толстой кишки (RKO)	3-5 нм	НА–паклитаксел, НА–паклитаксел–цетуксимаб	Уменьшение размера опухоли
[74]	Рак молочной железы (MDA-MB-231)	60 нм (динамическое рассеяние света) /около нейтрального	Рецептор эпидермального фактора роста – (НА–эпирубин) липосомы	Полная регрессия опухоли
[80]	Мус-индуцированный рак печени	11 нм/48 мВ (динамическое рассеяние света)	НА–эпирубин/89 нм	Длительная задержка препарата

Автор	Тип рака	Ядро ND (размер и заряд)	Конъюгат/размер	Эффект
[14]	Рак молочной железы (4T1)	5 нм (динамическое рассеяние света)	Докс–полиглицерин/нет данных/84 нм	Препятствует развитию иммуносупрессии
[95]	Рак желудка (BGC-823)	Нет данных	(НА–сорафениб) липосомы/128 нм (динамическое рассеяние света)	Улучшение биодоступности препарата, снижение роста опухоли, подавление метастазирования

Существует целый ряд факторов, оказывающих влияние на транспорт доставляемого лекарства в опухоль, а именно: взаимодействие лекарства с белками и липопротеинами крови, способность к биодegradации, рН цитоплазмы опухолевых клеток, крово- и лимфоснабжение, интерстициальное давление, способность вызывать иммунный ответ и подвергаться фагоцитозу макрофагами и нейтрофилами, а также гетерогенность опухолевых клеток по экспрессии таргетных рецепторов, резистентность к действию доставляемого лекарства и ряд других параметров.

Необходимо понимать, что наноалмазы представляют собой гетерогенный материал, и каждая модификация частиц (размер, форма, покрытие *и т. д.*) будет оказывать определенное влияние на поведение носителя и конечный эффект. Поиск идеальной формулы невозможен без единой базы данных, объединяющей информацию об основных параметрах (размер, форма, источник, поверхностный заряд) наноалмазных частиц, а также о модификации поверхности и используемых биологических моделях и полученных эффектах.

Таким образом, несмотря на очевидные преимущества, нанопрепараты, как зарубежные, так и отечественные, в настоящее время не вошли в арсенал широко применяемых средств противоопухолевой химиотерапии.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНА были предоставлены заведующим лабораторией физики кластерных структур Санкт-Петербургского Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе РАН, доктором физико-математических наук, профессором Вулем А.Я. (договор о научном сотрудничестве №5-С от 10.01.2020). ФС лекарственного препарата Диокс была получена для исследования на основании Меморандума о сотрудничестве от 17.02.2020 года, заключенного между ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ и ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ.

Синтез конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс проводился на базе межкафедральной лаборатории биомедицинского материаловедения Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Содержание Докс в составе конъюгата составило 70 %, содержание Диокс составило 62,5 %.

Комплексное изучение биологической и цитотоксической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс, а именно: исследование гемосовместимости (агрегация тромбоцитов, плазмо-коагуляционный гемостаз, связывание с ЧСА, спонтанный гемолиз), влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli*, определение величины мембранного потенциала, влияние на клеточные линии (цитотоксичность), изучение механизмов поступления конъюгатов с цитостатиками в опухолевые клетки линии HeLa с помощью ингибиторов эндоцитоза, выполняли в межкафедральной лаборатории биомедицинского материаловедения Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Модельными системами были выбраны клеточные линии аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, глиобластомы T98G и карциномы шейки матки HeLa. Культуры клеток

получены из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург.

2.1. Характеристика ДНА–Докс и ДНА–Диокс

2.1.1. Идентификация конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс

Идентификация проводилась при помощи твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 WB, США). Исследование было выполнено на базе междисциплинарного ресурсного центра по направлению "Нанотехнологии и материаловедение" Санкт-Петербургского государственного университета.

2.1.2. Структурную характеристику наноалмазов и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ) с использованием микроскопа Jeol JEM-2100F (ускоряющее напряжение 200 кВ, разрешение точка-точка 0,19 нм). Исследование было выполнено на базе центра коллективного пользования «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях» физико-технического института им. А. Ф. Иоффе.

2.1.3. Распределение наночастиц ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс по размерам в водных дисперсиях и в бедной тромбоцитами плазме при концентрации 0,3 г/л изучали с помощью анализатора системы частиц и дзета-потенциала «Zetasizer Nano ZS» («Malvern Panalytical», Великобритания).

Исследование было выполнено на базе междисциплинарного ресурсного центра по направлению "Нанотехнологии и материаловедение" Санкт-Петербургского государственного университета.

2.2. Исследование биологической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс *in vitro*

2.2.1. Пробоподготовка для исследования гемосовместимости ДНА–Докс и ДНА–Диокс

Использовали кровь здоровых добровольцев, лиц обоего пола в возрасте 20–30 лет (N=7), которые не получали препараты, влияющие на свертывающую систему крови и функцию тромбоцитов.

Для предотвращения активации тромбоцитов кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие 3.8% цитрата натрия в соотношении цитрат натрия: кровь - 1:9.

Стабилизированную кровь для получения богатой тромбоцитами плазмы (PRP, Platelet-rich plasma) центрифугировали 7 мин при комнатной температуре и 1000 об/мин (150g). Часть PRP отбирали в пластиковую пробирку в количестве, необходимом для выполнения анализа. Из оставшейся крови получали бедную тромбоцитами плазму с помощью центрифугирования в течение 30 мин при 3600 об/мин (2500 g) для калибровки шкалы оптической плотности агрегометра, а также для исследования антикоагулянтных свойств ДНА–Докс и ДНА–Диокс и выполнения ряда других методик.

Учитывая тот факт, что в литературе имеются лишь разрозненные данные по биосовместимости Докс и Диокс, в нашей работе представлены результаты исследования отдельных эффектов Докс, Диокс и ДНА по отдельности для оценки их вклада в эффекты конъюгатов.

2.2.1.1. Исследование АДФ-, адреналин- и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов в PRP изучали с помощью агрегометра Solar AP 2110 (Беларусь) при 37⁰С и скорости вращения магнитной мешалки 1200 об / мин. Влияние ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс на агрегацию тромбоцитов оценивали по реакции на добавление к плазме индукторов АДФ (С = 10 мкМ), адреналина (С=10 мкМ) и коллагена (С=2 мкМ).

Предварительно проводили стандартизацию плазмы до получения концентрации тромбоцитов 200-250·10⁹ клеток/л с учетом добавления тестируемого вещества. Концентрацию тромбоцитов определяли в режиме подсчета тромбоцитов на агрегометре.

Ход исследования: смешивали 270 мкл PRP и 30 мкл исходных растворов ДНА, конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс для получения растворов с конечными концентрациями веществ 0,3, 0,15 и 0,075 г/л, соответственно. После инкубации смеси в течение 5 мин при 37⁰С в кюветы последовательно вносили 10 мкл индукторов. В контроле к 270 мкл PRP добавляли 30 мкл физиологического раствора. Агрегацию регистрировали до выхода кривой на плато. Измерения проводили в 5 повторах.

2.2.1.2. Плазмо-коагуляционный гемостаз

К «клоттинговым» тестам относятся методы измерения активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени (ПВ) и тромбинового времени (ТВ). Эти методы позволяют измерить промежуток времени с момента добавления реагента (активатора, запускающего процесс свёртывания) до формирования фибринового сгустка в исследуемой плазме.

Влияние ДНА и конъюгатов ДНА–Докс, ДНА–Диокс на плазменное звено гемостаза оценивалось по способности удлинять или сокращать время свертывания бедной тромбоцитами плазмы (по сравнению с контролем) при добавлении в плазму в тестах АПТВ, ПВ и ТВ.

Принцип метода АПТВ: исследование реакции рекальцификации плазмы в условиях стандартизации контактной и фосфолипидной активации свертывания крови. С этой целью к плазме добавляют контактный активатор (каолин) и парциальный тромбопластин, который в функциональном отношении подобен тромбоцитарным фосфолипидам. Чувствительность этого теста к дефициту плазменных факторов свертывания (исключая факторы VII и XIII) выше, чем в тесте определения времени рекальцификации плазмы, но стандартная фосфолипидная активация делает невозможным выявление недостаточности коагуляционной активности тромбоцитов.

Принцип метода ПВ: определяют время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы в присутствии оптимального количества кальция и избытка тканевого тромбопластина. Это вариант определения времени рекальцификации плазмы с добавлением тканевого тромбопластина. В комплекс с фактором VII и Ca^{2+} он непосредственно активирует фактор X, так что результаты теста зависят от активности фактора VII, фактора X и факторов, включающихся в процесс свертывания крови на этапах тромбино – и фибринообразования (факторов V, II и I).

Принцип метода ТВ: метод основан на способности тромбина индуцировать превращение фибриногена в фибрин без участия других факторов свертывания крови, т.е. позволяет оценить конечный этап свертывания крови (фибриноген и его производные, активность фактора XIII).

Для определения АПТВ, ПВ и ТВ использовали наборы реагентов «АПТВ-ТЕСТ», «ТЕХПЛАСТИН-ТЕСТ» и ТРОМБО-ТЕСТ» фирмы «Технология-Стандарт», Россия.

Исследования проводили на коагулометре АПГ2-02-П («ЭКМО», Россия). *Ход исследования:* смешивали 50 мкл плазмы и 50 мкл растворов ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс с образованием растворов с конечными концентрациями 1,5, 0,75 и 0,375 г/л. Далее растворы инкубировали при 37 °С в течение 60 сек и в соответствии с протоколом исследования определяли время

коагуляции на анализаторе в тестах АПТВ, ПВ и ТВ. В контроле в плазму добавляли 50 мкл физиологического раствора. Измерения проводили в 5 повторах.

2.2.1.3. Спонтанный гемолиз эритроцитов

Для исследования гемолитической активности ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс эритроциты получали из цитратной крови путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин с последующим трехкратным отмыванием физиологическим раствором, после чего готовили стандартную взвесь клеток в бедной тромбоцитами плазме.

Метод основан на фотометрическом определении внеэритроцитарного гемоглобина (при 540 нм), поступающего в среду вследствие спонтанного лизиса мембран эритроцитов, вызванного перекисным окислением липидов кислородом воздуха. Исследования проводили на спектрофотометре СФ2000 (Россия).

К полученной взвеси эритроцитов в бедной тромбоцитами плазме добавляли дисперсии ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в физиологическом растворе в количестве 10% от объема смеси при конечной концентрации 0,3, 0,15 и 0,075 г/л, и инкубировали при 37⁰ С в течение 1 часа и 3-х часов. После этого пробы центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин. Суспензии эритроцитов с добавлением эквивалентных объемов дистиллированной воды и физиологического раствора использовали в качестве положительного и отрицательного контроля. Коэффициент гемолиза менее 5% свидетельствовал об отсутствии гемолитического эффекта. Степень гемолиза эритроцитов определяли по формуле: $\% \text{ гемолиза} = (A_{\text{обр}} - A_{\text{конт}}) / A_{\text{гем}} \times 100$, где

$A_{\text{обр}}$ – абсорбция образца с веществом;

$A_{\text{конт}}$ – абсорбция холостого образца;

$A_{\text{гем}}$ – абсорбция образца со 100% гемолизом.

Измерения проводили в 5 повторах.

2.2.1.4. Связывание с человеческим сывороточным альбумином

Для идентификации сайтов связывания ДНА–Докс и ДНА–Диокс с ЧСА, (Биолот, Россия) были проведены эксперименты в присутствии маркеров сайтов связывания (варфарина (Sigma-Aldrich, США), ибупрофена (J&K Scientific GmbH, Китай) и дигитонина (J&K Scientific GmbH, Китай)).

Регистрацию спектров эмиссии проводили в диапазоне длин волн 310-450 нм при длине волны возбуждения 290 нм на спектрофлуориметре SOLAR CM 2203, Беларусь. Температура составляла $T = 25^{\circ}\text{C}$, точность термостатирования $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$. Для измерения спектров флуоресценции готовили растворы, содержащие 3 мкМ ЧСА и 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04 г/л тушителя, в роли которого выступали ДНА–Докс и ДНА–Диокс. Измерения проводились в отсутствие и в присутствии маркеров сайтов связывания (варфарин, ибупрофен, дигитонин) при конечной концентрации $C = 3$ мкМ. Расчеты проводились на основании трех параллельных измерений.

2.3. Изучение влияния ДНА–Докс и ДНА–Диокс на функцию митохондрий

2.3.1. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli* (штамм ДК-8)

Получение липосом. Липосомы получали из фосфатидилхолина (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин («Sigma», Германия) (20 мг) в хлороформе. Хлороформ удаляли продуванием азотом, при этом формировался тонкий слой липида. Для удаления остатка хлороформа пробирку с липидом помещали в вакуум на 10 мин. Далее добавляли 0.5 мл буфера А (10 мМ Трицин, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, рН 8.0) и оставляли на 30 мин при комнатной температуре, после чего интенсивно перемешивали в течение 20-40 сек. Для получения липосом полученную эмульсию фосфатидилхолина подвергали экструзии 21 раз через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 100 нм.

*Выделение рекомбинантной F_1F_0 -АТФазы (His-Tag) из *E. coli*.* Белок экспрессировали с использованием плазмиды *pVF2*. Мембраны, полученные при обработке прессом Френча, солюбилизировали в экстракционном буфере (50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 100 мМ КСl, 40 мМ аминокaproновая кислота, 15 мМ *n*-аминобензамидин, 5 мМ MgCl₂, 0.8 % фосфатидилхолин, 1.5 % октилглюкозид, 0.5 % дезоксихолат натрия, 0.5 % холат натрия, 2.5 % глицерин, и 30 мМ имидазол) в течение 90 мин при 4° С, затем центрифугировали в течение 30 мин при 400 000 *g* для отделения несолубилизованного остатка. Супернатант наносили на колонку Ni-NTA, уравновешенную экстракционным буфером и элюировали с тем же буфером, содержащим 180 мМ имидазола.

Встраивание F_1F_0 в липосомы. Смешивали 140 мкл белка с 300 мкл липосом, добавляли 160 мкл буфера А и 60 мкл 10 % холата натрия в буфере А – конечный объем 660 мкл, соотношение белок/липид = 1/30. Инкубировали 15 мин при 4°С при медленном перемешивании, затем наносили смесь на колонку с сефадексом G-50 (*V* = 3 мл), уравновешенным буфером А. Мутные фракции элюата, содержащие протеолипосомы, объединяли.

АТФ-зависимую генерацию протонного градиента на мембране протеолипосом оценивали по тушению флуоресценции 9-амино-6-хлорометоксиакридина (АСМА) при 492 нм (длина волны возбуждения 419 нм). Реакцию инициировали добавлением 250 мкМ АТФ к 1,9 мл буфера А, содержащего протеолипосомы (68 мкг белка) и 1 мкМ АСМА. Протонный градиент элиминировали путем добавления 2 мкМ раствора нигерицина. К протеолипосомам добавляли 100 мкл дисперсий ДНА, а также конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс с концентрацией 0,3%, а также индивидуальные Докс и Диокс в концентрациях, эквивалентных их содержанию в конъюгатах. Исследования проводили на спектрофлуориметре «PTI QuantaMaster» («HORIBA Scientific», США).

Измерение АТФазной активности с феноловым красным. АТФазную активность измеряли по выделению «стехиометрического» протона при 557 нм.

Реакцию инициировали добавлением 10 мкл протеолипосом (2,7 мкг белка) к 2 мл среды, содержащей 10 mM Трицина, 100 mM NaCl, pH 8,0, 2 mM АТФ, 1 mM MgCl₂, 60 мкМ фенолового красного, 1 мкМ СССР (2-[2-(3-хлорфенил)гидразинилиден]пропандинитрил). Калибровку шкалы протонного градиента проводили с использованием 5 мкл 0,1 M HCl. В пробу вносили 100 мкл 0,3 % водной дисперсии ДНА. Все измерения проводились при комнатной температуре на спектрофотометре «Varian Cary 50 Bio» («Varian», Австралия).

2.3.2. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$)

Модельной системой была выбрана культура клеток аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1. Культура клеток получена из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Для измерения митохондриального мембранного потенциала использовали флуоресцентный зонд MitoTracker® Orange CMTRos («Thermofisher Scientific», Великобритания), окрашивающий митохондрии *in situ*. Являясь катионным соединением, он может накапливаться в митохондриях живых клеток, причем его накопление зависит от митохондриального мембранного потенциала. С другой стороны, через свою хлорметильную группу MitoTracker® Orange CMTRos может образовывать ковалентные связи с SH-группами белков, что позволяет ему оставаться в митохондриях даже после фиксации клеток.

Через три дня после посева клетки аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1 трипсинизировали и промывали 10% фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Затем клетки ресуспендировали в ФСБ, содержащем 5% эмбриональную телячью сыворотку, 50 mM KCl и инкубировали с 500 нМ флуоресцентного зонда MitoTracker® Orange CMT при 37 ° C в течение 30 мин. После этого окрашенные клетки промывали ФСБ и высевали в черные 96-луночные планшеты (80 000 клеток / лунку). Дисперсии ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс добавляли в черные 96-луночные планшеты до конечной концентрации 0,075 мас.

% и инкубировали в течение 1 ч. В качестве разобщающего агента в лунки вносили 10 мкМ FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразона). Интенсивность флуоресценции измеряли при длинах волн возбуждения / эмиссии 554/576 нм с использованием микропланшетного спектрофлюориметра (TECAN Instrument, AG, Австрия). Эксперимент проводили в шести повторах.

