



УДК 61:577.1
<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.41.3>

Изучение влияния детонационных наноалмазов и их конъюгатов с доксорубицином и диоксадэтом на функцию митохондрий

Г. М. Бердичевский, Л. В. Васина, М. А. Галкин, В. В. Шаройко,
К. Н. Семенов*

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.
И. П. Павлова, г. Санкт-Петербург, Россия
E-mail: grishaberd@gmail.com*

Аннотация. Изучено влияние карбоксилированных детонационных наноалмазов с отрицательным ζ -потенциалом и конъюгатов наноалмазов с цитостатическими препаратами доксорубицином и диоксадэтом на функцию митохондрий посредством оценки АТФазной активности F_1F_0 -АТФ-синтазного комплекса белков *E. coli* и изменений мембранного митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$). Полученные данные позволяют оценить степень влияния наноалмазов как носителей в системах доставки лекарственных веществ на биоэнергетику клетки.

Ключевые слова: детонационные наноалмазы, конъюгаты, доксорубицин, диоксадэт, митохондрии, F_1F_0 -АТФаза, протеолипосомы, мембранный митохондриальный потенциал.

Благодарности. Авторский коллектив благодарен А. Я. Вулю за предоставление детонационных наноалмазов, О. Е. Абдельхалиму Абдельсаттару за синтез конъюгатов наноалмазов с цитостатическими препаратами, Р. Р. Ишмухаметову за помощь в осуществлении экспериментов с искусственными мембранами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 20-315-90116.

Для цитирования: Изучение влияния детонационных наноалмазов и их конъюгатов с доксорубицином и диоксадэтом на функцию митохондрий / Г. М. Бердичевский, Л. В. Васина, М. А. Галкин, В. В. Шаройко, К. Н. Семенов // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2022. Т. 41. С. 3–18. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.41.3>

Research article

Investigation of the Effect of Detonation Nanodiamonds and their Conjugates with Doxorubicin and Dioxadet on the Mitochondrial Membrane

G. M. Berdichevskiy, L. V. Vasina, M. A. Galkin, V. V. Sharoyko,
K. N. Semenov*

Pavlov University, Saint Petersburg, Russian Federation

Abstract. Targeted drug delivery is aimed at preventing drugs' nonspecific distribution in different tissues. One of efficient ways for drug's targeted delivery is using detonation nanodiamonds. These nanoparticles are an advantageous material for nanomedicine due to their low cost, biocompatibility, hardness and chemical stability. Majority of blood plasma proteins and blood cell surfaces are charged negatively. Therefore biocompatibility and long circulation lifetimes of carboxylated nanodiamonds can be partially attributed to their negative surface charge. The presence of different functional groups on nanodiamond surfaces enables their functionalization with a variety of therapeutic agents, including antitumour drugs. One of them is dioxadet, a derivative of symmetric triazine. It is becoming evident that mitochondria play crucial role in metastasis and chemoresistance of tumors, which makes them a very promising target for anticancer therapy. In particular, proton translocating F₁F₀-ATPase/ATP synthase can be one of these targets. This enzyme is responsible for making the majority of ATP in the cell by oxidative phosphorylation. More than 300 natural and synthesized compounds are currently known to interact with or inhibit F₁F₀, but a comparative study of their effects on energy metabolism has only recently started. In this work we estimated effects of the cytostatic drugs doxorubicin, dioxadet and their DND conjugates on the activity of F₁F₀ ATPase as well as on the membrane potential. Two model systems were employed: 1) *E. coli* F₁F₀-ATPase reconstituted into phosphatidylcholine liposomes; 2) Pancreatic carcinoma cell line PANC1. It was found that the nanodiamonds and conjugates exhibited the same uncoupling effect, partially dissipating the proton gradient across the membrane of proteoliposomes containing F₁F₀-ATPase. In addition, the nanodiamonds inhibited ATPase activity. In an experiment on the effect on the mitochondrial membrane potential (PANC 1 cell line), conjugates of nanodiamonds with doxorubicin demonstrated a more pronounced effect compared to doxorubicin, which may be due to a combination of the uncoupling effect of nanodiamonds and doxorubicin-dependent generation of reactive oxygen species. The data reported in this paper shed light on effect of the carboxylated nanodiamonds on the cellular bioenergetics. These findings are crucial for further development of nanodiamond-based targeted drug delivery systems, in particular decreasing their toxicity by selecting optimal strategies of nanodiamond synthesis as well as drug immobilization on their surfaces. The use of artificial models of natural membranes, along with cell cultures, is necessary for a deeper and more accurate understanding of the mechanism of action of cytostatics.

