

На правах рукописи

БЕРДИЧЕВСКИЙ
Григорий Михайлович

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

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на кафедре биологической химии

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Васина Любовь Васильевна**

Официальные оппоненты:

Торопова Яна Геннадьевна – доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по научной работе Института экспериментальной медицины

Саранцева Светлана Владимировна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заместитель директора по научной работе; лаборатория экспериментальной и прикладной генетики, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в __ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12) и на сайте <https://iemspsb.ru/external/berdichevskiy-gm/>
Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Мухин Валерий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последнее десятилетие наблюдается возрождение интереса к наноалмазам детонационного синтеза (ДНА), связанное с поиском путей их практического применения [Mochalin et al, 2020; Wang et al, 2022; Zou et al, 2021].

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 [Passeri et al, 2015; Chauhan et al, 2020]. Также существует возможность стандартизации и унификации промышленно выпускаемых детонационных наноалмазов [Tinwala et al, 2019]. Наличие различных функциональных групп на поверхности ДНА обеспечивает возможность присоединения различных молекул, которые в свою очередь могут выполнять роль терапевтических агентов [Fedel, 2020; Turcheniuk et al, 2017].

Низкая стоимость, химическая инертность и способность преодолевать лекарственную устойчивость позволяют рассматривать возможность применения ДНА в качестве носителя в системах доставки цитостатиков [Пиотровский, 2016; Bondon et al, 2020; Wang et al, 2022].

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 [Wang et al, 2018; Madamsetty et al, 2019; Bondon et al, 2020; Octavia et al, 2012; Yuan et al, 2019].

Развитие резистентности к терапии обуславливает актуальность поиска химических веществ с цитостатическими свойствами, в том числе для целей импортозамещения. Сложности с разработкой новых противоопухолевых средств заставляют исследователей возвращаться к препаратам, полученным ранее [Рогов, 2014].

Перспективным противоопухолевым агентом представляется отечественный препарат Диоксадэт (Диокс), который является производным симметричного триазина и относится к группе алкилирующих соединений – этилениминов. Существенным побочным эффектом применения Диокс в терапевтическом режиме является миелосупрессия [Gershanovich et al, 1998].

В рамках фрагментарных клинических испытаний, проведенных у пациентов с распространенными формами злокачественных новообразований различных локализаций, Диокс продемонстрировал свою противоопухолевую эффективность [Gershanovich et al, 1998].

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 формы нано 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 [Yuan et al, 2019; Li et al, 2019].

Степень разработанности темы исследования. В литературе имеется значительное число публикаций по адсорбционной иммобилизации и ковалентной прививке Докс (в виде гидрохлорида), на поверхность ДНА. Установлено, что адсорбция Докс на ДНА позволяет повысить его эффективность по отношению к опухолям печени (LT2-Мус) и молочной железы (4Т1) мышей линии BALB/c в эксперименте *in vivo* [Chow E.K. et al, 2011].

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 [Chow E. K. et al, 2011].

При изучении эффективности лекарственной формы на основе ДНА, содержащей два химиотерапевтических агента (Докс и противомалярийное средство маляридин, являющееся ингибитором Р - гликопротеина, было установлено, что такой комплекс препятствует развитию резистентности опухоли к нескольким цитостатикам [Zhu H. et al, 2017].

В результате ковалентной прививки был получен комплекс Докс и фолиевой кислоты с наноалмазами [Ryu et al, 2017]. При взаимодействии таких частиц с фолатными рецепторами опухолевых клеток происходит гибель последних. По мнению авторов, такие конъюгаты могут быть успешно использованы в качестве наноконтейнеров для доставки противоопухолевых препаратов в клетки-мишени [Ryu et al, 2017].

Предпринимались попытки получения и наночастиц 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 наночастицу 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 удается 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., 2019). Полученные результаты по изучению противоопухолевой активности нанодиоксадэта послужили основанием для создания наночастицы диоксадэт на основе ДНА.

Цель исследования

Сравнить биологические свойства противоопухолевых препаратов с различным механизмом действия (доксорубин 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 плазмо-коагуляционного гемостаза, связывание с человеческим сывороточным альбумином, 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 PANC-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 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.

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 PANC-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 интрауморального 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 F1F0 E. coli и митохондриальный мембранный потенциал) и связывание ДНА–Докс и ДНА–Диокс с человеческим сывороточным альбумином 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 результатов работы

Результаты диссертации были 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 № 3 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).

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 соискателя

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.

Финансовая поддержка

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.