2.4. Исследование цитотоксической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс *in vitro*

2.4.1. МТТ-тест

Для исследования цитотоксичности модельными системами были выбраны клеточные линии аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, глиобластомы T98G и карциномы шейки матки HeLa. Культуры клеток получены из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург.

Принцип МТТ-теста основан на том, что митохондриальные дегидрогеназы способны преобразовывать водорастворимый синий 3(3,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид в нерастворимый формазан фиолетового цвета с максимумом поглощения на длине волны 540 нм, который кристаллизуется в цитоплазме клетки. С помощью органических растворителей формазан переводится в растворенное состояние. По изменению оптической плотности раствора можно судить о количестве живых клеток.

Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при +37 °С в увлажнённой атмосфере, содержащей воздух и 5 % CO₂ в питательной среде DMEM, содержащей 10 % термически инактивированную фетальную бычью сыворотку, 1 % L-глутамин, 50 Ед·мл⁻¹ пенициллина и 50 мкг·мл⁻¹ стрептомицина.

Клетки высевали в 96-луночный планшет и помещали на ночь в CO₂ -инкубатор: за это время происходило прикрепление клеток к поверхности лунок (в каждую лунку вносили примерно 10⁴ клеток в 200 мкл среды DMEM), в лунки добавляли раствор, содержащий наноалмазы и конъюгаты с цитостатиками в

диапазоне концентраций 0,15-0,0047 г/л. Инкубация клеток в планшетах продолжалась 48 ч в CO₂ -инкубаторе при +37 °С. По окончании инкубационного периода культуральную среду DMEM сливали. Далее в лунки вносили 100 мкл среды DMEM и 20 мкл МТТ-реагента и планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч в CO₂ - инкубаторе при +37 °С.

После удаления надосадочной жидкости полученные кристаллы формазана были растворены в течение 15 мин при перемешивании в 200 мкл диметилсульфоксида на лунку и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре BioRadxMarx (Bio-Rad Laboratories, США) на длинах волн 540 нм и 690 нм. Для коррекции фона из значений оптической плотности при 540 нм вычитали значения оптической плотности при 690 нм для соответствующих лунок. Данные были нормированы в процентах по отношению к контрольным клеткам. Эксперимент проводили в пяти повторах.

2.4.2. Изучение механизмов эндоцитоза ДНА–Докс и ДНА–Диокс на модели клеточной линии карциномы шейки матки HeLa

Для исследования механизмов эндоцитоза, реализуемых в клетках HeLa конъюгатами ДНА–Докс и ДНА–Диокс, мы использовали метод МТТ (пункт 2.4.1.) и следующие ингибиторы: динасор (Sigma-aldrich, США) как ингибитор динаминзависимых путей эндоцитоза (300 мкМ), хлорпромазин (Sigma-aldrich, США) как ингибитор клатринзависимого пути (30 мкМ), нистатин (Sigma-aldrich, США) для ингибирования кавеолинзависимого пути эндоцитоза (30 мкМ), СК-636 (Sigma-aldrich, США), влияющий на актин-зависимый транспорт (150 мкМ) и амилорид (Sigma-aldrich, США) для ингибирования пиноцитоза (150 мкМ). Ингибиторы вносили за 30 минут перед добавлением растворов наноалмазов и конъюгатов. Эксперимент проводили в пяти повторах.

2.4.3. Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics Version 20. В случае нормального распределения данных сравнение проводилось с помощью t-критерия Стьюдента. При отклонении распределения от нормального сравнение выборок проводилось с помощью непараметрических критериев - t-критерия Вилкоксона (для зависимых выборок) и U-критерия Манна-Уитни (для независимых выборок). Критический уровень значимости различий принимался равным 5% ($p < 0,05$).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Твердотельная ^{13}C ЯМР спектроскопия

ДНА, Докс, ДНА–Докс и ДНА, Диокс и ДНА–Диокс были охарактеризованы спектроскопией ^{13}C ЯМР (Рисунки 3, 4).

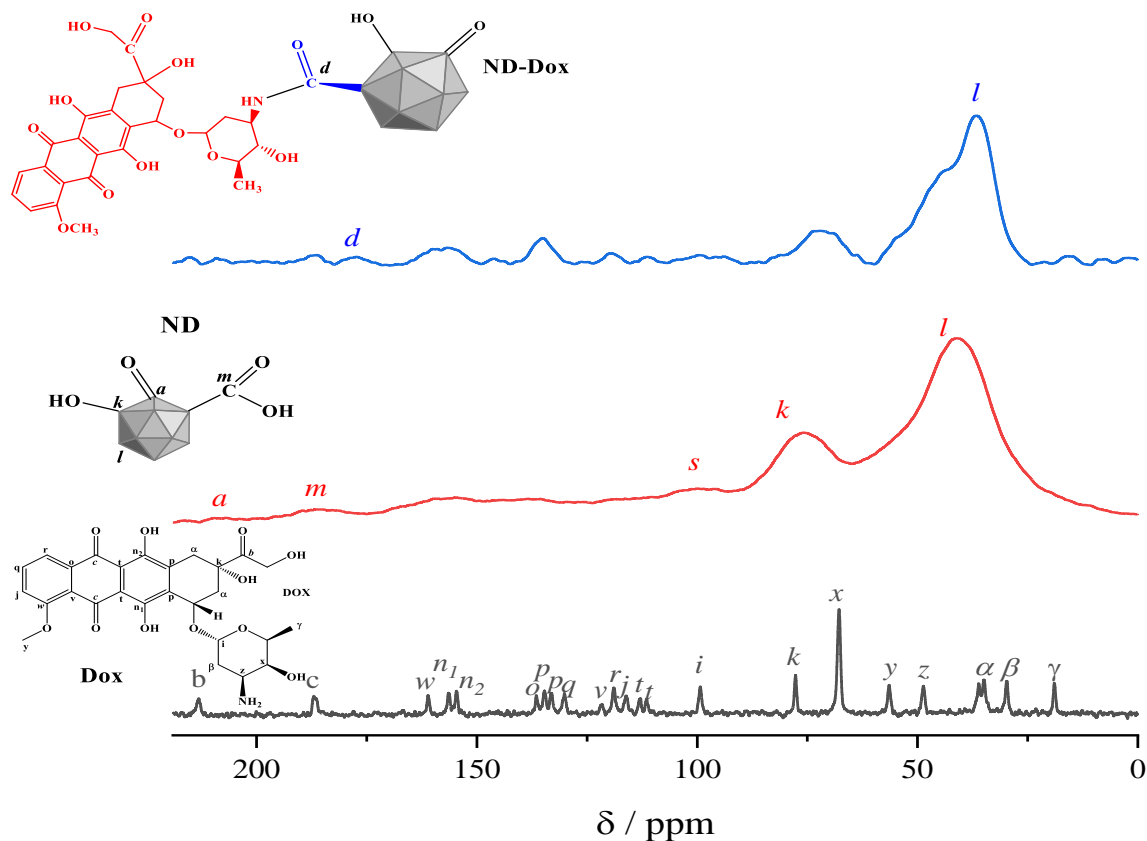


Рисунок 3. Результаты ^{13}C ЯМР-спектроскопии для ДНА, Докс и ДНА–Докс

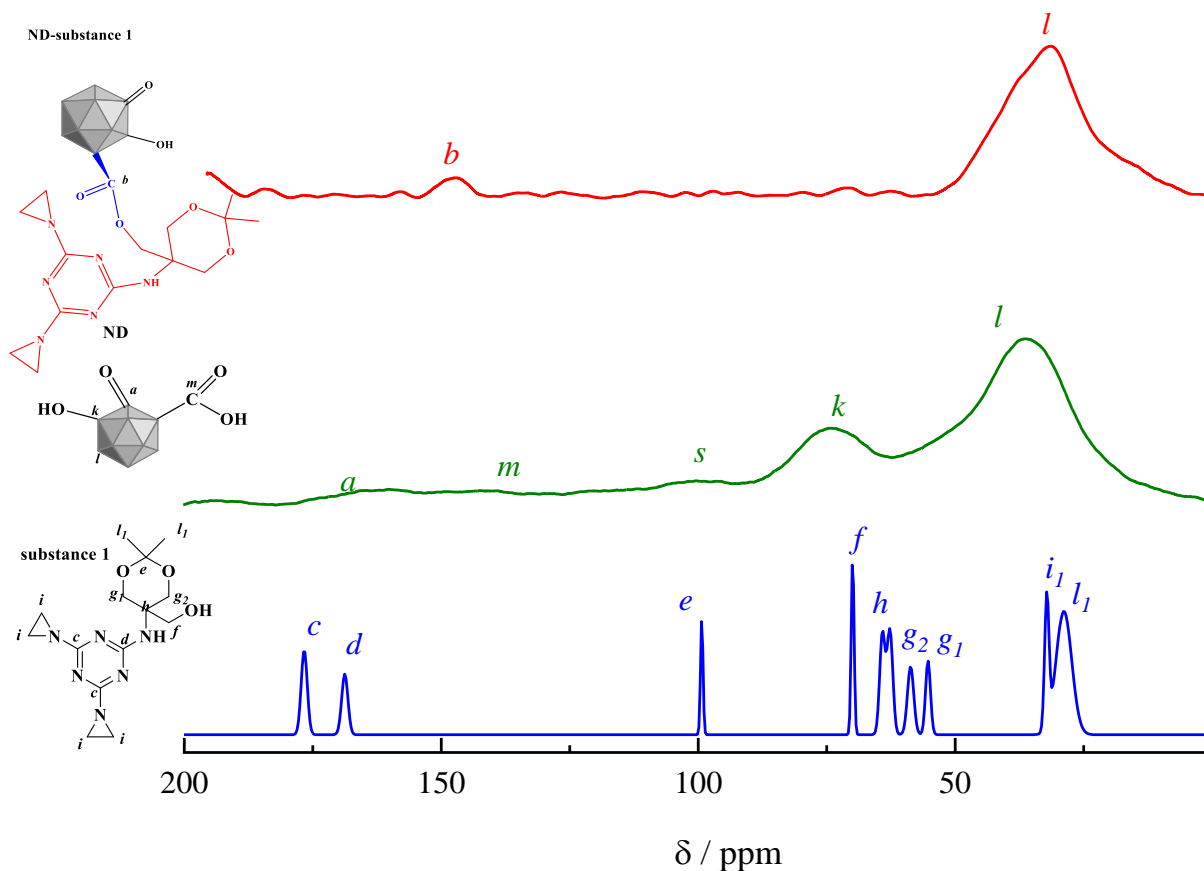


Рисунок 4. Результаты ^{13}C ЯМР-спектроскопии для ДНА, Диокс и ДНА–Диокс

Сопоставление спектров ДНА, цитостатиков и соответствующих конъюгатов подтверждает проведение функционализации ДНА–CONH–Докс и ДНА–COO–Диокс. Полученные данные не противоречат тому, что Докс связан с ДНА посредством амидной связи (пик при 177 м. д.), а Диокс — посредством сложноэфирной связи (пик при 120 м. д.).

3.2. Структурная характеристика ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс

Структурная характеристика ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс представлена на Рисунках 5-7. Частицы демонстрируют типичную алмазоподобную кристаллическую структуру с редкими гранями вдоль $\{111\}$ и $\{100\}$ кристаллических плоскостей.

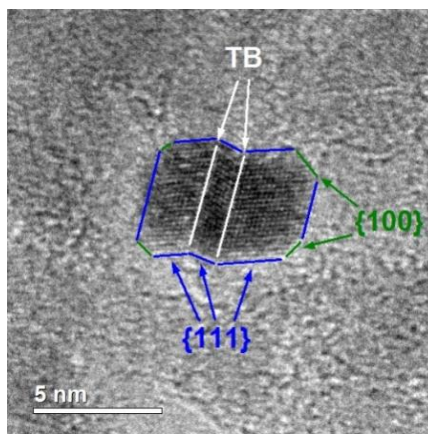


Рисунок 5. Характерное ТЕМ-изображение наноалмазной частицы с обозначением двойных границ (ТВ) и границ вдоль $\{111\}$ и $\{100\}$ плоскостей

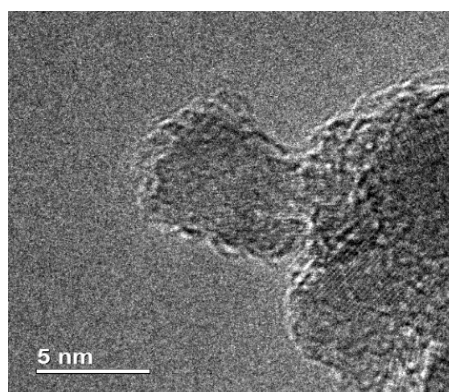


Рисунок 6. Характерное ТЕМ-изображение конъюгата ДНА–Диокс

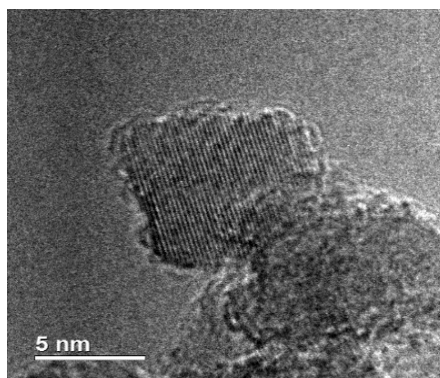


Рисунок 7. Характерное ТЕМ-изображение конъюгата ДНА–Докс

Как видно из представленных данных, размер частиц составляет около 5 нм, функционализация ДНА приводит к образованию заметного неструктурированного слоя толщиной примерно 0,5 нм на поверхности частиц, скрывающего форму и структуру наноалмаза, конъюгаты ДНА с цитостатиками демонстрируют агрегацию, в отличие от немодифицированных ДНА.

3.3. Распределение наночастиц ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в воде и бедной тромбоцитами плазме человека

Распределение ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в воде и бедной тромбоцитами плазме человека представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Значения размеров частиц ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в воде и плазме

Определяемый параметр	ДНА	ДНА–Докс	ДНА–Диокс
Размер частиц, нм, диапазон, вода	10-100	700-1700	1400-3500
Размер частиц, нм, диапазон, плазма	10-105	5-20	10-60
Размер частиц, нм, максимум, вода	25±5	1143±160	2100±400
Размер частиц, нм, максимум, плазма	33±9	11±2	30±5

Как видно из представленных данных, размер частиц для ДНА как в воде, так и в плазме находится в диапазоне 10-100 нм. ДНА-Докс и ДНА-Диокс в водных дисперсиях агрегируют с образованием группных частиц размером от 1000 до 2000 нм соответственно. В плазме наблюдается уменьшение размеров частиц примерно до 10 нм для ДНА-Докс и до 30 нм для ДНА-Диокс, что обусловлено образованием стабилизирующей их «белковой короны», состоящей из белков плазмы.

3.4. Исследование гемосовместимости ДНА–Докс и ДНА–Диокс

3.4.1. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на индуцированную агрегацию тромбоцитов

Результаты влияния конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс на индуцированную агрегацию тромбоцитов представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Влияние ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс на агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме

Амплитуда, %				
Индуктор	С ДНА, г/л			
	Контроль	0,3	0,15	0,075
АДФ	69,4±6,7	65,0±5,0	67,4±8,6	73,2±9,5
Адреналин	66,5±4,9	47,8±7,9*	57,8±5,7	63,0±4,7
Коллаген	79,9±5,2	65,2±6,8*	74,5±8,3	78,7±8,6
Амплитуда, %				
Индуктор	С ДНА–Докс, г/л			
	Контроль	0,3	0,15	0,075
АДФ	83,4±6,9	69,7±4,6*	72,0±2,9	78,3±8,6
Адреналин	80,7±5,3	69,2±7,7*	71,9±7,7*	80,2±5,9*
Коллаген	83,2±4,6	76,4±7,1	76,5±4,6	78,8±2,7
Амплитуда, %				
Индуктор	С ДНА–Диокс, г/л			
	Контроль	0,3	0,15	0,075
АДФ	80,8±2,6	73,3±3,2*	77,5±8,2	80,0±5,9
Адреналин	74,0±8,4	63,2±4,2*	68,1±9,0	78,4±8,1
Коллаген	85,0±5,6	75,6±3,3*	78,3±8,8	82,5±4,7

* - различия статистически значимы по отношению к контролю, $p < 0,05$

В результате проведенного исследования было установлено, что ДНА при всех изученных концентрациях не влияли на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, а в тестах коллаген- и адреналин- индуцированной агрегации отмечалось значимое по сравнению с контролем подавление агрегации только при максимальной концентрации 0,3 г/л.

Конъюгат ДНА–Докс статистически значимо по сравнению с контролем ингибировал адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов при всех изученных концентрациях без дозозависимого эффекта. В тесте АДФ-индуцированной агрегации подавлял агрегацию при максимальной концентрации 0,3 г/л и не влиял на коллаген-индуцированную агрегацию.

Конъюгат ДНА–Диокс статистически значимо по сравнению с контролем ингибировал АДФ-, коллаген- и адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов при максимальной концентрации 0,3 г/л.

Ранее в межкафедральной лаборатории медицинского материаловедения ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ имени акад. И.П. Павлова» МЗ РФ были получены данные о влиянии свободного Диокс на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Было установлено, что свободный Диокс, как и ДНА–Диокс, статистически значимо ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов только при максимальной концентрации 200 мкМ.