Keywords: detonation nanodiamonds, conjugates, doxorubicin, dioxadet, mitochondria, F₁F₀ ATPase, proteoliposomes, mitochondrial membrane potential.

For citation: Berdichevskiy G.M., Vasina L.V., Galkin M.A., Sharoyko V.V., Semenov K.N. Investigation of the Effect of Detonation Nanodiamonds and their Conjugates with Doxorubicin and Dioxadet on the Mitochondrial Membrane. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2022, vol. 41, pp. 3-18. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.41.3> (in Russian)

Введение

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных материалов для адресной доставки лекарств являются детонационные наноалмазы (ДНА), обладающие высокой устойчивостью к химической и физической деградации, фотостабильностью, биосовместимостью и способностью проникать через клеточные мембраны [Вуль, Шендерова, 2016; Turcheniuk, Mochalin, 2017; Unique rheological behavior ... , 2020; Перспективы использования ... , 2021].

Наличие различных функциональных групп на поверхности ДНА обеспечивает возможность присоединения различных молекул, которые, в свою очередь, могут выполнять роль терапевтических агентов [Turcheniuk, Mochalin, 2017; Fedel, 2020]. Невысокая стоимость, химическая инертность, низкая токсичность и биосовместимость делают ДНА привлекательными в качестве носителя в системах доставки противоопухолевых препаратов [Nanocarbons for biology... , 2019; Nanodiamonds... , 2019; Precise design strategies ... , 2020].

Среди последних одними из наиболее эффективных остаются препараты антрациклинового ряда, в частности доксорубин (Докс). Вместе с тем антрациклины обладают способностью вызывать у больных развитие выраженной кардиотоксичности и химиорезистентности [Doxorubicin-induced cardiomyopathy ... , 2012]. 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, имеет важное значение для снижения ограничений применения этого важного противоопухолевого препарата для химиотерапии [Wallace, Sardão, Oliveira, 2020].

Развитие химиорезистентности обуславливает необходимость поиска новых химических веществ с цитостатическими свойствами. Синтезированный в НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава России в 1996 г. препарат диоксадэт (Диокс) ([5-[[4,6-бис(азирин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]-амино]-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанол) представляет собой производное симметричного триазина, относится к группе алкилирующих соединений – этилениминов и является перспективным цитостатиком при лечении ряда онкологических заболеваний. В рамках фрагментарных клинических испытаний, проведённых на пациентах с распространёнными формами злокачественных новообразований различных локализаций, Диокс продемонстрировал противоопухолевую эффективность [Результаты кооперированного ... , 1998]. Существенным побочным эффектом применения Диокс в терапевтическом режиме является миелосупрессия [Там же]. В отличие от Докс, какие-либо данные о влиянии Диокс на функции митохондрий отсутствуют.

Включение противоопухолевых агентов в состав коллоидных наноразмерных систем доставки является альтернативной стратегией, направленной на снижение побочных эффектов действующего вещества. Представляет интерес изучение биологических свойств конъюгатов ДНА с цитостатиками, обладающими различным механизмом действия.

Среди перспективных подходов к созданию нового класса противоопухолевых препаратов ныне рассматривается возможность регуляции гидролитической активности имеющего ключевое значение в синтезе АТФ в клетке АТФ-синтазного комплекса F_1F_0 [Winquist, Gribkoff, 2020].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния конъюгатов карбоксилированных детонационных наноалмазов с цитостатическими препаратами Докс и Диокс на активность F_1F_0 -АТФазы кишечной палочки и мембранный митохондриальный потенциал ($\Delta\psi_m$).

Материалы и методы

Синтез конъюгатов ДНА с цитостатическими препаратами Докс и Диокс проводился в Институте химии Санкт-Петербургского государственного университета. ДНА для экспериментов предоставлены А. Я. Вулем (лаборатория физики кластерных структур Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе РАН (Санкт-Петербург)).

Содержание Докс в составе конъюгата составило 84 %, содержание Диокс – 68 %, что соответствует терапевтически значимым концентрациям.

Характеристика физико-химических свойств ДНА и конъюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс. Распределение наночастиц по размерам и ζ -потенциалы в водных дисперсиях изучались с применением анализатора размеров частиц Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Великобритания). Характеристика ДНА представлена в ранее опубликованной работе авторов [A comprehensive study ... , 2021]. Размер частиц карбоксилированных ДНА составил в среднем около 60 ± 5 нм, что соответствует ранее опубликованным данным [Tumor selective uptake ... , 2019].

Величины электрокинетического потенциала карбоксилированных ДНА имеют отрицательные значения, что является благоприятным фактором, поскольку поверхность форменных элементов крови также имеет отрицательный заряд, препятствуя неспецифической адсорбции ДНА на их поверхности [A comprehensive study ... , 2021].