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). Фармацевтическая субстанция 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, плазмокоагуляционный 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.

Идентификация конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс проводилась при помощи твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 WB, США).

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).

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.

Пробоподготовка для исследования гемосовместимости ДНА–Докс и ДНА–Диокс. Использовали кровь здоровых доноров, 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 влияния Докс, Диокс и ДНА на изучаемые показатели по отдельности для оценки их вклада в эффекты конъюгатов.

Исследование АДФ-, адреналин- и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов в PRP изучали с помощью агрегометра Solar AP 2110 (Беларусь) при 37°C 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 (C = 10 мкМ), адреналина (C=10 мкМ) и коллагена (C=2 мкМ). Предварительно проводили стандартизацию плазмы до получения концентрации

тромбоцитов $200-250 \cdot 10^9$ 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 37°C 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.

Плазмо-коагуляционный гемостаз. Влияние ДНА и ДНА–Докс и 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. 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 или конъюгатов 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.

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 ПОЛ 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 37°C 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.

Связывание с человеческим сывороточным альбумином. Для идентификации сайтов связывания ДНА–Докс и ДНА–Диокс с человеческим сывороточным альбумином (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.

Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на АТФазную активность F_1F_0 *E. coli* (штамм ДК-8). 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). Для детектирования протонного градиента использовался 9-амино-6-хлоро-метоксиакридин (АСМА). АТФ-зависимую генерацию протонного градиента на мембране протеолипосом оценивали по тушению флуоресценции АСМА при 492 нм (длина волны возбуждения 419 нм). 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). АТФазную активность с использованием фенолового красного измеряли по выделению «стехиометрического» протона при 557 нм. В пробу вносили 100 мкл 0,3 % водной дисперсии ДНА. Все измерения проводились при комнатной температуре на спектрофотометре «Varian Cary 50 Bio» («Varian», Австралия).

Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$). Для измерения митохондриального мембранного потенциала использовали флуоресцентный зонд MitoTracker® Orange CMTRos («Thermofisher Scientific», Великобритания). 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 мМ КСl 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 разбавляющего агента в лунки вносили 10 мкМ FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразона). Интенсивность флуоресценции измеряли при длинах волн возбуждения / эмиссии 554/576 нм с использованием микропланшетного спектрофлуориметра (TECAN Instrument, AG, Австрия). Эксперимент проводили в шести повторах.

Исследование цитотоксической активности ДНА–Докс и ДНА–Диокс *in vitro*.
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 CO_2 -инкубаторе при

+37 °С в увлажнённой атмосфере, содержащей воздух и 5 % CO₂ в питательной среде DMEM, содержащей 10 % термически инактивированную fetalную 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.

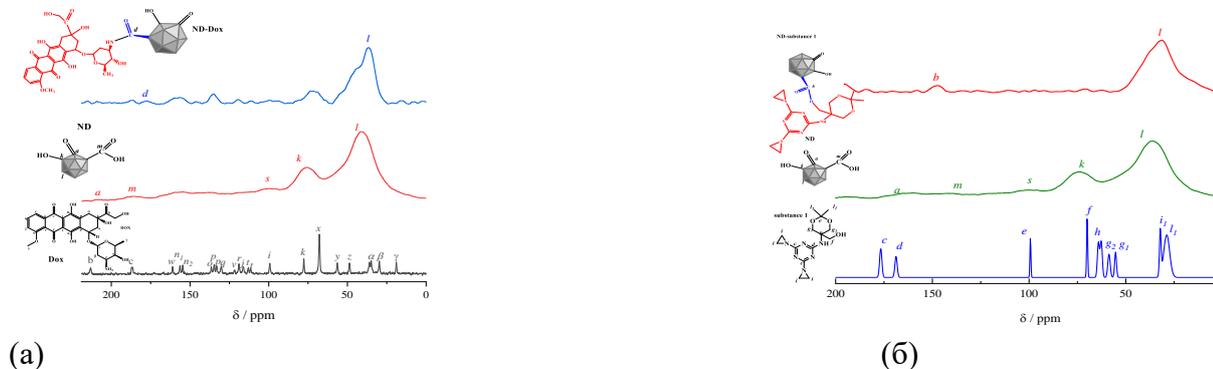
Изучение механизмов эндоцитоза ДНА–Докс и ДНА–Диокс на модели клеточной линии карциномы шейки матки HeLa. Для исследования механизмов эндоцитоза, реализуемых в клетках HeLa конъюгатами ДНА–Докс и ДНА–Диокс, мы использовали метод МТТ (пункт 2.4.1.) и следующие ингибиторы: динасор (Sigma-aldrich, США) 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.