Докс в тесте АДФ-индуцированной агрегации проявлял сопоставимый с конъюгатом ДНА–Докс эффект, статистически значимо по сравнению с контролем подавляя агрегацию тромбоцитов при концентрациях 100 – 200 мкМ (Таблица 5).

Таблица 5. Влияние Докс и Диокс на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме.

Индуктор	Амплитуда, %					
	Контроль	C / μМ				
		20	50	100	150	200
Докс	83,7 ± 4,9	81,8 ± 4,5	77,1 ± 5,1	75,1 ± 5,2*	76,5 ± 3,5*	73,5 ± 5,2*
Диокс	71,3 ± 2,7	70,9 ± 2,8	69,6 ± 3,3	67,9 ± 2,3	67,1 ± 2,9	65,1 ± 2,1*

* - различия статистически значимы по отношению к контролю, $p < 0,05$

3.4.2. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на показатели плазмо-коагуляционного гемостаза

Результаты влияния ДНА и конъюгатов с цитостатиками на показатели плазмо-коагуляционного звена гемостаза представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Влияние ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс на показатели плазмо-коагуляционного звена гемостаза

Протромбиновое время, с				
С, г/л				
	Контроль	1,5	0,75	0,375
ДНА	14,9±0,9	12,6±1,1	12,0±1,0	12,5±1,2
ДНА–Докс	13,7±2,1	21,8±1,6*	15,2±1,2	13,3±1,1
ДНА–Диокс	13,4±1,0	17,8±1,8*	13,9±1,0	13,4±1,7
АПТВ, с				
ДНА	36,6±0,6	39,1±1,8	38,5±2,0	37,3±1,3
ДНА–Докс	36,1±1,7	39,5±1,2	38,0±0,9	37,33±0,7
ДНА–Диокс	36,8±1,1	36,9±1,2	38,3±1,2	38,0±0,9
Тромбиновое время, с				
ДНА	17,5±0,9	14,0±1,5	14,4±1,6	16,5±2,0
ДНА–Докс	15,4±1,2	12,2±0,6	14,7±0,8	15,9±0,7
ДНА–Диокс	17,5±1,2	8,33±0,7*	11,1±1,1*	16,0±0,9

* - различия статистически значимы по отношению к контролю, $p < 0,05$

Как видно из представленных данных, отмечалось статистически значимое по сравнению с контролем удлинение ПВ только при максимальной концентрации ДНА–Докс и ДНА–Диокс. ДНА–Диокс статистически значимо укорачивал ТВ при концентрациях 1,5-0,75 г/л.

Свободный Диокс в отличие от конъюгата ДНА–Диокс статистически значимо по сравнению с контролем удлинял АПТВ при концентрациях 10-200

мкМ. При этом отмечалась тенденция к укорочению ТВ, однако изменения носили статистически незначимый характер.

Свободный Докс статистически значимо по сравнению с контролем удлинял АПТВ при концентрациях 10-200 мкМ. При этом одновременно демонстрировал и прокоагулянтные свойства, статистически значимо снижая ТВ при концентрациях 10-200 мкМ (Таблица 7).

Таблица 7. Влияние Докс и Диокс на показатели плазмо-коагуляционного звена гемостаза

Тест	Контроль	С Докс, μM					
		10	25	50	75	100	200
ТВ, с	17,7 \pm 1,4	13,7 \pm 1,7*	13,7 \pm 1,0*	14,1 \pm 1,3*	13,8 \pm 1,1*	14,3 \pm 1,1*	13,6 \pm 1,5*
АПТВ, с	41,5 \pm 1,5	50,0 \pm 1,9*	50,10 \pm 1,8*	49,9 \pm 2,0*	49,6 \pm 1,7*	49,8 \pm 1,9*	50,6 \pm 1,5*
С Диокс, μM							
	Контроль	10	25	50	75	100	200
ТВ, с	17,1 \pm 1,2	15,2 \pm 1,0	15,4 \pm 0,8	15,6 \pm 1,4	15,6 \pm 0,7	15,8 \pm 1,2	15,1 \pm 2,1
АПТВ, с	36,5 \pm 2,0	42,3 \pm 2,2*	44,5 \pm 1,3*	46,7 \pm 1,8*	43,3 \pm 1,6*	45,2 \pm 2,1*	42,7 \pm 1,4*

* - различия статистически значимы по отношению к контролю, $p < 0,05$

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии плазмо-коагуляционной и тромбоцитарной тромбофилии и хорошей гемосовместимости ДНА–Докс и ДНА–Диокс в диапазоне концентрация 0,3 - 0,075 г/л. Свободные формы Докс и Диокс по их влиянию на показатели свёртывающей системы крови демонстрировали худшую по сравнению с конъюгатами гемосовместимость.

3.4.3. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на спонтанный гемолиз эритроцитов

В результате проведенных нами исследований были получены данные (Таблица 8) об отсутствии гемолиза при инкубации эритроцитов с ДНА и ДНА–Диокс в диапазоне концентраций 0,075-0,3 г/л как в течение 1 часа, так и в течение 3 часов.

Таблица 8. Влияние ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс на спонтанный гемолиз эритроцитов

Образец С, г/л	Спонтанный гемолиз, %					
	1 час			3 часа		
	0,075	0,15	0,3	0,075	0,15	0,3
ДНА	0	0	0	0	0	0
ДНА–Докс	0	0,22±0,03	2,0± 0,1	0,51± 0,03	0,81± 0,05	2,2± 0,1
ДНА–Диокс	0	0	0	0	0	0
Контроль +	100					
Контроль -	0,13±0,02					

Степень гемолиза при добавлении ДНА–Докс составила 2,0±0,1% при максимальной концентрации 0,3 г/л в течение 1 часа и 2,2±0,1% при 3-х часовой инкубации.

3.4.4. Исследование связывания ДНА–Докс и ДНА–Диокс с человеческим сывороточным альбумином

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) имеет три основных сайта связывания лигандов: сайт I, расположенный в субдомене IIА (сайт связывания варфарина); сайт II, расположенный в субдомене IIIА (сайт связывания ибупрофена); сайт III, расположенный в субдомене IV (сайт связывания дигитонина).

Для анализа статического тушения использовали уравнение Штерна-Фольмера в логарифмическом виде:

$$\lg((F_0-F)/F) = \lg k_b + n \lg Q$$

где F_0 — интенсивность флуоресценции ЧСА в отсутствие ДНА–Докс и ДНА–Диокс,

F — интенсивность флуоресценции ЧСА в присутствии ДНА–Докс и ДНА–Диокс,

Q — концентрация ДНА–Докс и ДНА–Диокс,

n — стехиометрический коэффициент связывания, равен тангенсу угла наклона прямой,

k_b — константа связывания ЧСА с ДНА–Докс и ДНА–Диокс.

График, построенный в координатах $\lg((F_0-F)/F)$ от $\lg Q$, дает пересечение с осью ординат в точке $\lg k_b$, а угол наклона численно равен количеству центров связывания лиганда n .

На Рисунке 3 (а, б) представлены логарифмические графики для ДНА–Докс и ДНА–Диокс в отсутствие маркеров сайтов связывания при $T = 298,15$ К.

На Рисунках 8 и 9 представлены логарифмические графики для ДНА–Докс и ДНА–Диокс в отсутствие маркеров сайтов связывания при $T = 298,15$ К.

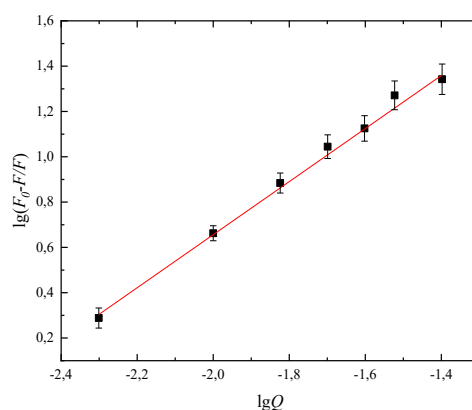


Рисунок 8. Логарифмический график Штерна-Фольмера для ДНА–Докс при 298,15 К без маркеров сайтов связывания

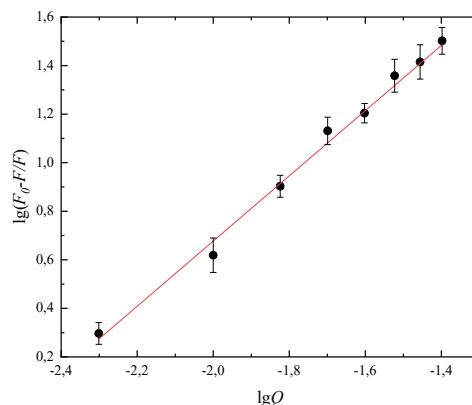


Рисунок 9. Логарифмический график Штерна-Фольмера для ДНА-Диокс при 298,15 К без маркеров сайтов связывания

В соответствии с полученными графиками были рассчитаны значения k_b и n для ДНА-Докс и ДНА-Диокс в присутствии маркеров сайтов связывания (Таблица 9).

Таблица 9. Значения констант связывания (k_b) и стехиометрия реакции связывания (n)

Маркер связывания	$k_b \cdot 10^2, \text{л} \cdot \text{г}^{-1}$		N	
	ДНА-Диокс	ДНА-Докс	ДНА-Диокс	ДНА-Докс
Без маркеров	$17,9 \pm 0,6$	$9,77 \pm 0,51$	$1,2 \pm 0,3$	$0,52 \pm 0,07$
Варфарин	$20,1 \pm 0,7$	$1,69 \pm 0,37$	$1,3 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,04$
Ибупрофен	$0,3 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,08$	$1,1 \pm 0,1$	$0,41 \pm 0,03$
Дигитонин	$9,9 \pm 0,4$	$1,11 \pm 0,12$	$1,2 \pm 0,2$	$0,40 \pm 0,03$

Из полученных данных для ДНА-Докс видно, что значения k_b и n уменьшились при добавлении ибупрофена, дигитонина и варфарина. Исходя из значений констант связывания, ДНА-Докс образует более прочный комплекс с альбумином в субдомене IIIA и менее прочные комплексы в субдоменах IB, IIA. Для ДНА-Диокс видно, что значения k_b и n уменьшились при добавлении ибупрофена и дигитонина. Исходя из значений констант связывания, ДНА-Диокс образует более прочный комплекс с альбумином в субдомене IIIA и менее прочный комплекс в субдомене IB.

3.5. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на функцию митохондрий

3.5.1. Влияние ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F_1F_0

E. coli

В настоящем исследовании в качестве модели митохондриальной мембраны использовали протеолипосомы, содержащие рекомбинантную F_1F_0 АТФазу *E. coli* (число оборотов фермента около 700 сек^{-1} при 37°C) [99]. Гидролиз АТФ данным препаратом протеолипосом приводит к генерации протонного градиента на мембране. Для детектирования протонного градиента использовался АСМА.

Добавление АТФ к протеолипосомам вызывало снижение интенсивности флуоресценции АСМА, что указывает на АТФ-зависимую генерацию протонного градиента на мембране протеолипосом. Последующее добавление ДНА (100 мкл 0,3% дисперсии) приводило к значимому уменьшению тушения флуоресценции АСМА, что можно интерпретировать, как уменьшение протонного градиента (Рисунок 10). Аналогичный эффект наблюдался при добавлении 100 мкл 0,3% дисперсии конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс (Рисунок 11).

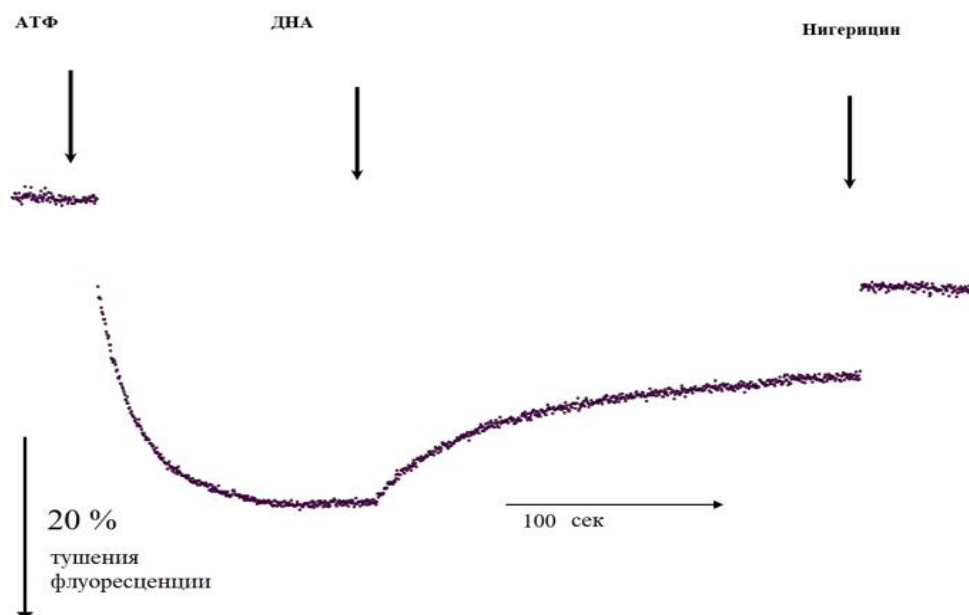


Рисунок 10. Влияние ДНА на тушение флуоресценции АСМА

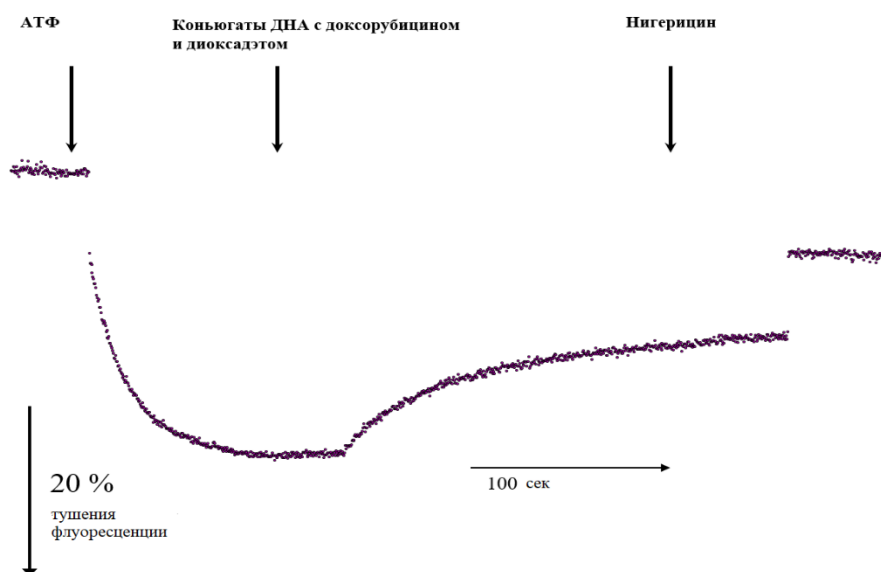


Рисунок 11. Влияние конъюгатов ДНА с Докс и Диокс на тушение флуоресценции АСМА

Можно предположить, что возможен ингибирующий эффект ДНА на АТФазу.

Следует отметить, что Докс и Диокс не влияли на тушение флуоресценции АСМА (Рисунок 12), т. е. наблюдаемый эффект целиком связан только с ДНА.

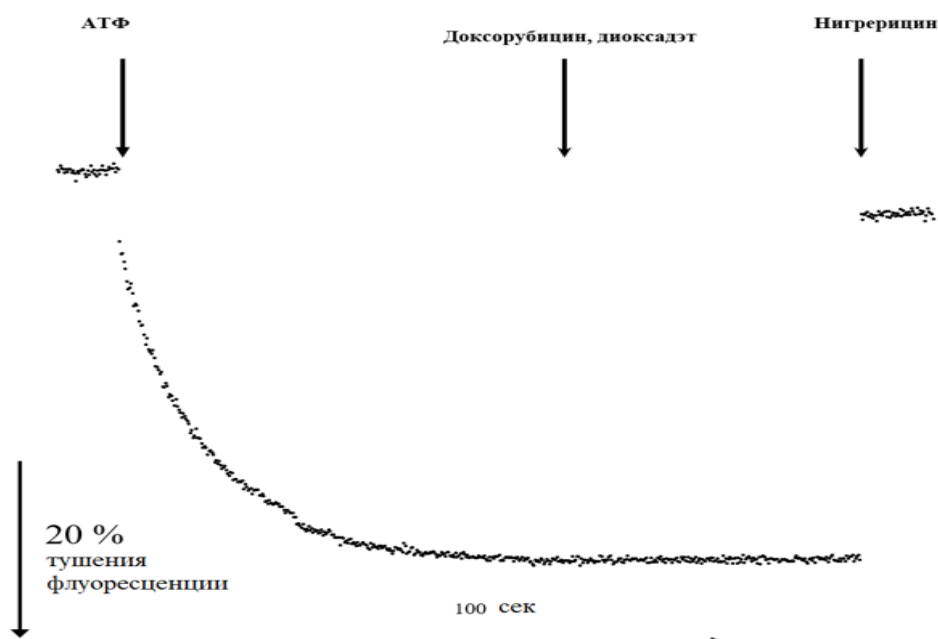


Рисунок 12. Влияние Докс и Диокс на тушение флуоресценции АСМА

Для проверки гипотезы о возможном ингибирующем действии ДНА на АТФазу была измерена скорость гидролиза АТФ, как описано в Материалах и методах, до и после внесения ДНА (рисунок 13). Реакцию гидролиза АТФ инициировали, добавляя фермент, затем в процессе протекания реакции вносили ДНА.