Идентификация полученных соединений проводилась с использованием ИК-спектрометра Nicolet 8700 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные ИК-спектры образца ДНА (рис. 1, а, б) согласуются с описанными ранее [Кулакова, Лисичкин, Яковлев, 2018].

Пики при длине волны 3414 см^{-1} и 1630 см^{-1} соответствуют валентным и деформационным колебаниям О–Н. Два пика при 2930 см^{-1} и 2860 см^{-1} относятся к асимметричным и симметричным валентным колебаниям С–Н. Пики в области 1790 см^{-1} и 1280 см^{-1} соответствуют валентным и деформационным колебаниям фрагментов С=О в составе лактона и С–О в составе эпоксидной и сложноэфирной групп. Пик при 1140 см^{-1} может быть отнесён как к валентным колебаниям С–О-фрагмента спиртовой группы, так и к асимметричным деформационным колебаниям С–О–С-фрагмента в составе лактона, простого и сложного эфиров [Petit, Puskar, 2018]. Спектры конъюгатов ДНА-Диокс и ДНА-Докс содержат полосы, характерные как для ДНА, так и для индивидуальных цитостатических препаратов. Подтверждением ковалентной функционализации ДНА является присутствие в ИК-спектрах конъюгатов пиков при 1645 см^{-1} и 1605 см^{-1} , относящихся к валентным колебаниям С=О и деформационным колебаниям N–H-амидной связи.

Исследование влияния ДНА и конъюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс на функцию митохондрий. Используя для изучения влияния конъюгатов на АТФазную активность F_1F_0 -комплекса *E. coli* протеолипосомы получали из фосфатидилхолина (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) (Sigma, Germany) (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 MgCl_2 ; рН 8,0) и оставляли на 30 мин при комнатной температуре, после чего интенсивно перемешивали в течение 20–40 с. Для получения липосом эмульсию фосфатидилхолина подвергали экструзии 21 раз через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 100 нм.

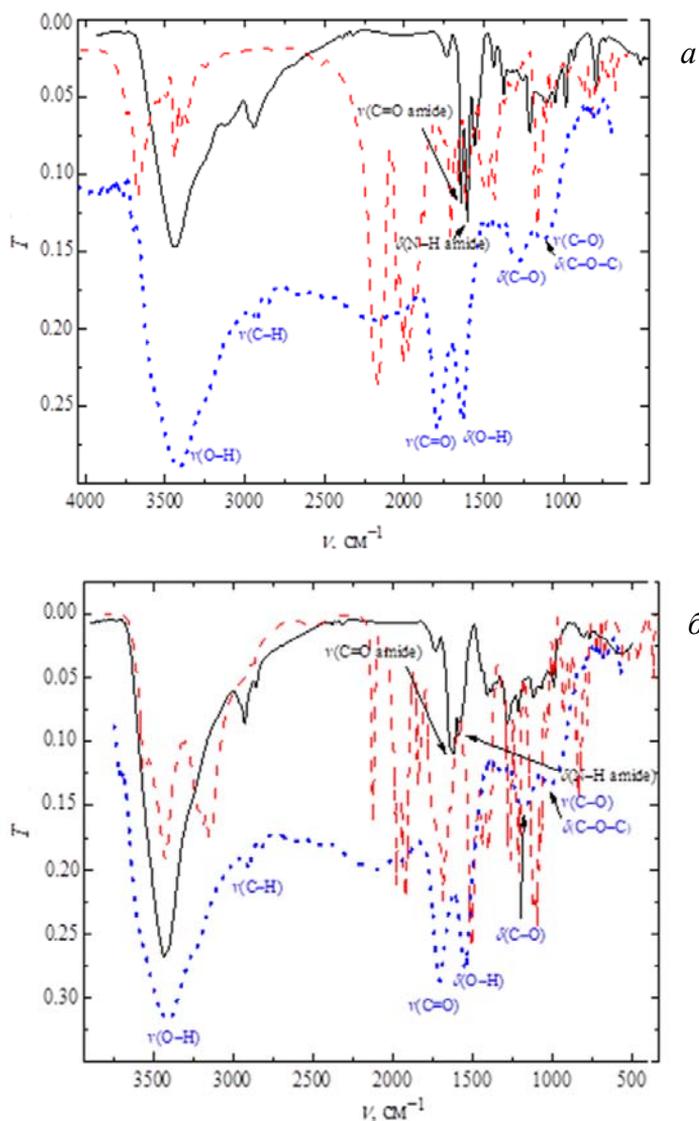


Рис. 1. ИК-спектры конъюгатов ДНА-Диокс и ДНА-Докс и прекурсоров для их синтеза (ДНА, Диокс, Докс): *a* – ДНА-Диокс (чёрный), Диокс (красный) и ДНА (синий); *б* – ДНА-Докс (чёрный), Докс (красный) и ДНА (синий). ν – волновое число, см^{-1} ; T – коэффициент пропускания