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).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Твердотельная ^{13}C ЯМР спектроскопия

ДНА, Докс, ДНА–ДоксДиокс и ДНА–Диокс были охарактеризованы спектроскопией ^{13}C ЯМР (Рисунок 1).



(a)

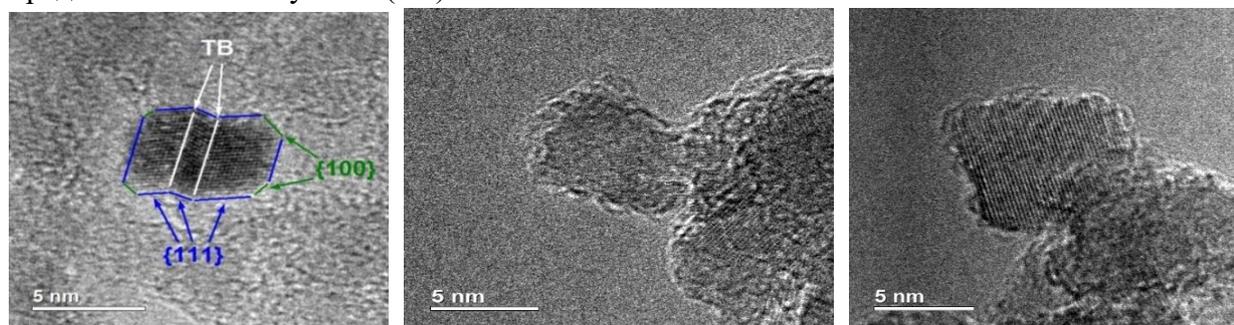
(б)

Рисунок 1. Результаты ^{13}C ЯМР-спектроскопии для (а) ДНА, Докс и ДНА–Докс и (б) 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.).

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

Структурная характеристика ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс представлена на Рисунке 2 (а-в).



(a)

(б)

(в)

Рисунок 2. Характерное ТЕМ-изображение для наноалмазной частицы с обозначением двойных границ (ТВ) и границ вдоль $\{111\}$ и $\{100\}$ плоскостей (а); для конъюгата ДНА–Диокс (б); для конъюгата ДНА–Докс (в)

Как видно из представленных данных, частицы демонстрируют типичную алмазоподобную кристаллическую структуру с редкими гранями вдоль $\{111\}$ и $\{100\}$ кристаллическими плоскостями. Размер частиц составляет около 5 нм, функционализация ДНА приводит к образованию заметного неструктурированного слоя толщиной 0,5 нм на поверхности частиц, скрывающего форму и структуру наноалмаза. Конъюгаты ДНА с цитостатиками демонстрируют агрегацию, в отличие от немодифицированных ДНА.

Распределение 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 1.

Таблица 1. 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.

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 2.

Таблица 2. 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*	69,9±7,7*	70,7±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 нами 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 3).

Таблица 3. Влияние Докс и Диокс на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме

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

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

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 4.

Таблица 4. Влияние ДНА, ДНА–Докс и ДНА–Диокс на показатели плазмо-коагуляционного звена гемостаза

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

Таблица 5. 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. Влияние ДНА–Докс и ДНА–Диокс на спонтанный гемолиз эритроцитов

В результате проведенных исследований были получены данные (Таблица 6) 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 6. Влияние ДНА, 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 \pm 0,03	2,0 \pm 0,1	0,51 \pm 0,03	0,81 \pm 0,05	2,2 \pm 0,1
ДНА–Диокс	0	0	0	0	0	0
Контроль +	100					
Контроль -	0,13 \pm 0,02					

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

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 ПА (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,

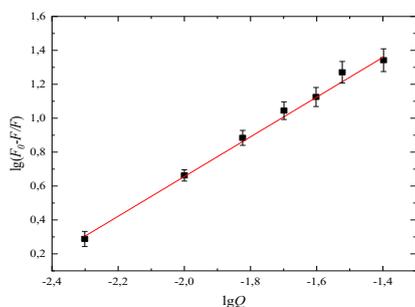
Q — концентрация ДНА–Докс и ДНА–Диокс,

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

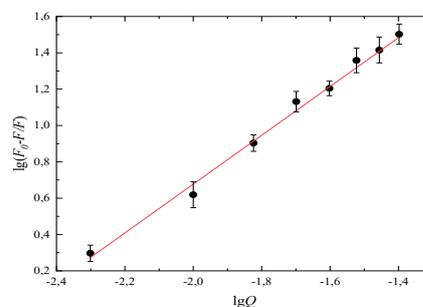
k_b — константа связывания ЧСА с ДНА–Докс и ДНА–Диокс.