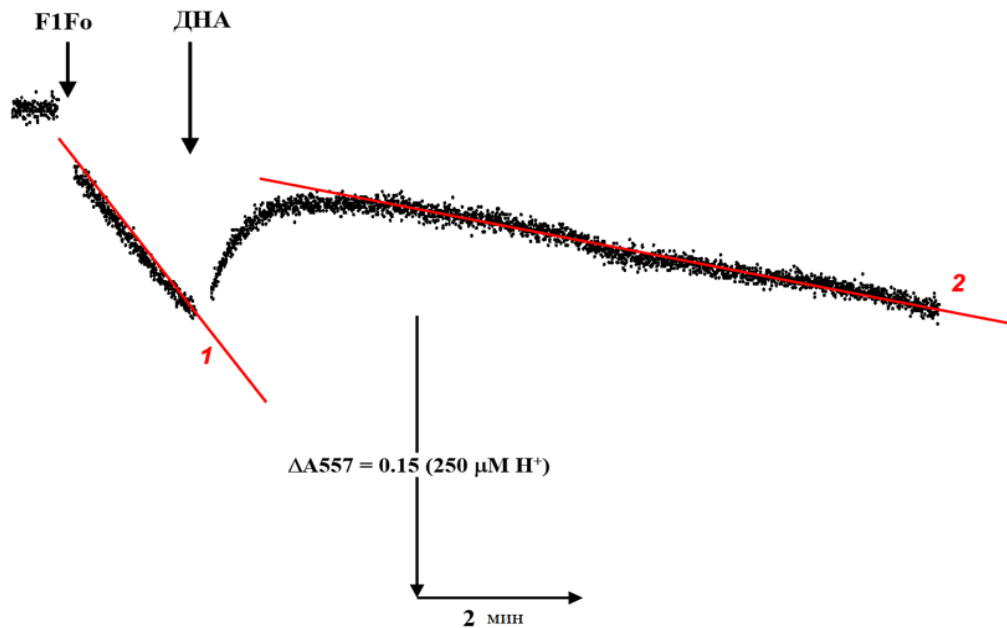


Рисунок 13. Влияние ДНА на АТФазу

Как видно из представленных данных, АТФазная активность после внесения ДНА (линия 2 на рисунке 13) в три раза ниже, чем до их добавления (линия 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксилированные ДНА оказывают ингибирующий эффект на активность АТФазы.

3.5.2. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$)

Результаты влияния ДНА, Докс, Диокс и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс на интенсивность флуоресценции зонда MitoTracker® Orange CMTRos представлены в Таблице 10.

Таблица 10. Влияние ДНА, конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс, Докс и Диокс на митохондриальный мембранный потенциал

Показатель	Контроль	ФССР	ДНА	ДНА–Докс	ДНА–Диокс	Докс	Диокс
Интенсивность флуоресценции, % к контролю	100,0±22,0	2,8±0,4*	30,4±4,6*	6,9±0,9*	27,9±5,1*	52,2±7,1*	83,1±13,8

* $p < 0,05$ относительно контроля

Как видно из представленных данных, добавление ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс приводило к снижению $\Delta\Psi_m$: интенсивность флуоресценции по отношению к контролю (100,0±22,0 %) составила 30,4±4,6 %, 6,9±0,9 % и 27,9±5,1, соответственно. Наиболее значимый эффект отмечался у ДНА–Докс (6,9±0,9 %). Для ДНА и ДНА–Диокс получены сопоставимые результаты (30,4±4,6 % и 27,9±5,1 %).

Докс по сравнению с ДНА–Докс в меньшей степени влиял на величину $\Delta\Psi_m$: (интенсивность флуоресценции по отношению к контролю составила 52,2±7,1 %), а Диокс практически не вызывал тушения флуоресценции (83,1±13,8 %).

В эксперименте по влиянию на митохондриальный мембранный потенциал конъюгаты ДНА–Докс снижали мембранный потенциал значительно сильнее, чем ДНА или Докс (6,9±0,9 %, 30,4±4,6 % и 52,2±7,1 %, соответственно). По-видимому, это связано с формированием бинарного эффекта, т. е. комбинацией ингибирующего эффекта ДНА и Докс-зависимой генерацией активных форм кислорода.

В настоящем исследовании обнаружена способность Докс снижать уровень мембранного митохондриального потенциала, не оказывая при этом влияния на активность АТФазы.

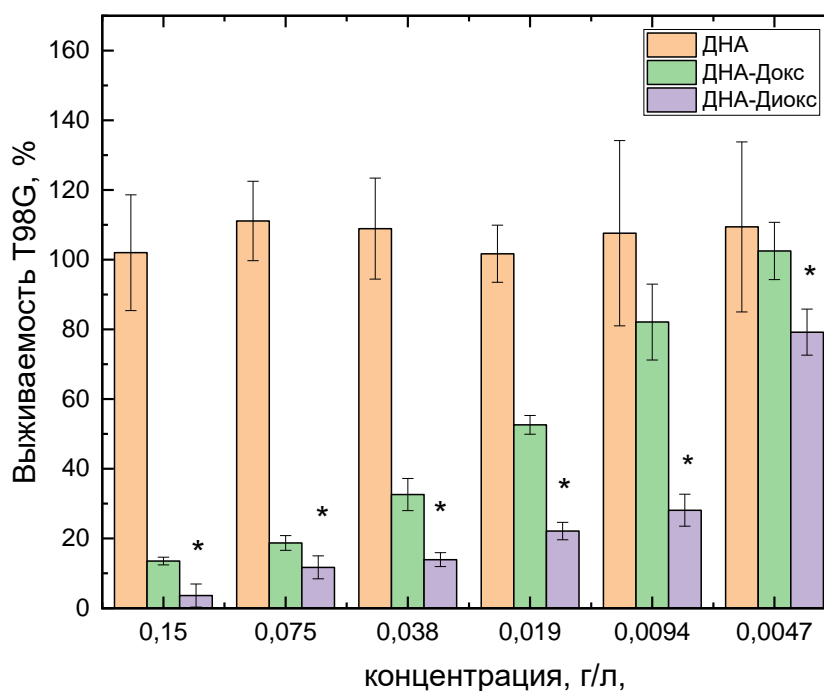
Учитывая, что Диокс практически не влиял на величину мембранного митохондриального потенциала ($83,1 \pm 13,8$ %) и полученные нами для ДНА и ДНА–Диокс сопоставимые результаты ($30,4 \pm 4,6$ % и $27,9 \pm 5,1$ %, соответственно), можно предположить, что снижение мембранного потенциала при добавлении ДНА–Диокс обусловлено только ингибирующим эффектом ДНА.

3.6. Изучение цитотоксической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс на клеточных линиях аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, глиобластомы T98G и карциномы шейки матки HeLa

3.6.1. Результаты МТТ-теста

В результате проведенных исследований нами было установлено, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс обладают максимальной цитотоксичностью по отношению к клеткам глиобластомы T98G, при этом ДНА–Диокс статистически значимо ($p < 0,05$) превосходил ДНА–Докс при всех изученных концентрациях (Рисунок 14).

Так, при концентрации 0,15 г/л доля выживших клеток глиобластомы линии T98G составила $13,5 \pm 1,1$ % для ДНА–Докс и $3,6 \pm 0,3$ % для ДНА–Диокс, при концентрации 0,075 г/л – $18,7 \pm 3,1$ % и $11,7 \pm 1,2$ %, при концентрации 0,037 г/л – $32,6 \pm 4,6$ % и $13,9 \pm 2,2$ %, при концентрации 0,018 г/л – $52,6 \pm 2,7$ % и $22,1 \pm 2,5$ %, при концентрации 0,0094 г/л – $82,1 \pm 4,7$ % и $28,1 \pm 2,6$ %, при концентрации 0,0047 г/л – $102,1 \pm 8,2$ % и $79,2 \pm 6,1$ %, соответственно.



*- $p < 0,05$ между ДНА-Диокс и ДНА-Докс

Рисунок 14. Цитотоксичность ДНА-Докс и ДНА-Диокс на клеточной линии T98G

По отношению к клеткам линии PANC-1 и HeLa, ДНА-Докс и ДНА-Диокс при концентрациях 0,15 – 0,0047 г/л демонстрировали сопоставимый дозозависимый цитотоксический эффект (Рисунки 15-16).

Так, при концентрации 0,15 г/л доля выживших клеток линии PANC-1 составила $59,1 \pm 1,9\%$ для ДНА-Докс и $57,5 \pm 2,3\%$ для ДНА-Диокс, при концентрации 0,075 г/л – $61,8 \pm 3,4\%$ и $61,0 \pm 2,1\%$, при концентрации 0,037 г/л – $66,1 \pm 4,1\%$ и $63,3 \pm 2,2\%$, при концентрации 0,018 г/л – $71,4 \pm 3,6\%$ и $72,2 \pm 2,3\%$, при концентрации 0,0094 г/л – $79,8 \pm 1,7\%$ и $86,9 \pm 2,2\%$, при концентрации 0,0047 г/л – $99,1 \pm 3,9\%$ и $95,7 \pm 4,1\%$, соответственно.

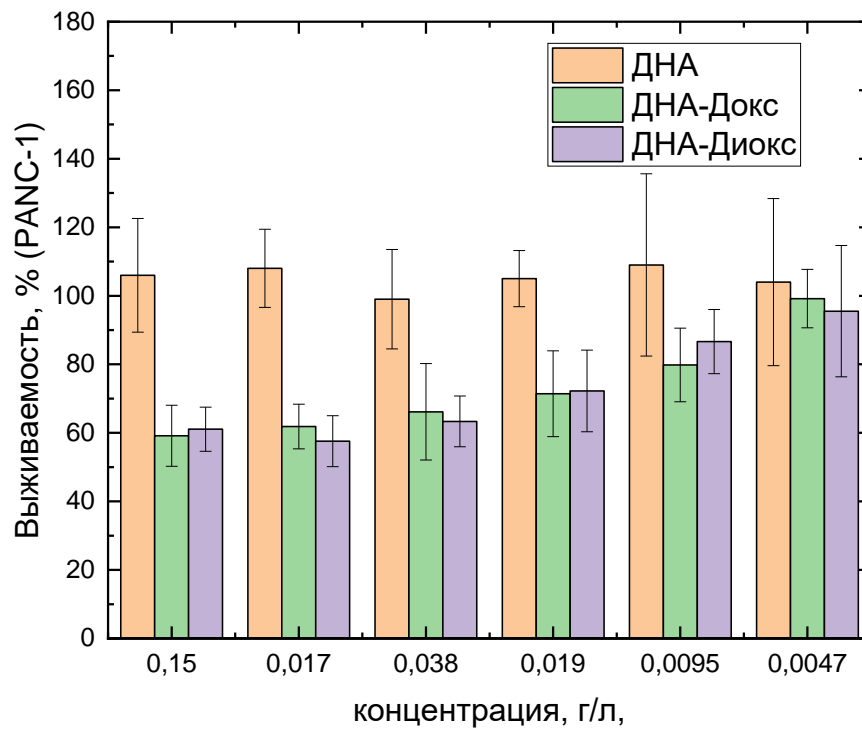


Рисунок 15. Цитотоксичность ДНА-Докс и ДНА-Диокс на клеточной линии PANC-1

Для клеточной линии HeLa при концентрации 0,15 г/л доля выживших клеток составила $46,1 \pm 0,8\%$ для ДНА-Докс и $43,3 \pm 1,4\%$ для ДНА-Диокс, при концентрации 0,075 г/л – $49,9 \pm 1,7\%$ и $50,3 \pm 1,6\%$, при концентрации 0,037 г/л – $53,3 \pm 2,8\%$ и $61,3 \pm 5,3\%$, при концентрации 0,018 г/л – $76,1 \pm 3,8\%$ и $78,2 \pm 4,6\%$, при концентрации 0,0094 г/л – $83,2 \pm 4,0\%$ и $86,6 \pm 7,3\%$, при концентрации 0,0047 г/л – $92,6 \pm 1,9\%$ и $93,1 \pm 2,0\%$, соответственно.

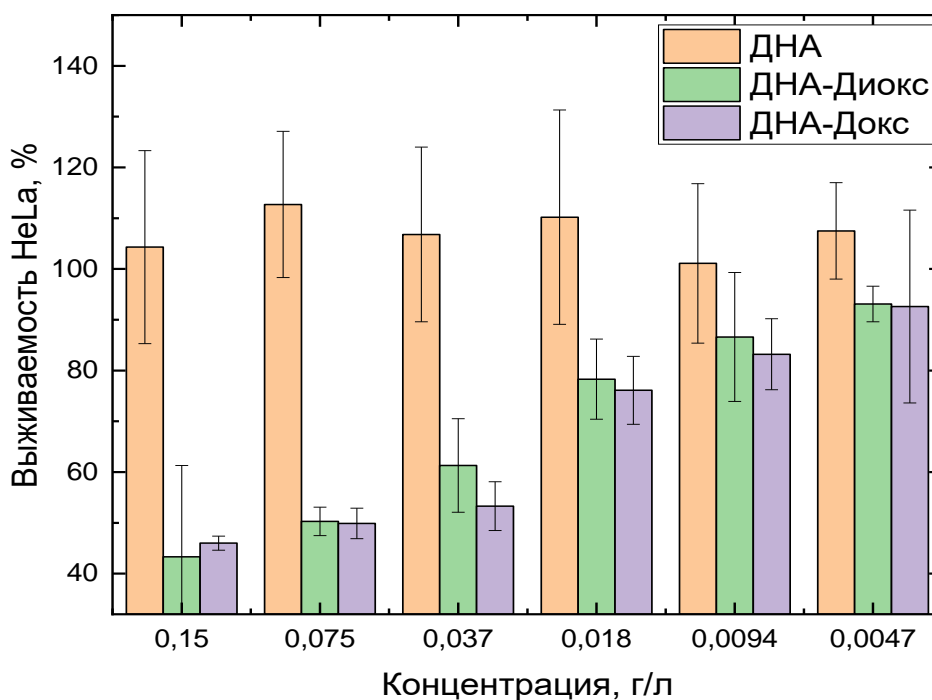


Рисунок 16. Цитотоксичность конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс на клеточной линии HeLa

Характеристика цитотоксического действия ДНА, Докс, Диокс, ДНА–Докс и ДНА–Диокс представлена в Таблице 11.

На основе анализа концентрационных зависимостей (доза-эффект), были рассчитаны значения IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) для ДНА, Докс, Диокс, ДНА–Докс и ДНА–Диокс.

Таблица 11. Характеристика цитотоксического действия ДНА, Докс, Диокс, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в пересчете на содержание наноалмазов

Вещество	IC ₅₀		
	PANC-1	T98G	HeLa
ДНА	-	-	-
ДНА–Докс	24,0±1,2 мг/л (37±2 мкМ)	1,4±0,1 мг/л (2,2±1,1 мкМ)	2,24±0,11 мг/л (2,8±0,1 мкМ)
ДНА–Диокс	53,0±3,27 мг/л (112±6 мкМ)	0,09±0,01 мг/л (0,20±0,01 мкМ)	2,94±0,15 мг/л (6,2±0,3 мкМ)
Докс	0,30±0,02 мкМ	35,02±1,75 мкМ	2,30±0,07 мкМ
Диокс	33,3±1,7 мкМ	3,01±0,15 мкМ	4,95±0,25 мкМ

Как видно из представленных данных определить IC₅₀ для ДНА оказалось невозможным по причине отсутствия у них цитотоксичности в исследуемом диапазоне концентраций. Для клеточной линии PANC-1 IC₅₀ Докс и Диокс в составе конъюгата с ДНА существенно превышают IC₅₀ индивидуальных цитостатиков. В отношении клеточной линии HeLa IC₅₀ цитостатиков в составе конъюгатов сопоставима с IC₅₀ индивидуальных препаратов. На клеточной линии глиобластомы T98G ДНА–Докс и ДНА–Диокс демонстрируют большую цитотоксичность при меньшей концентрации Докс и Диокс в составе конъюгата по сравнению с индивидуальными препаратами.