Для выделения 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 MgCl_2 ; 0,8%-ный фосфатидилхолин; 1,5%-ный октилглюкозид; 0,5%-ный дезоксихолат натрия; 0,5%-ный холат натрия; 2,5%-ный глицерин и 30 мМ имидазол) в течение 90 мин при 4 °С,

затем центрифугировали в течение 30 мин при 400 000 g для отделения несолобилизованного остатка. Супернатант наносили на колонку Ni-NTA, уравновешенную экстракционным буфером, и элюировали тем же буфером, содержащим 180 мМ имидазол [Ishmukhametov, Galkin, Vik, 2005].

Для встраивания F₁F₀ в липосомы смешивали 140 мкл белка с 300 мкл липосом, добавляли 160 мкл буфера А и 60 мкл 10%-ного холата натрия в буфере А (конечный объём 660 мкл, соотношение белок/липид = 1/30). Инкубировали 15 мин при 4 °С при медленном перемешивании, затем смесь наносили на колонку с сефадексом G-50 (*V* = 3 мл), уравновешенным буфером А. Мутные фракции элюата, содержащие протеолипосомы, объединяли [Ishmukhametov, Russell, Berry, 2016; Detergent-free ultrafast ... , 2018].

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 (6,8 мкг белка) и 1 мкМ АСМА. Протонный градиент элиминировали путём добавления 2 мкМ раствора нигерицина. К протеолипосомам добавляли 100 мкл дисперсий ДНА, конъюгатов ДНА с Докс и Диокс с концентрацией 0,3 %, а также свободные формы Докс и Диокс в концентрациях, эквивалентных их содержанию в конъюгатах.

АТФазную активность измеряли по выделению «стехиометрического» протона при 557 нм. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл протеолипосом (2,7 мкг белка) к 2 мл среды (10 мМ трицин; 100 мМ NaCl; pH 8,0; 2 мМ АТФ; 1 мМ MgCl₂; 60 мкМ феноловый красный; 1 мкМ (2-[2-(3-хлорфенил)гидразинилиден]пропандинитрил (СССР)). Калибровку шкалы протонного градиента проводили с использованием 5 мкл 0,1 М HCl. В пробу вносили 100 мкл 0,3%-ной водной дисперсии ДНА. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Экспериментальная часть работы выполнена в Оксфордском университете (Clarendon Laboratory, Department of Physics).

В экспериментах по изучению влияния ДНА и конъюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс на митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) в качестве модельной системы была выбрана культура клеток аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1 из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Для измерения митохондриального мембранного потенциала использовали флуоресцентный зонд MitoTracker® Orange CMTRos (Thermo Fisher Scientific, США), окрашивающий митохондрии *in situ* [Analysis of mitochondrial ... , 1996]. Являясь катионным соединением, он может накапливаться в митохондриях живых клеток, причём 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%-ную эмбриональную телячью сыворотку, 50 мМ KCl, и инкубировали с 500 нМ флуоресцентного зонда MitoTracker® Orange CMT при 37 °С в течение 30 мин. После этого окрашенные клетки промывали ФСБ и высевали в чёрные 96-луночные планшеты (80 000 клеток/луночку). Дисперсии ДНА и конъюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс добавляли в планшеты до конечной концентрации 0,075 мас. % и инкубировали в течение 1 ч. В качестве разобщающего агента в лунки вносили 10 мкМ карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразона (FCCP). Интенсивность флуоресценции измеряли при длинах волн возбуждения/эмиссии 554/576 нм с использованием микропланшетного спектрофлуориметра (Varioskan LUX, производства Thermo Fisher Scientific, США). Эксперимент проводили в шести повторах.

Статистический анализ данных выполнен с помощью пакета Statsoft Statistica v. 8.1. Результаты представлены как среднее \pm доверительный интервал среднего для указанного числа экспериментов. Достоверность полученных результатов оценивали с использованием критерия Стьюдента при уровне значимости тестируемой гипотезы $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В специальных публикациях представлены данные по изучению влияния ДНА на функции различных клеточных органелл, в том числе митохондрий, которые являются центральным звеном в энергетическом метаболизме клетки. Так, А. С. Соломатин с соавторами [Изучение влияния модифицированных ... , 2014], изучавшие влияние особенностей химического состава поверхности модифицированных ДНА на мембранный потенциал изолированных митохондрий, установили, 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.