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.



(а)



(б)

Рисунок 3. Логарифмический график Штерна-Фольмера для ДНА–Докс (а) и ДНА–Диокс (б) 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 7).

Таблица 7. Значения констант связывания (k_b) и стехиометрия реакции связывания (n) для ДНА–Докс и ДНА–Диокс

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 представленных данных видно, что для ДНА–Докс 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 IIIА и менее прочные комплексы в субдоменах IV, IIА. 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 IIIА и менее прочный комплекс в субдомене IV.

5. 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). 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. Аналогичный эффект наблюдался при добавлении 100 мкл 0,3% дисперсии конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс (Рисунок 4 (а, б)).

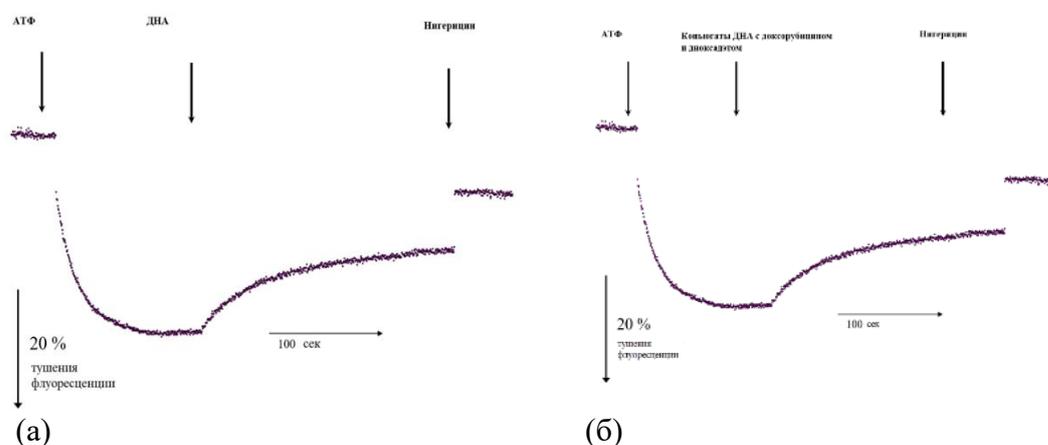


Рисунок 4. Влияние ДНА на тушение флуоресценции АСМА (а); Влияние конъюгатов ДНА с Докс и Диокс на тушение флуоресценции АСМА (б)

Можно предположить, что ДНА проявляют ингибирующий эффект на АТФазу. Следует отметить, что Докс и Диокс не влияли на тушение флуоресценции АСМА (Рисунок 5), т. е. наблюдаемый эффект целиком связан только с ДНА.

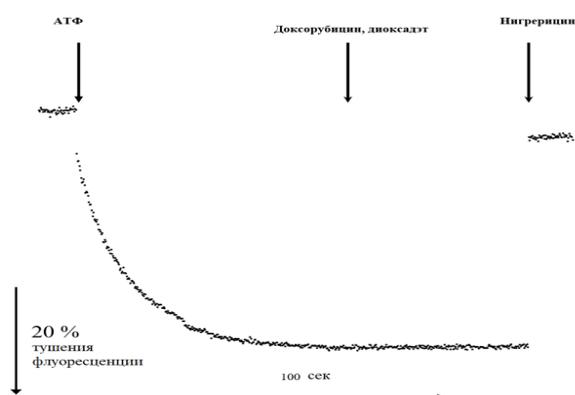


Рисунок 5. Влияние Докс и Диокс на тушение флуоресценции АСМА

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 6). Реакцию гидролиза АТФ инициировали, добавляя фермент, затем в процессе протекания реакции вносили ДНА. Как видно из представленных данных, АТФазная активность после внесения ДНА (линия 2 на рисунок 6) в три раза ниже, чем до их добавления (линия 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксилированные ДНА оказывают ингибирующий эффект на активность АТФазы.