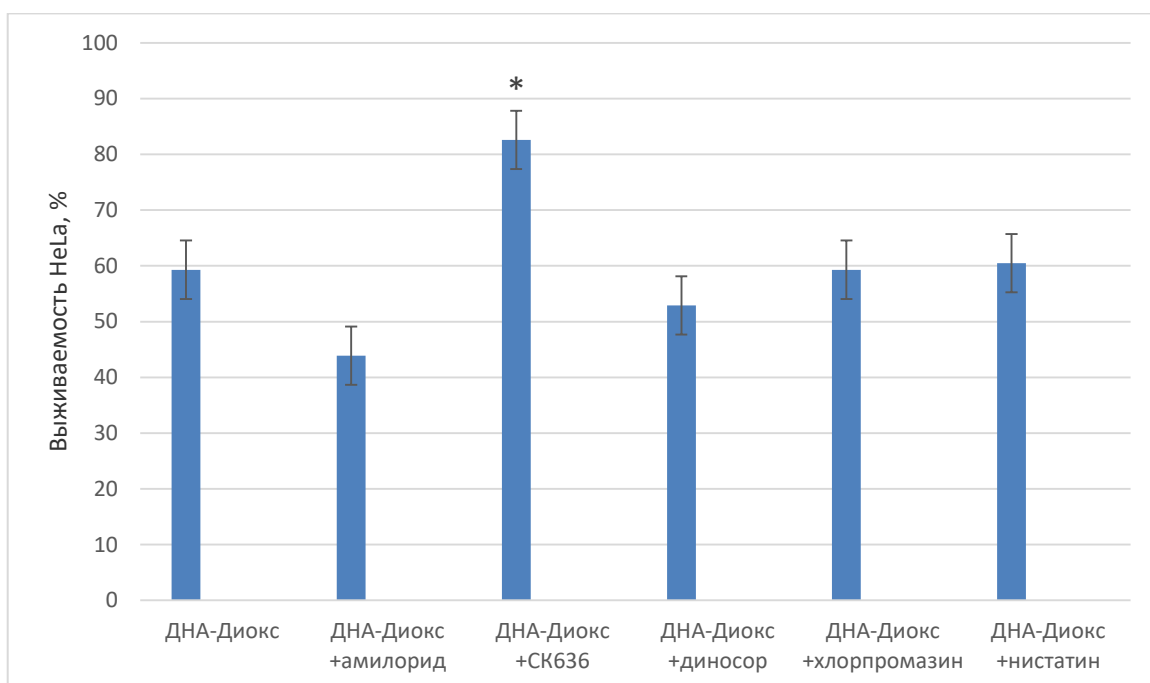
Более низкие значения IC₅₀, получаемые с помощью метода МТТ, предпочтительнее при переходе на исследование специфической противоопухолевой активности и острой токсичности в моделях *in vivo*.

3.6.1. Исследование механизмов эндоцитоза ДНА–Докс и ДНА–Диокс на модели клеточной линии карциномы шейки матки HeLa

Для исследования механизмов интернализации ДНА–Докс и ДНА–Диокс проводили сравнительный анализ эффективности их проникновения в клетки карциномы шейки матки HeLa в присутствии ингибиторов эндоцитоза: использовали динасор как ингибитор динамин-зависимых путей эндоцитоза (300 мкМ), хлорпромазин как ингибитор клатрин-зависимого пути (30 мкМ), нистатин

для ингибирования кавеолин-зависимого пути эндоцитоза (30 мкМ), СК-636, влияющий на актин-зависимый транспорт (150 мкМ) и амилорид для ингибирования пиноцитоза (150 мкМ). В качестве контроля оценивали долю выживших клеток HeLa в присутствии ДНА–Докс или ДНА–Диокс.

По результатам МТТ-теста средняя выживаемость клеток HeLa для ДНА–Диокс при концентрации 0,15 г/л составила $59,3 \pm 3,0\%$, в присутствии амилорида – $43,9 \pm 6,7\%$, в присутствии СК636 – $82,6 \pm 9,7\%$, в присутствии диносора – $52,9 \pm 2,5\%$, в присутствии хлорпромазина – $59,7 \pm 5,5\%$, в присутствии нистатина – $60,5 \pm 4,2\%$ (Рисунок 17).

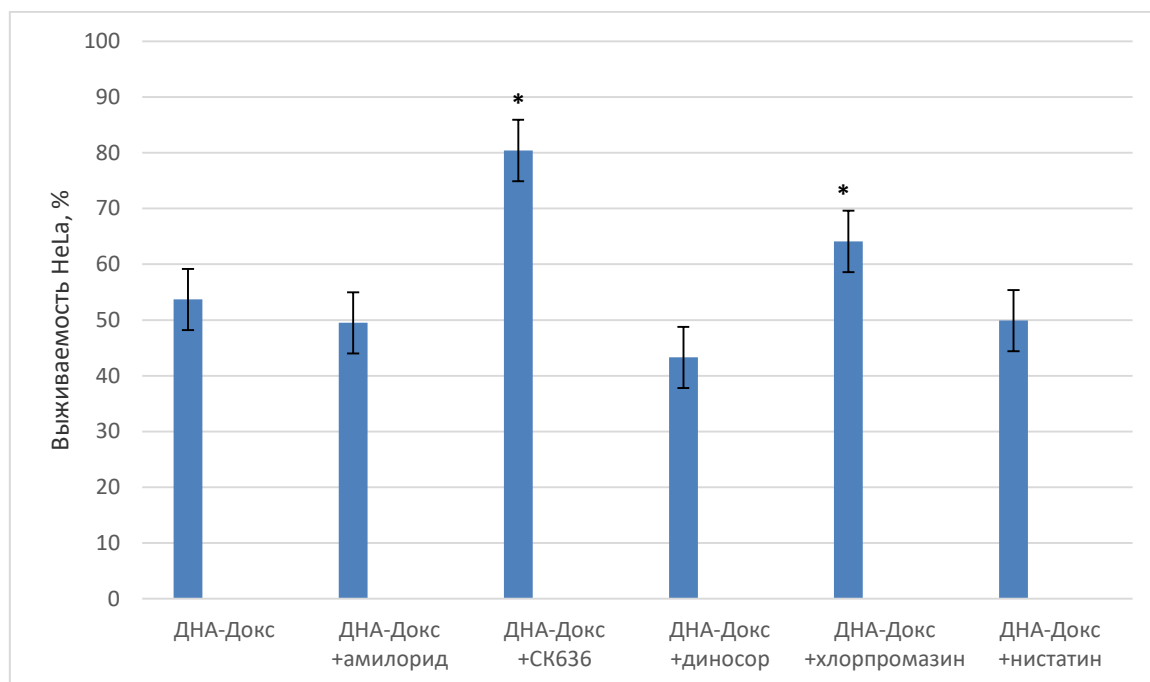


*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем (ДНА–Диокс)

Рисунок 17. Влияние ингибиторов эндоцитоза на поглощение ДНА–Диокс клетками HeLa

Для ДНА–Докс были получены следующие результаты: средняя выживаемость клеток HeLa для ДНА–Докс при концентрации 0,15 г/л составила $53,7 \pm 1,0\%$, в присутствии амилорида – $49,5 \pm 2,2\%$, в присутствии СК636 –

80,4±6,6%, в присутствии диносора – 43,3±2,8%, в присутствии хлорпромазина – 64,1±1,2%, в присутствии нистатина – 49,9±6,6% (Рисунок 18).



*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем (ДНА–Докс)

Рисунок 18. Влияние ингибиторов эндоцитоза на поглощение ДНА–Докс клетками HeLa

Как видно из представленных данных, интернализация в клетки HeLa ДНА–Докс статистически значимо ($p < 0,05$) снижалась в присутствии ингибиторов эндоцитоза СК-636 и хлорпромазина, а ДНА–Диокс - только в присутствии ингибитора эндоцитоза СК-636.

Таким образом, преимущественным механизмом эндоцитоза, по которому ДНА–Докс и ДНА–Диокс проникают в клетки HeLa, является актин-зависимый механизм, а для ДНА–Докс возможен еще и клатрин-зависимый путь эндоцитоза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определяющими факторами биосовместимости наночастиц на основе углерода являются такие свойства, как электронная конфигурация, размер частиц, поверхностный заряд и модификация поверхности. В связи с тем, что кровь является сложной физиологической системой, к гемосовместимости материалов биомедицинского назначения предъявляются дополнительные требования, а именно: они не должны вызывать тромбоза и тромбоемболии, разрушения клеточных элементов крови, денатурации белков плазмы крови, инактивации ферментов.

По данным литературы, ДНА могут оказывать повреждающее действие на лейкоциты и эритроциты *in vitro* [100], а карбоксилированные ДНА способны активировать тромбоциты и вызывать тромбоемболию при концентрации 1-5 мкг/мл [101].

В работе же [102] получены данные о высокой степени гемолиза только в случае суспензии наноалмазов селективного окисления. Степень гемолиза суспензий наноалмазов высокой очистки была незначительной и составила от 0,5% до 1,8% гемолиза к 60-й минуте инкубации. По мнению авторов, высокий процент гемолиза в первом случае связан с наличием достаточно большого количества различных примесей в виде окисляемых форм углерода в составе этой марки наноалмазов.

В работе [103] автором установлено, что немодифицированные наноалмазы активируют систему свёртывания крови *in vitro*, статистически значимо по сравнению с контролем укорачивая время рекальцификации плазмы при концентрации 9 мкг/мл.

Наряду с этим данные, полученные Hung-Cheng Li et al., свидетельствуют об отсутствии тромбогенного потенциала или антикоагулянтной активности у окисленных наноалмазов (диаметром 35–500 нм) при концентрациях 25-400 мкг/мл [104].

Известно, что опухолевые клетки выделяют в кровоток высокоактивный тканевый фактор в составе микрочастиц, который непосредственно взаимодействует с компонентами гемостаза. Высвобождение цитокинов (фактора некроза опухоли, интерлейкина 1, фактора роста эндотелия сосудов и др.) из опухолевых клеток ведет к повышению прокоагулянтных свойств сосудистой стенки и активации неоангиогенеза [105, 106].

Развитие тромбоза может быть связано с химиотерапией, введением эритропоэз-стимулирующих препаратов (эритропоэтина), а также с гормональной терапией (например, тамоксифеном) [107].

Следует учитывать лекарственные взаимодействия прямых пероральных антикоагулянтов с химиотерапевтическими препаратами. Например, ингибиторы тирозинкиназы и гормональная терапия блокируют P-гp и CYP3A4, а Докс, винбластин и дексаметазон, наоборот, индуцируют, что может привести к ослаблению ответа на химиотерапию и повышению риска кровотечения за счет изменения концентрации антикоагулянтов в сыворотке крови [108].

Гемолитическая активность является одним из важнейших показателей гемосовместимости различных наноматериалов [109].

В литературе представлены противоречивые данные о влиянии углеродных наноструктур на мембрану эритроцитов. По-видимому, это связано с тем, что чистота и химический состав наноматериалов существенно различаются у разных поставщиков, что и затрудняет сравнение результатов, полученных различными исследовательскими группами.

В работе [110] авторы изучали влияние наночастиц шунгитового углерода на эритроциты человека и ряда позвоночных различными методами *in vitro*. Было установлено, что введение нанодисперсии шунгитового углерода в суспензию клеток в случае эритроцитов как человека, так и норки приводило к образованию агрегатов из дискоцитов.

Наряду с этим данные, полученные Hung-Cheng Li et al., свидетельствуют об отсутствии гемолитической активности у окисленных наноалмазов (диаметром 35–500 нм) при концентрации выше 400 мкг / мл [104].

На сегодняшний день остаётся малоизученным вопрос о влиянии ДНА–Докс на систему гемостаза и клетки крови, а в отношении ДНА–Диокс такая информация отсутствует совсем.

Анализ полученных ранее данных и результаты настоящего исследования по ряду показателей позволяют сравнить гемосовместимость ДНА–Докс, ДНА–Диокс и Докс и Диокс в свободной форме (Таблица 12).

Таблица 12. Сравнение гемосовместимости свободных форм Докс и Диокс и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс по их влиянию на показатели свертывающей системы крови и мембрану эритроцитов

Вещество	АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов, %	АПТВ, с	ТВ, с	Спонтанный гемолиз, %	
				1 час	3 часа
Докс	↓ В диапазоне концентраций 100-200 мкМ	↑ В диапазоне концентраций 10-200 мкМ	↓ В диапазоне концентраций 10-200 мкМ	Данных нет	Данных нет
ДНА–Докс	↓ При максимальной концентрации 0,3 г/л	Не влиял	Не влиял	Гемолиз 2%	Гемолиз 2,2%
Диокс	↓ При максимальной концентрации 200 мкМ	↑ В диапазоне концентраций 5-200 мкМ	Не влиял	Данных нет	Данных нет
ДНА–Диокс	↓ При максимальной концентрации 0,3 г/л	Не влиял	↓ При концентрации 1,5-0,75 г/л	Не влиял	Не влиял

Как видно из представленных данных, по ряду показателей ДНА–Докс и ДНА–Диокс демонстрировали лучшую гемосовместимость по сравнению с

индивидуальными формами Докс и Диокс. Было установлено, что ДНА–Диокс в отличие от ДНА–Докс не обладал гемолитической активностью при изученных концентрациях. Получены данные о наличии у ДНА–Диокс более выраженного по сравнению с ДНА–Докс прокоагулянтного эффекта (снижение тромбинового времени в диапазоне концентраций 1,5-0,75 г/л), что необходимо учитывать при дальнейшем изучении свойств данного конъюгата *in vivo*.

Таким образом, результаты проведенного эксперимента позволяют сделать заключение об отсутствии значимого влияния растворов дисперсий ДНА–Докс и ДНА–Диокс на показатели тромбоцитарного и плазмо-коагуляционного звена гемостаза и мембрану эритроцитов.

По-видимому, хорошая гемосовместимость обусловлена высоким сродством ДНА к белкам. Это предположение подтверждается литературными данными [111, 112, 113].

Известно, что в кровеносном русле погибшие клетки или бактерии подвергаются опсонизации, то есть на их поверхности адсорбируются белки плазмы крови, образуя «белковую корону». При системном введении наночастицы также подвергаются опсонизации [114].

Экспериментальным путем установлено, что при внесении наночастиц в сыворотку крови *in vitro* в формировании «белковой короны» активно участвует фибриноген. Было показано, что для фибриногена при его взаимодействии с наночастицами TiO_2 и CeO_2 константа скорости связывания была на два порядка больше, чем для сывороточного альбумина [115].

Наиболее распространенным белком плазмы крови человека является альбумин. Были предприняты попытки создания систем доставки на основе сывороточного альбумина человека, а также на основе более дешевого бычьего сывороточного альбумина и овальбумина [116, 117]. ЧСА имеет несколько сайтов связывания лигандов, которые могут быть использованы для переноса посредством как гидрофобных, так и электростатических взаимодействий [118], а наличие свободного остатка цистеина на его поверхности означает, что альбумин

легко конъюгирует с различными лигандами [119, 120, 156]. При некоторых видах рака на поверхности опухолевых клеток отмечается сверхэкспрессия рецепторов белка альбондина (Gp60) и кислого секретлируемого белка, богатого цистеином (SPARC, Secreted protein acidic and rich in cysteine) [121], которые опосредуют трансцитоз альбумина [122]. В транспорте альбумина также участвуют рецепторы Gp30 и Gp18, комплекс мегалин/кубилилин и неонатальные Fc-рецепторы (FcRn) [120]. Таким образом, системы доставки на основе альбумина могут накапливаться в опухолях с помощью механизмов, выходящих за рамки EPR эффекта. Наиболее известным методом получения частиц на основе альбумина является запатентованная технология NAB [120]. С помощью данной технологии был получен препарат Абрахане®, который успешно применяется в клинической практике [123, 124], и продолжаются исследования по созданию ряда нано-препаратов на основе альбумина [125, 126, 127].

В нашем исследовании были получены данные, свидетельствующие о том, что ДНА–Докс образует более прочный комплекс с альбумином в субдомене IIIA и менее прочные комплексы в субдоменах IV, IIA. ДНА–Диокс образует более прочный комплекс с альбумином в субдомене IIIA и менее прочный комплекс в субдомене IV.

Такое высокое сродство достигается благодаря формированию электростатических, водородных связей и гидрофобных взаимодействий между поверхностью ДНА и альбумином. Образование «белковой короны» эффективно предотвращает повреждение мембран эритроцитов и активацию свертывания крови. Другим преимуществом эффекта «белковой короны» является то, что благодаря этому явлению уменьшается агрегация НА в фосфатно-солевом и других биологических буферах.

Перспективы применения ДНА в биомедицине требуют всестороннего и глубокого изучения их влияния на системы живого организма. Наличие различных функциональных групп на поверхности ДНА обеспечивает возможность присоединения различных молекул, выполняющих роль

терапевтических агентов [129].

В настоящее время препараты антрациклинового ряда, в частности, «Доксорубин» (Докс) (Международное непатентованное название Доксорубин) остаются одними из наиболее эффективных химиотерапевтических средств. Вместе с тем антрациклины обладают способностью вызывать у больных развитие выраженной кардиотоксичности и химиорезистентности [15]. Установлено, что уже на ранних стадиях кардиотоксичности, вызванной Докс, развивается митохондриальная дисфункция, которая приводит к апоптозу кардиомиоцитов. Понимание ключевой роли митохондрий в кардиомиопатии, вызванной Докс, очень важно для снижения ограничений применения этого значимого противоопухолевого препарата для химиотерапии [128]. В отличие от Докс, какие-либо данные о влиянии Диокс на функции митохондрий отсутствуют.

В литературе представлены данные по изучению влияния ДНА на функции различных клеточных органелл, в т. ч. митохондрий, которые являются центральным звеном в энергетическом метаболизме клетки. Так, в работе [130] по изучению влияния особенностей химического состава поверхности модифицированных ДНА на мембранный потенциал изолированных митохондрий было установлено, что ДНА, в особенности гидрированные и хлорированные, приводили к снижению мембранного потенциала митохондрий только после добавления их в большом количестве (≥ 1 мг/мл). Наименьшее влияние на мембранный потенциал митохондрий оказывали карбоксилированные ДНА и очищенные от металлических примесей исходные ДНА.

Известно, что АТФ-синтазный комплекс F_1F_0 имеет ключевое значение в синтезе АТФ в клетке [131]. Несмотря на то, что известно более 300 природных и синтетических молекул, способных связываться с F_1F_0 или ингибировать этот комплекс [132], сравнительное изучение их участия в регуляции энергетического обмена началось недавно [133]. На сегодняшний день рассматриваются пути регуляции гидролитической активности F_1F_0 как одного из подходов к созданию

нового класса противоопухолевых препаратов [134].