Полученные нами ранее результаты выявили разобщающий эффект ДНА на митохондриальный мембранный потенциал [Бердичевский, Васина, Галкин, 2020].

Известно, что АТФ-синтазный комплекс F_1F_0 имеет ключевое значение в синтезе АТФ в клетке [Ватлин, Даниленко, 2020]. Несмотря на то что описаны уже более 300 природных и синтетических молекул, способных связываться с F_1F_0 или ингибировать этот комплекс [Hong, Pedersen, 2008], сравнительное изучение их участия в регуляции энергетического обмена началось недавно [Ahmad, Hassan, Azim, 2017].

В настоящем исследовании в качестве модели митохондриальной мембраны использовали протеолипосомы, содержащие рекомбинантную F_1F_0 -АТФазу *E. coli* (число оборотов фермента около 700 s^{-1} при 37 °С)

[Ishmukhametov, Galkin, Vik, 2005]. Гидролиз АТФ данным препаратом протеолипосом приводит к генерации протонного градиента на мембране. Для детектирования протонного градиента использовался акридиновый краситель 9-акридинамин (9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine (АСМА)). Краситель относится к флуоресцентным аминам, широко применяемым для измерения трансмембранного градиента концентрации протонов в естественных и искусственных мембранных системах. Согласно модели Шульдинера и соавторов [D'Alessandro, Turina, Melandri, 2011], 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 (т. е. при снижении рН внутри протеолипосом) происходит аккумуляция флуоресцентных аминов во внутренней водной фазе, что ведёт к тушению их флуоресценции.

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%-ной дисперсии) приводило к значимому уменьшению тушения флуоресценции АСМА, что можно интерпретировать как уменьшение протонного градиента (рис. 2, а). Аналогичный эффект наблюдался при добавлении 100 мкл 0,3%-ной дисперсии конъюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс (рис. 2, б).

Можно предположить, что, во-первых, ДНА проявляют разобщающий эффект, способствуя рассеянию протонного градиента; во-вторых, возможно ингибирующее влияние ДНА на АТФ-синтазу.

Следует отметить, что Докс и Диокс не влияли на тушение флуоресценции АСМА (рис. 3), т. е. наблюдаемый эффект целиком связан только с действием ДНА.

Для проверки гипотезы о возможном ингибирующем действии ДНА на АТФазу была измерена скорость гидролиза АТФ до и после внесения ДНА (рис. 4). Реакцию гидролиза АТФ инициировали, добавляя фермент, затем в процессе протекания реакции вносили ДНА.

Как видно из представленных на рис. 4 данных, АТФазная активность после внесения ДНА (линия 2) сократилась втрое по сравнению с уровнем до их добавления (линия 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксилированные ДНА оказывают ингибирующий эффект на активность АТФазы.

Мембранный митохондриальный потенциал $\Delta\Psi_m$ наряду с другими факторами играет ключевую роль в митохондриальном гомеостазе за счёт избирательного удаления дисфункциональных митохондрий. $\Delta\Psi_m$ также является движущей силой транспорта других (помимо H^+) ионов и белков, которые необходимы для функционирования митохондрий [Франциянц, Нескубина, Шейко, 2020].