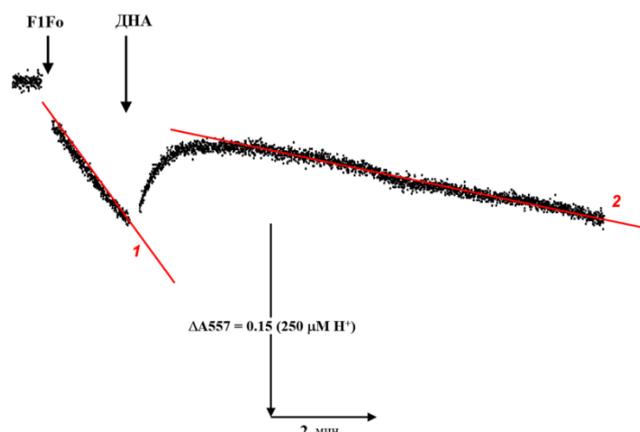


Рисунок 6. Влияние ДНА на АТФазу

Как видно из представленных данных, АТФазная активность после внесения ДНА (линия 2 на рисунке 6) в три раза ниже, чем до их добавления (линия 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксилированные ДНА оказывают ингибирующий эффект на активность АТФазы.

6. 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 8.

Таблица 8. Влияние ДНА, конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс, Докс и Диокс на митохондриальный мембранный потенциал

	Контроль	FCCP	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

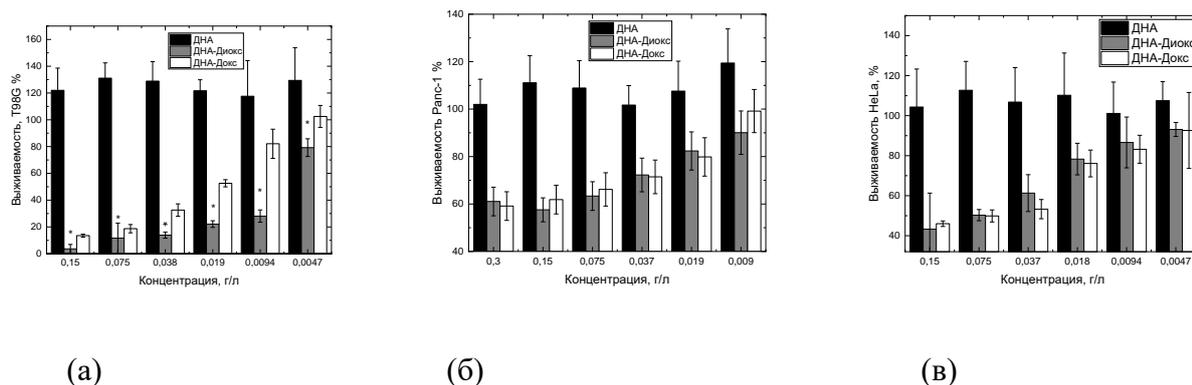
* $p < 0,05$ относительно контроля

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±13,8 %) и полученные нами для ДНА и ДНА–Диокс сопоставимые результаты (30,4±4,6 % и 27,9±5,1 %, соответственно), можно предположить, что снижение мембранного потенциала при добавлении ДНА–Диокс обусловлено только ингибирующим эффектом ДНА.

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

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 7 (а)).



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

Рисунок 7. Цитотоксичность ДНА–Докс и ДНА–Диокс на клеточной линии T98G (а); на клеточной линии PANC-1(б); на клеточной линии HeLa (в)

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 (Рисунок 7 (б, в)).

Характеристика цитотоксического действия ДНА, Докс, Диокс, ДНА–Докс и ДНА–Диокс представлена в Таблице 9. На основе анализа концентрационных зависимостей (доза-эффект), были рассчитаны значения IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) для ДНА, Докс, Диокс, ДНА–Докс и ДНА–Диокс.

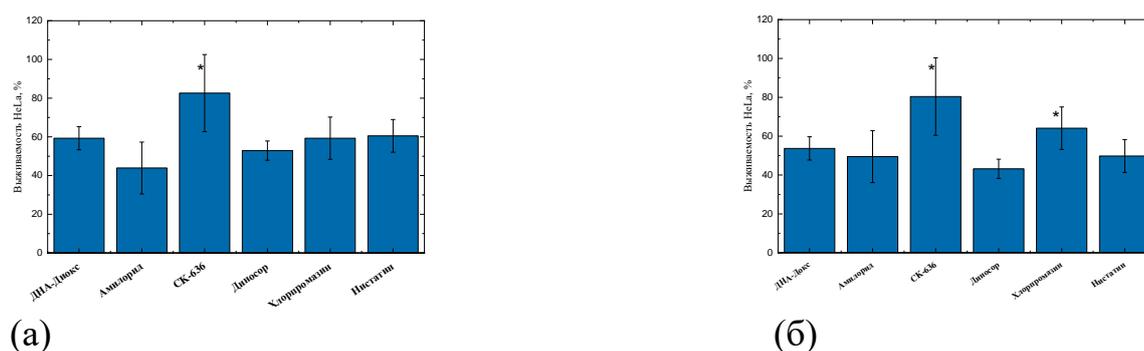
Таблица 9. Характеристика цитотоксического действия ДНА, Докс, Диокс, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в пересчете на содержание наноалмазов

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*.