В настоящем исследовании в качестве модели митохондриальной мембраны использовали протеолипосомы, содержащие рекомбинантную F_1F_0 АТФазу *E. coli* (число оборотов фермента около 700 сек^{-1} при 37°C) [99]. Гидролиз АТФ данным препаратом протеолипосом приводит к генерации протонного градиента на мембране. Для детектирования протонного градиента использовался АСМА. Данный краситель относится к флуоресцентным аминам, которые широко применяются для измерения трансмембранного градиента концентрации протонов в естественных и искусственных мембранных системах. Согласно модели Шульдинера и соавт. [135], амины свободно диффундируют через мембрану в нейтральной форме и перераспределяются между водной фазой внутри липосом и внешней водной фазой. Движущей силой может быть градиент электрохимического потенциала между протонированной и депротонированной формами аминов. При генерации протонного градиента (то есть при снижении рН внутри протеолипосом) происходит аккумуляция флуоресцентных аминов во внутренней водной фазе, что ведет к тушению их флуоресценции.

В результате проведенных исследований было установлено, что как ДНА, так и ДНА–Докс и ДНА–Диокс обладают ингибирующими свойствами на АТФазу. При этом индивидуальные препараты не проявляли подобных свойств, из чего следует, что наблюдаемый эффект целиком связан только с ДНА. Также установлена способность ДНА ингибировать АТФазу.

Наряду с другими факторами, мембранный митохондриальный потенциал $\Delta\Psi_m$ играет ключевую роль в митохондриальном гомеостазе за счет избирательного удаления дисфункциональных митохондрий. $\Delta\Psi_m$ также является движущей силой для транспорта других ионов (помимо H^+) и белков, которые необходимы для функционирования митохондрий [136].

Уровни $\Delta\Psi_m$ и АТФ в клетке остаются относительно стабильными, хотя небольшие колебания этих параметров отражают клеточную физиологическую активность. Однако постоянные изменения $\Delta\Psi_m$ и АТФ являются причиной

нарушения энергетического баланса клетки и могут стать причиной различных патологий.

В эксперименте по влиянию на митохондриальный мембранный потенциал ДНА–Докс снижал уровень $\Delta\Psi_m$ значительно сильнее по сравнению с индивидуальным препаратом (интенсивность флуоресценции по отношению к контролю составила $6,9\pm 0,9$ % и $52,2\pm 7,1$ %, соответственно). Как известно, Докс восстанавливается с участием комплекса I митохондрий, образуя семихинон, который, являясь донором электрона, взаимодействует с молекулой кислорода, генерируя супероксидный анион-радикал [137].

Снижение митохондриального мембранного потенциала обусловлено, по-видимому, повреждением мембраны (и дыхательной цепи) активными формами кислорода. Также можно предположить возможность ингибирования ферментов дыхательной цепи, приводящего к снижению протонного градиента. При этом, учитывая полученные нами данные по влиянию ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli*, эффект их действия как разобщителей маловероятен.

В эксперименте по влиянию на митохондриальный мембранный потенциал конъюгаты ДНА–Докс снижали мембранный потенциал значительно сильнее, чем ДНА или Докс ($6,9\pm 0,9$ %, $30,4\pm 4,6$ % и $52,2\pm 7,1$ %, соответственно). По-видимому, это связано с формированием бинарного эффекта, т. е. комбинацией ингибирующего эффекта ДНА на АТФазу и Докс-зависимой генерацией активных форм кислорода.

В настоящем исследовании обнаружена способность Докс уменьшать уровень мембранного митохондриального потенциала, не оказывая при этом влияния на активность АТФазы.

Диокс не оказывал влияния на величину $\Delta\Psi_m$ ($83,1\pm 13,8$ %). Для ДНА и ДНА–Диокс получены сопоставимые результаты ($30,4\pm 4,6$ % и $27,9\pm 5,1$ %), что позволяет объяснить снижение уровня $\Delta\Psi_m$ при добавлении ДНА–Диокс только ингибирующим эффектом наноалмазов на АТФазу.

Полученные нами данные об отсутствии ингибирующих свойств у Докс и Диокс (модель – протеолипосомы) в отличие от ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс позволяют оценить степень влияния ДНА в качестве носителя на биоэнергетику клетки.

В литературе отмечается высокий интерес исследователей к Докс (в том числе к его липосомальной форме) для лечения опухолей ЦНС [138, 139, 140, 141, 142]. Предпосылками к этому являются результаты немногочисленных исследований *in vitro* / *in vivo*, доказывающих возможность преодоления ГЭБ путем включения Докс в наноразмерные лекарственные формы. [143, 144, 145].

Также у Докс установлена потенциальная противоопухолевая активность в отношении глиобластомы [146]. Вместе с тем, для лечения глиобластом Докс не применяется, поскольку, являясь субстратом Р-гликопротеина, он не проникает через гематоэнцефалический барьер в терапевтически значимых концентрациях.

Диокс также рассматривается как препарат с потенциальной активностью для лечения глиобластом. В работе [147] предпринята попытка создания наноформы Диокс в составе наногелей для потенциального лечения глиобластомы. Для создания системы использовали сополимер полиэтиленгликоля и полиметакриловой кислоты в качестве носителя диоксидета и два типа сшивающих агентов: неразлагаемый этилендиамин и биоразлагаемый цистамин, содержащий дисульфидную связь. Было установлено, что загруженные диоксидетом наногели имеют относительно высокий уровень грузочной способности (>35% масс.) и эффективность загрузки (>75%). Показано, что наногели с биodeградируемыми сшивками склонны к диссоциации в присутствии восстановителя (глутатион), что позволяет снизить значения IC₅₀ препарата по сравнению с наногелями с этилендиаминовыми сшивками. Конфокальный анализ клеток глиобластомы показал, что оба типа наногелей накапливаются в клетках и локализуются в лизосомах. Эти результаты показывают, что загрузка диоксидета в наночастицы может улучшить их эффективность; такая формула перспективна для дальнейших исследований и практического применения.

В качестве направления модификации лекарственной формы может выступать создание наноразмерных систем доставки, которые могли бы преодолевать ГЭБ и эффективно доставлять противоопухолевые препараты в мозг. Клиническому применению липосом может препятствовать низкая физическая стабильность [148]. Поэтому интерес исследователей смещается в сторону наночастиц, на поверхности которых могут быть иммобилизованы БАВ. Среди наноматериалов, предложенных на роль носителей, особое место занимают наноалмазы, обладающие способностью проникать через биобарьеры, включая гематоэнцефалический.

В настоящем исследовании на клеточной модели глиобластомы линии T98G показано, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс демонстрируют большую цитотоксичность при меньшей концентрации Докс и Диокс в составе конъюгатов по сравнению с индивидуальными препаратами; при этом цитотоксический эффект ДНА–Диокс статистически значимо превосходил ДНА–Докс при всех изученных концентрациях.

Таким образом, разработка модифицированных нано препаратов, способных преодолевать ГЭБ, является ключевым моментом в подходе к терапии и диагностике глиом и глиобластом. Для этого необходимо, чтобы нано препараты были проверены на эффективность в доклинических исследованиях на моделях животных с ксенотрансплантатом глиальной опухоли головного мозга, где присутствуют все реальные компоненты ГЭБ.

Состав «белковой короны» влияет на свойства поверхности наночастиц, что определяет скорость их выведения из организма, интернализацию в клетки определенного типа, распределение между органами [114]. Опсонизированные наночастицы распознаются и захватываются путем эндоцитоза макрофагами. Помимо фагоцитоза, существует еще четыре основных механизма интернализации наночастиц в эукариотические клетки: макропиноцитоз, клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-опосредованный эндоцитоз и клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз.

Существуют различные предположения относительно механизма проникновения ДНА в клетку [149]. Несомненно, на данный процесс оказывают влияние размер наноалмазных частиц, модифицированная поверхность, внутриклеточная среда и тип клеток. Так, было установлено, что ДНА с размерами 25 – 30 нм поглощаются клеткой преимущественно путем рецептор-опосредованного и клатрин-зависимого механизмов [150]. Проникновение ДНА с размерами 140 нм ингибируется специфическим ингибитором клатрина оксидом фениларсина; с другой стороны, филиппин, специфический ингибитор кавеолина, не дает подобного результата. В работе [151] авторы установили, что ДНА размером 100 нм, конъюгированные с трансферрином, захватываются многочисленными трансферриновыми рецепторами на поверхности клеток HeLa по клатринзависимому механизму. С другой стороны, в работе [152] ДНА того же размера, конъюгированные с гормоном роста, не проникали в клетки A549. Могут быть задействованы и иные рецептор-опосредованные механизмы проникновения. Например, ДНА, конъюгированные с фолатом, захватываются клетками путем кавеолин-зависимого эндоцитоза [153].

В результате проведенного исследования установлено, что преимущественным механизмом эндоцитоза, по которому ДНА–Докс и ДНА–Диокс проникают в клетки HeLa, является актин-зависимый механизм, а для ДНА–Докс возможен еще и клатрин-зависимый путь эндоцитоза.

Чтобы избежать преувеличения значимости результатов исследований *in vitro* для оценки перспективности использования наночастиц, необходимо доказать их безопасность и эффективность *in vivo*.

Так, в своей работе Wang et al [155] на собаках породы бигль проводили сравнение токсических эффектов Докс, ДНА и ДНА–Докс при внутривенном введении и введении в печеночную воротную вену. В результате анализа показателей крови и мочи были получены данные о том, что использование ДНА в качестве платформы доставки Докс значительно снижает токсичность

цитостатика, что делает целесообразными дальнейшие доклинические исследования по оценке безопасности ДНА–Докс-терапии на крупных животных.

Таким образом, конъюгаты ДНА–Докс и ДНА–Диокс представляют собой пример того, что химиотерапевтические препараты в конъюгированной наноформе могут отличаться по молекулярно-клеточному механизму действия от своей свободной формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные литературные источники свидетельствуют о том, что конъюгаты противоопухолевых препаратов на основе ДНА обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными цитостатиками.

В результате проведенного нами исследования было установлено, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс не оказывали воздействия на плазмо-коагуляционный гемостаз, функциональную активность тромбоцитов и мембрану эритроцитов. Также конъюгаты ДНА–Докс и ДНА–Диокс способны связываться с альбумином благодаря наличию в их составе ДНА. Все эти свойства обеспечиваются хорошей гемосовместимостью конъюгатов.

При изучении влияния ДНА–Докс и ДНА–Диокс на функцию митохондрий, а именно: на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli* (модель - протеолипосомы) и величину мембранного митохондриального потенциала (модель - культура клеток PANC-1) установлено, что ингибирующий эффект конъюгатов обусловлен присутствием ДНА в их составе. Показано, что ДНА–Докс по сравнению с ДНА–Диокс статистически значимо снижал митохондриальный мембранный потенциал, что, по-видимому, также обусловлено ингибирующим эффектом ДНА в совокупности с Докс-зависимой генерацией активных форм кислорода. Полученные данные позволяют оценить степень влияния ДНА в качестве носителя на биоэнергетику клетки.

При исследовании цитотоксических свойств ДНА–Докс и ДНА–Диокс на клеточной модели глиобластомы линии T98G были получены интересные результаты, свидетельствующие о том, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс демонстрируют большую цитотоксичность при меньшей концентрации Докс и Диокс в составе конъюгатов по сравнению с индивидуальными препаратами; при этом цитотоксический эффект ДНА–Диокс статистически значимо превосходил ДНА–Докс при всех изученных концентрациях.

Как известно, опухолевые клетки обладают высокой устойчивостью к проникновению химиотерапевтических агентов.

Полученные нами результаты о том, что ДНА–Докс и ДНА–Диокс поступают в клетки HeLa преимущественно с помощью неспецифического актин-зависимого механизма, а для ДНА–Докс возможен еще и клатрин-зависимый путь эндоцитоза, позволяют рассматривать возможность применения данных конъюгатов для интратуморального введения.

При переходе от исследований биологических свойств *in vitro* к моделям опухолевого роста *in vivo* и далее к клиническому изучению эффектов конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс, безусловно, встанет вопрос о стандартизации ДНА, а также об улучшении стабильности и снижении потенциальной токсичности полученных комплексов. Все это отодвигает возможное клиническое внедрение систем доставки химиопрепаратов на основе ДНА, но не отрицает актуальность их экспериментального исследования.

ВЫВОДЫ

1. Отсутствие влияния конъюгатов на плазмо-коагуляционный гемостаз, функциональную активность тромбоцитов и мембрану эритроцитов, а также высокое сродство ДНА к альбумину определяет хорошую гемосовместимость ДНА–Докс и ДНА–Диокс.
2. ДНА–Докс и ДНА–Диокс оказывают ингибирующий эффект на АТФазу за счет ДНА (модель - протеолипосомы).
3. При длительной инкубации (модель - культура клеток PANC-1) ДНА–Докс по сравнению с ДНА–Диокс значительно снижает митохондриальный мембранный потенциал, что может быть обусловлено комбинацией ингибирующего эффекта ДНА и Докс-зависимой генерацией активных форм кислорода.
4. Для клеточной линии PANC-1 значения IC_{50} Докс и Диокс в составе конъюгата с ДНА существенно превышают IC_{50} индивидуальных цитостатиков;
В отношении клеточной линии HeLa значения IC_{50} цитостатиков в составе конъюгатов сопоставимы с IC_{50} индивидуальных препаратов;
Для клеточной линии глиобластомы T98G ДНА–Докс и ДНА–Диокс демонстрируют большую цитотоксичность при меньшей концентрации Докс и Диокс в составе конъюгатов по сравнению с индивидуальными препаратами; при этом ДНА–Диокс статистически значимо превосходит ДНА–Докс при всех изученных концентрациях.
5. Механизм эндоцитоза, по которому ДНА–Докс и ДНА–Диокс поступают в клетки HeLa, преимущественно является актин-зависимым, а для ДНА–Докс возможен еще и клатрин-зависимый путь.

Практические рекомендации

В результате проведенного исследования установлено, что Докс и Диокс в конъюгированной нано форме отличаются по биологическим свойствам от своих свободных форм. Использование данного эффекта позволит в перспективе разработать новый класс лекарственных средств, превосходящих традиционные цитостатики.

Благодаря своим свойствам ДНА могут быть использованы как энтеросорбент или как адсорбент для удаления с поверхности кожи токсичных соединений белковой и небелковой природы (продуктов метаболизма, токсинов, тяжелых металлов, радионуклидов, ксенобиотиков и т.п.), которые образуются при открытых посттравматических и ожоговых ранах, а также в косметологии. На сегодняшний день на рынке представлены 139 косметических продуктов, содержащих НА (www.cosmeticdatabase.com). В стоматологии возможно применение комбинации гуттаперчи с наноалмазами для защиты дезинфицированных корневых каналов после удаления нерва и пульпы.

После устранения ряда ограничений, касающихся токсичности конъюгатов цитостатиков с ДНА возможно в перспективе их применение для трансдермальной доставки лекарств, а также для интратуморальной химиотерапии злокачественных опухолей различной локализации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даниленко, В.В. Введение. Из истории открытия синтеза наноалмазов / В.В. Даниленко // Физика твердого тела. – 2004. – Т. 4. – С. 581.
2. The properties and applications of nanodiamonds // Nano-enabled medical applications / V. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi. – Jenny Stanford Publishing, 2020, P. 38.
3. Passeri, D. Biomedical Applications of Nanodiamonds: An Overview / D. Passeri, F. Rinaldi, C. Ingallina et al. // Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2015. – Vol. 15. – P. 972-988.
4. Chauhan, S. Nanodiamonds with powerful ability for drug delivery and biomedical applications: Recent updates on in vivo study and patents / S. Chauhan, N. Jain, U. Nagaich // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2020. – Vol. 10, N. 1. – P. 1-12.
5. Tinwala, H. Review. Production, surface modification and biomedical applications of nanodiamonds: A sparkling tool for theranostics / H. Tinwala, S. Wairkar // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – Vol. 97. – P. 913-931.
6. Fedel, M. Hemocompatibility of carbon nanostructures / M. Fedel // Journal Carbon Research. – 2020. – Vol. 6, N. 1. – P. 12.
7. Auría-Soro, C. Interactions of nanoparticles and biosystems: microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine / C. Auría-Soro, T. Nesma, P. Juanes-Velasco et al. // Nanomaterials. – 2019. – Vol. 9, N. 10. – P. 1365-1385.
8. Bondon, N. Nanodiamonds for bioapplications, recent developments / N. Bondon, L. Raehm, C. Charnay et al. // Journal Materials Chemistry B. – 2020. – Vol. 8, N. 48. – P. 10878-10896.
9. Яковлев, Р.Ю. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ / Р. Ю. Яковлев, А.С.

Соломатин, Н.Б. Леонидов и др. // Российский химический журнал. – 2012. – Т. 56. № (3-4). – С. 114-125.

10. Panwar, N. Nanocarbons for biology and medicine: sensing, imaging, and drug delivery / N. Panwar, A.M. Soehartono, K.K. Chan et al. // Chem. Rev. – 2019. – Vol. 119, N. 16. – P. 9559-9656.

11. Ali, M.S. Nanodiamonds: Minuscule gems that ferry antineoplastic drugs to resistant tumors / M.S. Ali, A.A. Metwally, R.H. Fahmy and R. Osman // Int. J. Pharm. – 2019. – Vol. 558. – P. 165-176.