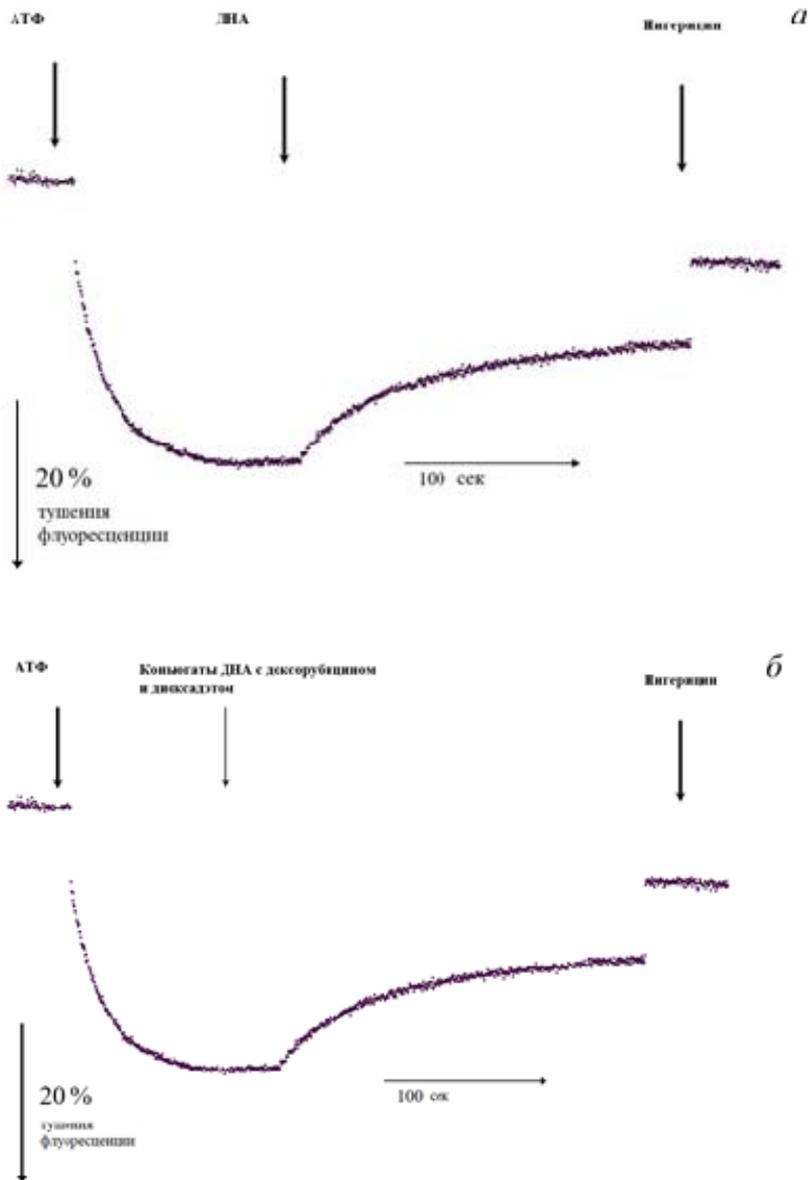


Рис. 2. Влияние ДНА (а) и коньюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс (б) на тушение флуоресценции АСМА

Уровни $\Delta\Psi_m$ и АТФ в клетке остаются относительно стабильными, хотя небольшие колебания этих параметров отражают нормальную физиологическую активность клеток. Однако постоянные изменения $\Delta\Psi_m$ и АТФ являются причиной нарушения энергетического баланса клетки. Отклонения от нормального уровня $\Delta\Psi_m$ могут вызвать потерю жизнеспособности клеток и стать причиной различных патологий.