8. Механизмы эндоцитоза ДНА–Докс и ДНА–Диокс на модели клеточной линии карциномы шейки матки HeLa

В результате проведенного исследования установлено, что инкубация клеток HeLa с ингибитором эндоцитоза СК-636 приводит к снижению эффективности проникновения как ДНА–Докс, так и ДНА–Диокс ($p < 0,05$) (Рисунок 8).



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

Рисунок 8. Влияние ингибиторов эндоцитоза на поглощение ДНА–Диокс (а) и ДНА–Докс (б) клетками HeLa

Интернализация в клетки HeLa ДНА–Докс статистически значимо ($p < 0,05$) снижалась также в присутствии хлорпромазина. 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.

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 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.

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, делает перспективным применение 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.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и/или входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science:

1. **Gregory M. Berdichevskiy**, Lubov V. Vasina, Sergei V. Ageev, Anatolii A. Meshcheriakov, Mikhail A. Galkin, Robert R. Ishmukhametov, Alexei V. Nashchekin, Demid A. Kirilenko, Andrey V. Petrov, Sofia D. Martynova, Konstantin N. Semenov, Vladimir V. Sharoyko. A comprehensive study of biocompatibility of detonation nanodiamonds // Journal of Molecular Liquids. – 2021. – Т.323. - С. 115763-115777.
2. **Г.М. Бердичевский**, Л.В. Васина, Е.В. Рюмина, В.В. Шаройко, К.Н. Семенов. Перспективы использования наноалмазов в медицине (обзор) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 1- С. 42-48.
3. **Г. М. Бердичевский**, Л. В. Васина, М. А. Галкин, В. В. Шаройко, К. Н. Семенов. Изучение влияния детонационных наноалмазов и их конъюгатов с доксорубицином и диоксадэтом на мембрану митохондрий // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология» **в печати**

Тезисы докладов:

1. **Г. М. Бердичевский.** Наноалмазы и их конъюгаты с биологически-активными веществами. Перспективы применения в медицине // VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019». – СПб., 2019. – С.52.
2. **Бердичевский Г.М.,** Васина Л.В., Галкин М. А. Изучение влияния детонационных наноалмазов на мембрану митохондрий // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 3 декабря 2020 года / Под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. Ч. 2. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2020. – С.23.
3. Лутцев М. Д., **Г. М. Бердичевский.** Влияние карбоксилированных наноалмазов на гемолиз // Актуальные проблемы биомедицины – 2020: Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020 г. / Отв. ред. Т.Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2020. – С.316.
4. **Бердичевский Г.М.,** Каныгина П. А. Влияние наноалмазов на агрегационную активность тромбоцитов // Актуальные проблемы биомедицины – 2021: Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 25-26 марта 2021 г. / Отв. ред. Т.Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2021. – С.208.
5. **Бердичевский Г.М.,** Лопатина А.С. Влияние конъюгатов наноалмазов с цитостатиками доксорубицином и диоксадэтом на функциональную активность тромбоцитов // Актуальные проблемы биомедицины – 2021: Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 25-26 марта 2021 г. / Отв. ред. Т.Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2021. – С.209.
6. **Бердичевский Г.М.** Исследование цитотоксических свойств конъюгатов наноалмазов с противоопухолевыми препаратами (доксорубицин и диоксадэт) // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Рязань, 26-27 января 2022 г.) / ред. кол.: И.В. Матвеева, Ю.В. Абаленихина, Ю.А. Марсянова; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань, 2022. – С.102.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНА	наноалмазы детонационного синтеза
Докс	доксорубицин
Диокс	диоксадэт
ДНА–Докс	конъюгат доксорубицина с наноалмазами детонационного синтеза
ДНА–Диокс	конъюгат диоксадэта с наноалмазами детонационного синтеза
ЧСА	человеческий сывороточный альбумин