12. Fu, X. Precise design strategies of nanomedicine for improving cancer therapeutic efficacy using subcellular targeting / X. Fu, Y. Shi, T. Qi et al. // Sig. Transduct. Target. Ther. – 2020. – Vol. 5. – P. 162-5.

13. Wang, P. Control of nanodiamond-doxorubicin drug loading and elution through optimized compositions and release environments / P. Wang, W. Su, X. Ding // Diamond Relat. Mater. – 2018. – Vol. 88. – P. 43-50.

14. Yuan, S.J. Doxorubicin-polyglycerol-nanodiamond conjugate is a cytostatic agent that evades chemoresistance and reverses cancer-induced immunosuppression in triple-negative breast cancer / S.J. Yuan, Y.H. Xu, C. Wang et al. // J. Nanobiotechnology – 2019. – Vol. 17. – P. 110-135.

15. Octavia, Y. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies / Y. Octavia, C.G. Tocchetti, K.L. Gabrielson et al. // Journal of molecular and cellular cardiology. – 2012. – Vol. 52, N. 6. – P. 1213-1225.

16. Рогов, Е.С. Исследование противоопухолевых препаратов в России: реалии и перспективы / Е.С. Рогов, А.Н. Полторацкий, Ю.В. Афончиков // Вестник РОСЗДРАВНАДЗОРА. – 2014. – № 4. – С. 41-47.

17. Stukov, A.N. Effect of dioxadet on tumors transplanted to the brain / A.N. Stukov, M.V. Korsakov, T.N. Khrapova et al. // Vopr. Onkol. – 1986. – Vol. 32, N. 10. – P. 64-67.

18. Li, T.F. Doxorubicin-polyglycerol-nanodiamond composites stimulate glioblastoma cell immunogenicity through activation of autophagy / T.F. Li, Y.H. Xu, K. Li et al. // *Acta. Biomater.* – 2019. – Vol. 86. – P. 381-394.
19. Adnan, A. Atomistic simulation and measurement of pH dependent cancer therapeutic interactions with nanodiamond carrier / A. Adnan, R. Lam, H. Chen et al. // *Mol. Pharmaceutics.* – 2011. – Vol. 8, N. 2. – P. 368-374.
20. Chow, E.K. Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment / E.K. Chow, X.Q. Zhang, M. Chen et al. // *Sci. Trans. Med.* – 2011. – Vol. 3, N. 73. – P. 1-10.
21. Zhu, H. Nanodiamond mediated co-delivery of doxorubicin and malaridine to maximize synergistic anti-tumor effects on multi-drug resistant MCF-7/ADR cells / H. Zhu, Y. Wang, A. Hussain et al. // *J. Mater. Chem. B.* – 2017. – Vol. 5, N. 19. – P. 3531-3540.
22. Li, H. Ultrasound-enhanced delivery of doxorubicin/all-trans retinoic acid-loaded nanodiamonds into tumors / H. Li, D. Zeng, Z. Wang et al. // *Nanomedicine.* – 2018. – Vol. 13, N. 9. – P. 981-996.
23. Ryu, T.K. Targeted tumor therapy based on nanodiamonds decorated with doxorubicin and folic acid / T.K. Ryu, S.W. Baek, G.J. Lee et al. // *Macromol. Biosci.* – 2017. – Vol. 17, N.2. – P. 1-8.
24. Immordino, M.L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential / M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel // *Int. J. Nanomedicine.* – 2006. – Vol. 1, N. 3. – P. 297-315.
25. Mohajeri, M. Biomedical applications of carbon nanomaterials: Drug and gene delivery potentials / M. Mohajeri, B. Behnam, A. Sahebkar // *J. Cellular Physiol.* – 2018. – Vol. 234, N. 1. – P. 298-319.
26. Shenderova, O.A. Ultra nanocrystalline diamond synthesis, properties and applications / O.A. Shenderova, D.M. Gruen – New York: William Andrew Publishing, 2006. – P. 333–404.

27. Кулакова, И.И. Структура частицы химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза / И.И. Кулакова, В.В.Корольков, Р.Ю. Яковлев и др. // Породоразрушающий и металлообрабатывающий инструмент - техника и технология его изготовления и применения. Сборник научных трудов. Выпуск 12. – Киев, 2009. С. 299-305.

28. Montalti, M. Nanodiamonds and silicon quantum dots: ultrastable and biocompatible luminescent nanoprobe for long-term bioimaging / M. Montalti, A. Cantelli, G Battistelli // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – Vol. 44, N. 14. – P. 4853-4921.

29. Aharonovich, I. Diamond photonics / I. Aharonovich, A. D. Greentree, S. Praver // *Nat. Photonics.* – 2011. – Vol. 5. – P. 397-405.

30. Яковлев, Р.Ю. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ / Р. Ю. Яковлев, А.С. Соломатин, Н.Б. Леонидов, и др. // *Российский химический журнал* – 2012. – Т. 56. № (3-4). – С. 114-125.

31. Badun, G.A. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method / G.A. Badun, M.G. Chernycheva, R.Y. Yakovlev et al. // *Radiochimica Acta.* – 2015. – Vol. 102, N. 10. – P. 941-946.

32. Yakovlev, R.Y. Interaction dynamics of the nanodiamond with living cells in culture / R.Y. Yakovlev, I.B. Alieva, N.B. Leonidov et al. // In book of abstract int. conf. advanced carbon nanostructures (ACNS). – Moscow. – 2011. – P. 206.

33. Zurbuchen, M.A. Nanodiamond Landmarks for Subcellular Multimodal Optical and Electron Imaging / M.A. Zurbuchen, M.P. Lake, S.A. Kohan et al. // *Scientific Reports.* – 2013. – Vol. 3, N 1. – P. 2668.

34. Liu, K.K. Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell / K.K. Liu, C.L. Cheng, C.C. Chang and J.I. Chao // *Nanotechnology.* – 2007. – Vol. 18. – P. 325102-325112.

35. Faklaris, O. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway / O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi et al. // *Small.* – 2008. – Vol. 4, N. 12. – P. 2236-2239.

36. Schrand, A.M. Are diamond nanoparticles cytotoxic? / A.M. Schrand, H.Huang, C. Carlson et al. // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111, N. 1. – P. 2-7.
37. Vaijayanthimala, V. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake / V. Vaijayanthimala, Y.K. Tzeng, H.C. Chang and C.L. Li // *Nanotechnology.* – 2009. – Vol. 20, N 42. – P. 425103-425112.
38. Yu, S.J. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity / S.J. Yu, M.W. Kang, H.C. Chang et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127, N 50. – P. 17604-17605.
39. Karpukhin, A.V. Effect of detonation nanodiamonds on phagocyte activity / A.V. Karpukhin, N.V. Avkhacheva, R.Yu. et al. // *Cell Biol. Int.* – 2011. – Vol. 35, N 7. – P. 727-733.
40. Долматов, В.Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза. Получение, свойства, применение / В.Ю. Долматов. – СПб.: Изд. СПбГПУ, 2003. – 344 с.
41. Zhang, X. Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation / X. Zhang, J. Yin, C. Kang et al. // *Toxicol. Let.* – 2010. – Vol. 198, N. 2. – P. 237 – 243.
42. Yuan, Y. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / Y. Yuan, X. Wang, G. Jia et al. // *Diamond Relat. Mater.* – 2010. – Vol. 19, N. 4. – P. 291-299.
43. Жуков, Е.Л. Реакция внутренних органов кроликов на внутривенное введение наноалмазов / Е.Л. Жуков, Н.Н. Медведева // *Современные проблемы науки и образования.* – 2015. – № 6. – С. 1-8.
44. Яковлев, Р.Ю. А.А. Елисеев, Н.Б.Леонидов, Д.Р. Ракита, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Г.В. Лисичкин. Способ количественного определения углеродных наноструктур в биологических образцах и их распределения в организме // Патент РФ № 2528096. 2014.

45. Dimarco, A. Experimental studies of the antineoplastic activity of a new antibiotic, daunomycin / A. Dimarco, M. Gaetani, L. Dorigotti et al. // *Tumori*. – 1963. – Vol. 49. – P. 203.
46. Šimůnek T. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron / T. Šimůnek, M. Stérba, O. Popelová et al. // *Pharmacological reports*. – 2009. – Vol. 61, N. 1. – P. 154-171.
47. Shevchuk, O.O. Theoretical ground for adsorptive therapy of anthracyclines cardiotoxicity / O.O. Shevchuk, E.A.Posokhova, L.A. Sakhno, and V.G. Nikolaev // *Exp. Oncol*. – 2012. – Vol.34, N. 4. – P. 314-322.
48. Kiyomiya, K. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex / K. Kiyomiya, S. Matsuo, M. Kurebe // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61. – P. 2467-2471.
49. Frederick, C.A. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin / C.A. Frederick, L.D. Williams, G. Ughetto et al. // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29, N. 10. – P. 2538-2549.
50. Nicoletto, R.E. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells / R.E. Nicoletto, M.C. Ofner // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2022. – Vol. 89. – P. 285-311.
51. Quiles, J.L. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity / J.L. Quiles, J.R. Huertas, M. Battino et al. // *Toxicology*. – 2002. – Vol. 180. – P. 79-95.
52. Filov, V.A. Study of antitumor action of Dioxadet / V.A.Filov, A.N. Stukov, L.L. Malyukuna and B.A. Ivin // *Exper. Oncol*. – 1996. – Vol. 18, N. 1. – P. 84-86.
53. Voeikov, R. Dioxadet-loaded nanogels as a potential formulation for glioblastoma treatment / R.Voeikov, T. Abakumova, N. Grinenko et al. // *J. Pharm. Investig*. – 2017. – Vol. 47, N. 1. – P. 75-83.
54. Bupalov, V. G. Synergism of antitumor action of dioxadet and cisplatin in model of ascitic ovarian tumor / V.G. Bupalov, A.A. Zhabin, A.N. Stukov et al. // *Sib. J. Oncol*. – 2013. – Vol. 1. – P. 42-46.

55. Zhikhoreva, A. A. Morphological changes in the ovarian carcinoma cells of Wistar rats induced by chemotherapy with cisplatin and dioxadet / A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, V.G. Beshpalov et al. // *Biomed. Opt. Express.* – 2018. – Vol. 9, N. 11. – P. 5817.
56. Latipova, D.K. Synergism of antitumor activity of gemcitabine and dioxadet in mice with ascitic Ehrlich's tumor / D.K. Latipova, M.L. Gershanovich, A.N. Stukov et al. // *Vopr. Onkol.* – 2011. – Vol. 57, N. 6. – P. 767-770.
57. Beshpalov, V.G. Both heat and new chemotherapeutic drug dioxadet in hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion improved survival in rat ovarian cancer model / V.G. Beshpalov, G.S. Kireeva, O.A. Belyaeva et al. // *J. Surg. Oncol.* – 2016. – Vol. 113, N. 4. – P. 438-442.
58. Gershanovich, M.L. Multicenter clinical trial of the antitumor drug Dioxadet (phase II) / M.L. Gershanovich, V.A. Filov, D.G.Kotova et al. // *Vopr. Oncol.* – 1998. – Vol. 44, N. 2. – P. 216-220.
59. Borisov, A.E. Use of dioxadet for chemiembolization of the hepatic artery in primary and metastatic liver cancer / A.E. Borisov, M.L. Gershanovich, V.P. Zemlianoï et al. // *Vopr. oncol.* – 1998. – Vol. 44, N. 6. – P. 714-717.
60. Granov, A.M. Results of the use of endovascular interventions (embolization and chemoembolization) in the treatment of operable and advanced kidney cancer / A.M. Granov, A.I. Gorelov, M.L. Gershanovich et al. // *Vopr. oncol.* – 1998. – Vol. 44, N. 6. – P.711-714.
61. Stukov, A.N. Antineoplastic drugs. / A.N. Stukov, M.L. Gershanovich, M.A. Blank et al. // *In: NIKA.* – 2011. – P. 656.
62. Salaam, A. D. Nanodiamonds enhance therapeutic efficacy of doxorubicin in treating metastatic hormone-refractory prostate cancer / A.D. Salaam, P.T.J. Hwang, A.Poonawalla et al. // *Nanotechnology.* – 2014. – Vol. 25, N. 42. – P. 425103.
63. Zhang, X. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond / X. Zhang, W. Hu, J. Li et al. // *Toxicology Research.* – 2012. – Vol. 1. – P. 62-68.

64. Liu, K. K. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy / K.K. Liu, W.W. Zheng, C.C. Wang et al. // *Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 21, N. 31. – P. 315106.
65. Toh, T.B. Nanodiamond-Mitoxantrone complexes enhance drug retention in chemoresistant breast cancer cells / T.B. Toh, D.K. Lee, W. Hou et al. // *Mol. Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 11, N. 8. – P. 2683-2691.
66. Zhao, W. Enhanced anticancer activity of an intracellularly activatable nanomedicine based on GLYlated nanodiamond / W. Zhao, S. Wei, H. Zhao et al. // *Diamond Relat. Mater.* – 2017. – Vol. 77. – P. 171-180.
67. Liu, K.K. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy / K.K. Liu, W.W. Zheng, C.C. Wang et al. // *Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 21. – P. 315106-315120.
68. Ryu, T.K. Targeted tumor therapy based on nanodiamonds decorated with doxorubicin and folic acid / T.K. Ryu, S.W. Baek, G.J. Lee et al. // *Macromol. Biosci.* – 2017. – Vol. 17. – P. 1600180-1600188.
69. Lu, M. PEG Grafted-Nanodiamonds for the delivery of gemcitabine / M. Lu, Y.K. Wang, J. Zhao et al. // *Macromol. Rapid Commun.* – 2016. – Vol. 37. – P. 2023-2029.
70. Zhao, J. Delivery of amonafide from fructose-coated nanodiamonds by oxime ligation for treatment of human breast cancer / J. Zhao, M. Lu, H. Lai et al. // *Biomacromolecules*. – 2018. – Vol. 19. – P. 481-489.
71. Chen, M. Nanodiamond-mediated delivery of water-insoluble therapeutics / M. Chen, E.D. Pierstorff, R. Lam et al. // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 3. – P. 2016-2022.
72. Huang, H. Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery / H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa and D.Ho // *Nano Lett.* – 2007. – Vol. 7. – P. 3305-3314.
73. Li, J. Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug / J. Li, Y. Zhu, W. Li et al. // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – P. 8410-8418.

74. Moore, L. Diamond-lipid hybrids enhance chemotherapeutic tolerance and mediate tumor regression / L. Moore, E.K. Chow, E. Osawa et al. // *Adv. Mater.* – 2013. – Vol. 25. – P. 3532-3541.
75. Li, Y. In vivo enhancement of anticancer therapy using bare or chemotherapeutic drug-bearing nanodiamond particles / Y. Li, Y. Tong, R. Cao et al. // *Int. J. Nanomed.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1065-1082.
76. Zhang, X.Q. Multimodal nanodiamond drug delivery carriers for selective targeting, imaging, and enhanced chemotherapeutic efficacy / X.Q. Zhang, R. Lam, X. Xu et al. // *Adv. Mater.* – 2011. – Vol. 23. – P. 4770-4775.
77. Guan, B. Nanodiamond as the pH-Responsive vehicle for an anticancer drug / B. Guan, F. Zou, J. Zhi // *Small.* – 2010. – Vol. 6. – P. 1514-1519.
78. Alhaddad, A. Nanodiamond as a vector for siRNA delivery to Ewing sarcoma cells / A. Alhaddad, M.P. Adam, J. Botsoa et al. // *Small.* – 2011. – Vol. 7. – P. 3087-3095.
79. Lin, Y.W. Co-delivery of paclitaxel and cetuximab by nanodiamond enhances mitotic catastrophe and tumor inhibition / Y.W. Lin, E.N. Raj, W.S. Liao et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 9814.
80. Wang, X. Epirubicin-adsorbed nanodiamonds kill chemoresistant hepatic cancer stem cells / X. Wang, X.C. Low, W. Hou et al. // *ACS Nano.* – 2014. – Vol. 8. – P. 12151-12166.
81. Ho, D. Nanodiamonds: the intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine / D. Ho, C.H. Wang, E.K. Chow. // *Sci. Adv.* – 2015. – Vol. 1, N. 7. – P. 1500439.
82. Křivohlavá, R. Knockdown of microRNA-135b in mammary carcinoma by targeted nanodiamonds: potentials and pitfalls of in vivo applications / R. Křivohlavá, E. Neuhöferová, K.Q. Jakobsen and V. Benson // *Nanomaterials (Basel).* – 2019. – Vol. 9, N. 6. – P. 866.