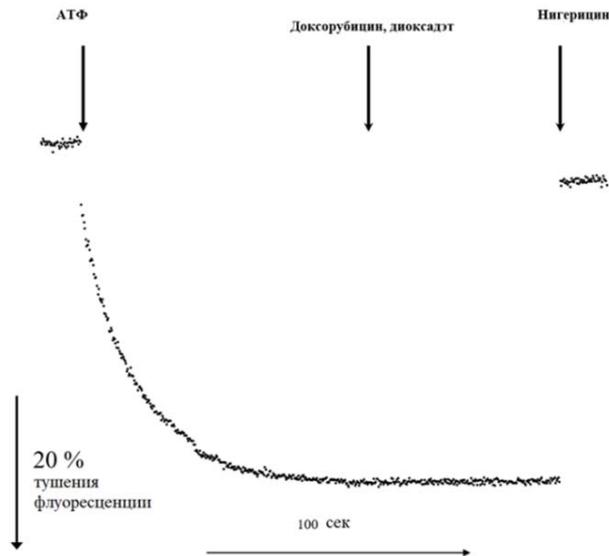


Рис. 3. Влияние доксорубина и диоксидта на тушение флуоресценции АСМА

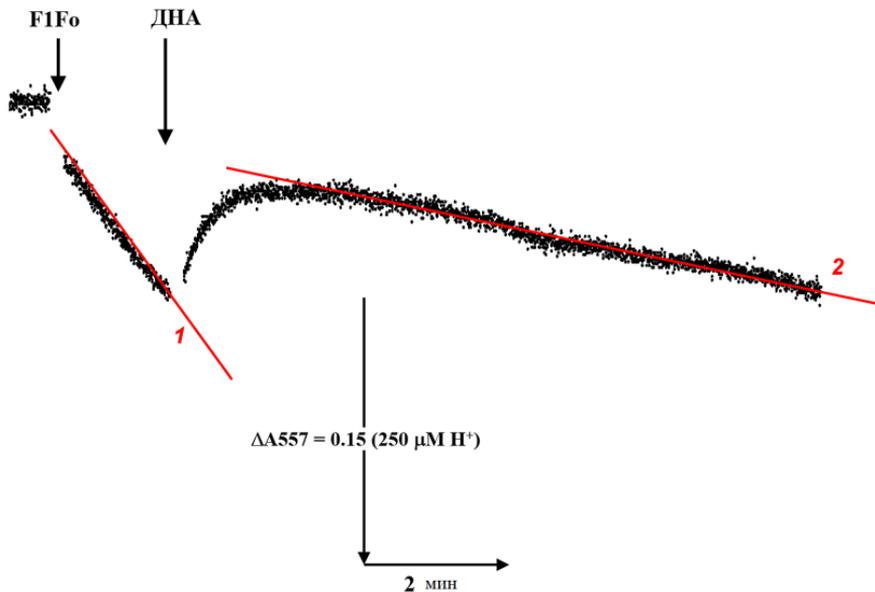


Рис. 4. Скорость гидролиза АТФ до (линия 1) и после (линия 2) внесения ДНА

Сравнительные результаты влияния ДНА и конъюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс на величину мембранного митохондриального потенциала, определяемую по интенсивности флуоресценции зонда MitoTracker® Orange СМТМRos, представлены в таблице.

Таблица

Влияние ДНА, конъюгатов ДНА-доксорубицин и ДНА-диоксадэт, доксорубицина и диоксадэта на величину мембранного митохондриального потенциала

	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

Примечание: * – $p < 0,05$

Как свидетельствуют представленные данные, добавление ДНА и ДНА-Докс приводило к снижению показателя $\Delta\Psi_m$, по сравнению с ДНА-Докс свободный Докс в меньшей степени влиял на его величину. Диокс практически не вызывал тушения флуоресценции и, следовательно, не влиял на величину $\Delta\Psi_m$. Эффект ДНА-Диокс также оказался менее значимым по сравнению с ДНА-Докс.

Известно, что Докс восстанавливается с участием комплекса I митохондрий, образуя семихинон, который, являясь донором электрона, взаимодействует с молекулой кислорода и генерирует супероксидный анион-радикал [Distinct mechanisms ... , 2003].

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 -комплекса *E. coli*, эффект их действия как разобщителей маловероятен. Инкубация с Диокс также приводит к снижению мембранного потенциала, хотя и в значительно меньшей степени, чем с Докс.

В эксперименте по влиянию на митохондриальный мембранный потенциал конъюгат ДНА-Докс снижал мембранный потенциал значительно сильнее, чем индивидуальные ДНА или Докс. По-видимому, это связано с формированием бинарного эффекта, т. е. комбинацией разобщающего эффекта ДНА и Докс-зависимой генерацией активных форм кислорода.

Заключение

В результате изучения влияния карбоксилированных ДНА и конъюгатов ДНА-Докс и ДНА-Диокс на АТФазную активность F_1F_0 -комплекса *E. coli* и митохондриальный мембранный потенциал нами впервые установлено, что:

1) карбоксилированные ДНА и конъюгаты ДНА-Докс и ДНА-Диокс оказывают разобщающий эффект (модель – протеолипосомы), способствуя рассеиванию протонного градиента;

2) Докс и Диокс указанного влияния не оказывают;

3) карбоксилированные ДНА оказывают ингибирующее действие на АТФазу;

4) при длительной инкубации в эксперименте по влиянию на митохондриальный мембранный потенциал (модель – культура клеток PANC-1) конъюгаты ДНА-Докс демонстрируют более выраженный эффект по сравнению с Докс, что может быть обусловлено комбинацией разобщающего эффекта ДНА и Докс-зависимой генерацией активных форм кислорода.

Полученные нами данные позволяют оценить степень влияния на биоэнергетику клетки карбоксилированных ДНА, используемых как носители в системах доставки цитостатиков. Важно также отметить необходимость использования искусственных моделей природных мембран наряду с культурами клеток в целях более глубокого изучения механизмов действия цитостатиков.

Список литературы

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 : сб. науч. тр. Всерос. науч.-практ. конф. СПб. : Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2020. Ч. 2. С. 23–28.

Ватлин А. А., Даниленко В. Н. FoF₁-АТФаза бактерий – наномотор для синтеза и гидролиза АТФ, механизм взаимодействия с макролипидным антибиотиком олигомидином // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140, № 3. С. 231–243. <https://doi.org/10.31857/S0042132420020076>

Вуль А. Я., Шендерова О. А. Детонационные наноалмазы. Технология, структура, свойства и применение. СПб. : Изд-во ФТИ им. А. Ф. Иоффе, 2016. 381 с.

Изучение влияния модифицированных наноалмазов на мембранный потенциал изолированных митохондрий / А. С. Соломатин, Р. Ю. Яковлев, Н. И. Федотчева, Н. Б. Леонидов // Межрегиональная научная конференция РязГМУ им. академика И. П. Павлова (с международным участием). Рязань, 2014. С. 347–350.