83. Madamsetty, V. S. Tumor selective uptake of drug-nanodiamond complexes improves therapeutic outcome in pancreatic cancer / V. S. Madamsetty, A. Sharma, M. Toma et al. // *Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 18. – P. 112-121.
84. Hoang, T.T. The importance of Poly(ethylene glycol) alternatives for overcoming PEG immunogenicity in drug delivery and bioconjugation / T.T. Hoang, E.H. Pilkington, D.H. Nguyen et al. // *Polymers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12. – P. 298.
85. Tsai, L.W. Nanodiamonds for medical applications: interaction with blood in vitro and in vivo / L.W. Tsai, Y.C. Lin, E. Perevedentseva, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17. – P. 1111.
86. Li, L. Stem cell quiescence / L. Li, R. Bhatia // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. – P. 4936-4941.
87. Saha, S. Death by design: where curcumin sensitizes drug-resistant tumours / S. Saha, A. Adhikary, P. Bhattacharyya et al. // *Anticancer Res.* – 2012. – Vol. 32. – P. 2567-2584.
88. Sotiropoulou, P.A. Chemical approaches to targeting drug resistance in cancer stem cells / P.A. Sotiropoulou, M.S. Christodoulou, A. Silvani et al. // *Drug Discov Today*. – 2014. – Vol. 19. – P. 1547-1562.
89. Vinogradov, S. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine / S. Vinogradov, X.Wei // *Nanomedicine (Lond)*. – 2012. – Vol. 7. – P. 597-615.
90. Hill, C. The importance of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in cancer drug resistance / C. Hill, Y. Wang // *Cancer Drug Resist.* – 2020. – Vol. 3, N. 1. – P. 38-47.
91. Wang, Y. Cell-mediated immune resistance in cancer / Y. Wang, E. Hays, M. Rama and B. Bonavida // *Cancer Drug Resist.* – 2020. – Vol. 3, N. 2. – P. 232-251.
92. Chan, M.S. Cancer-cell-specific mitochondria-targeted drug delivery by dual-ligand-functionalized nanodiamonds circumvent drug resistance / M.S. Chan, L.S. Liu, H.M. Leung and P.K. Lo // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2017. – Vol. 9. – P. 11780-11789.

93. Setyawati, M.I. Tuning endothelial permeability with functionalized nanodiamonds / M.I. Setyawati, V.N. Mochalin, D.T. Leong // ACS Nano. – 2016. – Vol. 10. – P. 1170-1181.
94. Man, H.B. Synthesis of nanodiamond-daunorubicin conjugates to overcome multidrug chemoresistance in leukemia / H.B. Man, H. Kim, H.J. Kim et al. // Nanomedicine. – 2014. – Vol. 10. – P. 359-369.
95. Zhang, Z. The use of lipid-coated nanodiamond to improve bioavailability and efficacy of sorafenib in resisting metastasis of gastric cancer / Z. Zhang, B. Niu, J. Chen et al. // Biomaterials. – 2014. – Vol. 35. – P. 4565-4572.
96. Du, X.A. tumor-targeted, intracellular activatable and theranostic nanodiamond drug platform for strongly enhanced *in vivo* antitumor therapy / X. Du, L. Li, S. Wei et al. // J. Mater Chem. B. – 2020. – Vol. 8. – P. 1660.
97. Chang, L.Y. Confirmation of the electrostatic self-assembly of nanodiamonds / L.Y. Chang, E. Osawa, A.S Barnard // Nanoscale. – 2011. – Vol. 3. – P.958-962.
98. Gismondi, A. Nanodiamonds coupled with plant bioactive metabolites: a nanotech approach for cancer therapy / A. Gismondi, G. Reina, S. Orlanducci et al. // Biomaterials. – 2015. – Vol. 38. – P. 22-35.
99. Ishmukhametov, R.R. Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase / R.R. Ishmukhametov, M.A. Galkin, S.B. Vik // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – Vol. 1706. – P. 110-116.
100. Puzyr, A. P. Destruction of human blood cells in interaction with detonation nanodiamonds in experiments in vitro / A.P. Puzyr, D.A. Neshumayev, S.V. Tarskikh et al. // Biofizika. – 2005, N. 1. – Vol. 50. – P. 101-106.
101. Kumari, S. Nanodiamonds activate blood platelets and induce thromboembolism / S. Kumari, M.K. Singh, S.K. Singh et al. // Nanomedicine. – 2013. – Vol. 9. – P. 427-440.
102. Макаревич, Д.А. Оценка гемосовместимости иммобилизованных наноалмазов детонационного синтеза *in vitro* / Д.А. Макаревич, Т.В. Рябцева, Н.Н.

Ковганко и др. // Актуальные проблемы биохимии: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием / под ред. В. В Лелевич. – Гродно: ГрГМУ, 2021. – С.170-173.

103. Борисова, А.Г. Тромбогенность углеродных наночастиц шунгита *in vitro* / А.Г. Борисова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2018. – Т. 6. – С. 109-114.

104. Hung-Cheng, L. The hemocompatibility of oxidized diamond nanocrystals for biomedical applications / L. Hung-Cheng, H. Feng-Jen, C. Ching-Pin et al. // *Sci Rep.* – 2013. – Vol. 25, N. 3. – P. 3044.

105. Magnus, N. Oncogenes and the coagulation system – forces that modulate dormant and aggressive states in cancer / N. Magnus, E. D’Asti, B. Meehan et al. // *Thromb. Res.* – 2014. – Vol. 133. – P. 1-9.

106. Falanga, A. Hemostatic biomarkers in cancer progression / A. Falanga, M. Marchetti // *Thromb Res.* – 2018. – Vol. 164. – P. 54-61.

107. Chang, H.M. Cardiovascular complications of cancer therapy / H.M. Chang, T.M. Okwuosa, T. Scarabelli et al. // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2017. – Vol. 70, N. 20. – P. 2552-6255.

108. Lee, A. Treatment of cancer-associated thrombosis: perspectives on the use of novel oral anticoagulants / A. Lee, M. Carrier // *Thrombosis Research.* – 2014. – Vol. 133. – P. 167-171.

109. Liao, K.H. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts / K.H. Liao, Y.S. Lin, C.W. Macosko et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2011. – Vol. 3. – P. 2607-2615.

110. Rozhkov, S.P. Interaction of shungite carbon nanoparticles with blood protein and cell components / S.P. Rozhkov, A.S. Goryunov // *Russian Journal of General Chemistry.* – 2013. – Vol. 83, N. 13. – P. 2585-2595.

111. Kong, X.L. High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis / X.L. Kong, L.C.L. Huang, C.M. Hsu et al. // *Anal. Chem.* – 2005. – Vol. 77. – P. 259-265.

112. Chen, W.H. Solid phase extraction and elution on diamond (SPEED): A fast and general platform for proteome analysis with mass spectrometry / W.H. Chen, S.C. Lee, S. Sabu et al. // *Anal. Chem.* – 2006. – Vol. 78. – P. 4228-4234.

113. Zou, Y. Effect of protein corona on mitochondrial targeting ability and cytotoxicity of triphenylphosphonium conjugated with polyglycerol-functionalized nanodiamond / Y. Zou, M. Nishikawa, H.G. Kang et al. // *Mol. Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 18. – P. 2823-2832.

114. Obst, K. Protein corona formation on colloidal polymeric nanoparticles and polymeric nanogels: impact on cellular uptake, toxicity, immunogenicity, and drug release properties / K. Obst, G. Yealland, B. Balzus et al. // *Biomacromolecules.* – 2017. – Vol. 18, N. 6. – P. 1762-1771.

115. Canoa, P. A quantitative binding study of fibrinogen and human serum albumin to metal oxide nanoparticles by surface plasmon resonance / P. Canoa, R. Simon-Vazquez, J. Popplewell et al. // *Biosens Bioelectron.* – 2015. – Vol. 74. – P. 376-383.

116. Elzoghby, A.O. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems / A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy // *J. Control. Release.* – 2012. – Vol. 157. – P. 168-182.

117. Solanki, R. Anticancer nano-delivery systems based on bovine serum albumin nanoparticles: A critical review / R. Solanki, H. Rostamabadi, S. Patel and S.M. Jafari // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2021. – Vol. 193. – P. 528-540.

118. Yang, F. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin / F. Yang, Y. Zhang, H. Liang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 3580-3595.

119. Kratz, F. Probing the cysteine-34 position of endogenous serum albumin with thiol-binding doxorubicin derivatives. Improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin / F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann et al. // *J. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 45. – P. 5523-5533.

120. Larsen, M.T. Albumin-based drug delivery: Harnessing nature to cure disease / M.T. Larsen, M. Kuhlmann, M.L. Hvam and K.A. Howard // *Mol. Cell. Ther.* – 2016. – Vol. 4. – P. 3.

121. An, F.F. Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery / F.F. An, X.H. Zhang // *Theranostics.* – 2017. – Vol. 7. – P. 3667-3689.

122. Sande, V. Albumin-based cancer therapeutics for intraperitoneal drug delivery: A review / V. Sande, S. Cosyns, W. Willaert and W. Ceelen // *Drug Deliv.* – 2020. – Vol. 27. – P. 40-53.

123. Kianfar, E. Protein nanoparticles in drug delivery: Animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles / E. Kianfar // *J. Nanobiotechnol.* – 2021. – Vol. 19. – P. 159.

124. Cortes, J. Nanoparticle albumin-bound (nabTM)-paclitaxel: Improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer / J. Cortes, C. Saura // *Eur. J. Cancer Suppl.* – 2010. – Vol. 8. – P. 1-10.

125. Saleh, T. Aptamer functionalized curcumin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles for targeted delivery to HER-2 positive breast cancer cells / T. Saleh, T. Soudi, S.A. Shojaosadati // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 130. – P. 109-116.

126. Prajapati, R. Albumin-based nanoparticles for the delivery of doxorubicin in breast cancer / R. Prajapati, E. Garcia-Garrido, Á. Somoza // *Cancers.* – 2021. – Vol. 13. – P. 3011.

127. Parodi, A. Albumin nanovectors in cancer therapy and imaging / A. Parodi, J. Miao, S.M. Soond // *Biomolecules.* – 2019. – Vol. 9. – P. 218.

128. Wallace, K. B. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy / K.B.Wallace, V.A. Sardão, P.J. Oliveira // *Circulation Research.* – 2020. – Vol. 126, N. 7. – P. 926-941.

129. Turcheniuk, K. Biomedical applications of nanodiamond (Review) / K. Turcheniuk, V. N. Mochalin // *Nanotechnology.* – 2017. – Vol. 28, N. 25. – P. 252001.

130. Соломатин, А.С. Изучение влияния модифицированных наноалмазов на мембранный потенциал изолированных митохондрий / А.С. Соломатин, Р.Ю. Яковлев, Н.И. Федотчева и Н.Б. Леонидов // Сборник Межрегиональной научной конференции РязГМУ им. академика И.П. Павлова (с международным участием) – Рязань, 2014. – С. 347-350.

131. Ватлин, А.А. F_0F_1 -АТФаза бактерий – наномотор для синтеза и гидролиза атф, механизм взаимодействия с макролидным антибиотиком олигомицином А / А.А. Ватлин, В.Н. Даниленко // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 3. – С. 231-243.

132. Hong, S. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas / S. Hong, P.L. Pedersen // MMBR. – 2008. – Vol. 72. – P. 590-641.

133. Ahmad, Z. A Therapeutic Connection between Dietary Phytochemicals and ATP Synthase / Z. Ahmad, S.S. Hassan, S. Azim // Current Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 24. – P. 3894-3906.

134. Winqvist, R.J. Targeting putative components of the mitochondrial permeability transition pore for novel therapeutics / R.J. Winqvist, V.K. Gribkoff // Biochemical Pharmacology. – 2020. – Vol. 177. – P. 113995.

135. D'Alessandro, M. Quantitative evaluation of the intrinsic uncoupling modulated by ADP and Pi in the reconstituted ATP synthase of Escherichia coli / M. D'Alessandro, P. Turina, B. A. Melandri // Biochim Biophys Acta. – 2011. – Vol. 1807. – P. 130-143.

136. Frantsiyants, E.M. Mitochondria of transformed cell as a target of antitumor influence / E.M. Frantsiyants, I.V. Neskubina, E.A. Sheiko // Research'n Practical Medicine Journal. – 2020 – Vol. 7, N. 2. – P. 92-108.

137. Mizutani, H. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper(II) and NADPH-cytochrome P450 reductase / H. Mizutani, S. Oikawa, Y. Hiraku et al. // Cancer Science. – 2003. – Vol. 94, N. 8. – P. 686-691.

138. Гареев, И.Ф. Наночастицы: новый подход в диагностике и терапии глиальных опухолей головного мозга / И.Ф. Гареев, О.А. Бейлерли, В.Н. Павлов и др. // Креативная хирургия и онкология. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 66-74.

139. Cheng, Y. Blood–brain barrier permeable gold nanoparticles: an efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging / Y. Cheng, Q. Dai, R.A. Morshed et al. // *Small*. – 2014. – Vol. 10, N. 24. – P. 5137-5150.

140. Pang, L. Exploiting macrophages as targeted carrier to guide nanoparticles into glioma / L. Pang, J. Qin, L. Han et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, N. 24. – P. 37081-37091.

141. Fabel, K. Long-term stabilization in patients with malignant glioma after treatment with liposomal doxorubicin / K. Fabel, J. Dietrich, P. Hau et al. // *Cancer*. – 2001. – Vol. 92, N. 7. – P. 1936-1942.

142. Hau, P. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma / P. Hau, K. Fabel, U. Baumgart et al. // *Cancer*. – 2004. – Vol. 100, N. 6. – P. 1199-1207.

143. Siegal, T. Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes for the treatment of a brain tumor model: biodistribution and therapeutic efficacy / T. Siegal, A. Horowitz, A. Gabizon // *Journal of neurosurgery*. – 1995. – Vol. 83, N. 6. – P. 1029-1037.

144. Sharma, U.S. Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model / U.S. Sharma, A. Sharma, R.I. Chau and R.M. Straubinger // *Pharmaceutical research*. – 1997. – Vol. 14, N. 8. – P. 992-998.

145. Chastagner, P. Preclinical studies of pegylated- and non-pegylated liposomal forms of doxorubicin as radiosensitizer on orthotopic high-grade glioma xenografts / P. Chastagner, H. Sudour, J. Mriouah et al. // *Pharmaceutical research*. – 2015. – Vol. 32, N. 1. – P. 158-166.

146. Voulgaris, S. Intratumoral doxorubicin in patients with malignant brain gliomas / S. Voulgaris, M. Partheni, M. Karamouzis et al. // *American journal of clinical oncology*. – 2002. – Vol. 25, N. 1. – P. 60-64.

147. Voeikov, R. Dioxadet-loaded nanogels as a potential formulation for glioblastoma treatment / R. Voeikov, T. Abakumova, N. Grinenko et al. // *Journal of Pharmaceutical Investigation*. – 2017. – Vol. 47. – P. 75-83.

148. Abraham, S.A. The liposomal formulation of doxorubicin / S.A. Abraham, D.N. Waterhouse, L.D. Mayer et al. // *Methods in enzymology*. – 2005. – Vol. 391. – P. 71-97.

149. Chang, I.P. Preparation of Fluorescent Magnetic Nanodiamonds and Cellular Imaging / I.P. Chang, K.C. Hwang, C.S. Chiang // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130, N. 46. – P. 15476-15481.

150. Vaijayanthimala, V. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake / V. Vaijayanthimala, Y.K. Tzeng, H.C. Chang and C.L. Li // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20, N. 42. – P. 425103-425112.

151. Weng, M.F. Fluorescent nanodiamonds for specifically targeted bioimaging: Application to the interaction of transferrin with transferrin receptor / M.F. Weng, S.Y. Chiang, N.S. Wang and H. Niu // *Diamond and Related Materials*. – 2009. – Vol. 18. – P. 587-591.

152. Cheng, C.Y. Direct and in vitro observation of growth hormone receptor molecules in A549 human lung epithelial cells by nanodiamond labeling / C.Y. Cheng, E. Perevedentseva, J.S. Tu // *Applied Physics Letters*. – 2007. – Vol. 90, N. 16. – P. 163903.

153. Zhang, B. Receptor-Mediated Cellular Uptake of Folate-Conjugated Fluorescent Nanodiamonds: A Combined Ensemble and Single-Particle Study / B. Zhang, Y. Li, C.Y. Fang et al. // *Small*. – 2009. – Vol. 5, N. 23. – P. 2716-2721.

154. Применение наноалмазов в биологии: реальность и перспективы // Детонационные наноалмазы. Технология, структура, свойства и применения / Л.Б. Пиотровский, Д.Н. Николаев, О.А. Шендерова. – СПб: Изд-во ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 2016. – С. 317-368.

155. Wang, L. Safety evaluation of nanodiamond-doxorubicin complexes in a Naïve Beagle canine model using hematologic, histological, and urine analysis / L. Wang, W. Su, K.Z. Ahmad et al. // Nano Research. – 2022. – Vol. 15. – P. 3356–3366.

156. Пшенкина, Н.Н. Кинетический и термодинамический анализ взаимодействия лигандов с альбумином / Н.Н. Пшенкина // Мед. академ. журн. - 2010. - Т. 10. - №3. - С. 130-138.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю Васиной Любови Васильевне, д.м.н, заведующему кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ имени академика И. П. Павлова» МЗ РФ за всестороннюю помощь и поддержку в выполнении диссертационного исследования.

Автор благодарит Вуля Александра Яковлевича, доктора физико-математических наук, профессора, заведующего лабораторией физики кластерных структур Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе за предоставление детонационных наноалмазов, аспиранта кафедры химии твердого тела Института химии Санкт-Петербургского государственного университета Абделхалима Абделсаттара Осама Елемама за синтез конъюгатов наноалмазов с цитостатическими препаратами, Роберта Ишмухаметова, Leading Researcher Clarendon Laboratory, Department of Physics, Oxford University, и Галкина Михаила Александровича, к.б.н., доцента кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ за помощь в осуществлении экспериментов с искусственными мембранами.

Автор выражает особую благодарность заведующему кафедрой общей и биоорганической химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ, д.х.н. Семенову Константину Николаевичу и профессору кафедры общей и биоорганической химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ, д.б.н. Шаройко Владимиру Владимировичу за помощь в исследованиях и обсуждении экспериментальных данных, советы и консультации.