Кулакова И. И., Лисичкин Г. В., Яковлев Р. Ю. Химическое модифицирование поверхности детонационного наноалмаза. М. : Изд-во Моск. гос. ун-та, 2018. 92 с.

Перспективы использования наноалмазов в медицине (обзор) / Г. М. Бердичевский, Л. В. Васина, Е. В. Рюмина, В. В. Шаройко, К. Н. Семенов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021. Т. 24, № 1. С. 42–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-05>

Результаты кооперированного клинического изучения противоопухолевого препарата диоксадэт по II фазе / М. Л. Гершанович, В. А. Филов, Д. Г. Котова, А. Н. Стуков // Вопросы онкологии. 1998. Т. 44, № 2. С. 216–220.

Франциянц Е. М., Нескубина И. В., Шейко Е. А. Митохондрии трансформированной клетки как мишень противоопухолевого воздействия // Res. Pract. Med. J. 2020. Vol. 7, N 2. P. 92–108. <http://doi.org/10.17709/2409-2231-2020-7-2-9>

A comprehensive study of biocompatibility of detonation nanodiamonds / G. M. Berdichevskiy, L. V. Vasina, S. V. Ageev, A. A. Meshcheriakov, M. A. Galkin, R. R. Ishmukhametov, A. V. Nashchekin, D. A. Kirilenko, A. V. Petrov, S. D. Martynova, K. N. Semenov, V. V. Sharoyko // J. Mol. Liq. 2021. Vol. 332. 115763. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115763>

Ahmad Z., Hassan S. S., Azim S. A. Therapeutic connection between dietary phytochemicals and ATP synthase // Curr. Med. Chem. 2017. Vol. 24, N 35. P. 3894–3906. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170823125330>

Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains / M. Poot, Yu-Z. Zhang, J. A. Krämer, K. S. Wells, L. J. Jones, D. K. Hanzel, A. G. Lugade, V. L. Singer, R. P. Haugland // J. Histochem. Cytochem. 1996. Vol. 44, Is. 12. P. 1363–1372. <https://doi.org/10.1177/44.12.8985128>

D'Alessandro M., Turina P., Melandri B. A. Quantitative evaluation of the intrinsic uncoupling modulated by ADP and Pi in the reconstituted ATP synthase of *Escherichia coli* // BBA-Bioenergetics. 2011. Vol. 1807, Is. 1. P. 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2010.08.011>

Detergent-free ultrafast reconstitution of membrane proteins into lipid bilayers using fusogenic complementary-charged proteoliposomes / M. A. Galkin, A. N. Russell, S. B. Vik, R. M. Berry, R. R. Ishmukhametov // *J. Vis. Exp.* 2018. Vol. 134. e56909. <https://doi.org/10.3791/56909>

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, M. Murata, M. Kojima, Sh. Kawanishi // *Cancer Sci.* 2003. Vol. 94, Is. 8. P. 686–691. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01503.x>

Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies / Y. Octavia, C. G. Tocchetti, K. L. Gabrielson, S. Janssens, H. J. Crijns, A. L. Moens // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012. Vol. 52, Is. 6. P. 1213–1225. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>

Fedel M. Hemocompatibility of carbon nanostructures // *C – J. Carbon Res.* 2020. Vol. 5, Is. 1. 12. <https://doi.org/10.3390/c6010012>

Hong S., Pedersen P. L. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. Vol. 72, Is. 4. P. 590–641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-08>

Ishmukhametov R. R., Galkin M. A., Vik S. B. Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1706, Is. 1–2. P. 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.012>

Ishmukhametov R. R., Russell A. N., Berry R. M. A modular platform for one-step assembly of multi-component membrane systems by fusion of charged proteoliposomes // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. 13025. <https://doi.org/10.1038/ncomms13025>

Nanocarbons for biology and medicine: sensing, imaging, and drug delivery / N. Panwar, A. M. Soehartono, K. K. Chan, Sh. Zeng, G. Xu, Ju. Qu, P. Coquet, K.-T. Yong, X. Chen // *Chem. Rev.* 2019. Vol. 119, Is. 16. P. 9559–9656. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00099>

Nanodiamonds: Minuscule gems that ferry antineoplastic drugs to resistant tumors / M. S. Ali, A. A. Metwally, R. H. Fahmy, R. Osman // *Int. J. Pharm.* 2019. Vol. 558. P. 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.090>

Petit T., Puskar L. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diam. Relat. Mater.* 2018. Vol. 89. P. 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.08.005>

Precise design strategies of nanomedicine for improving cancer therapeutic efficacy using sub-cellular targeting / X. Fu, Y. Shi, T. Qi, Sh. Qiu, Yi. Huang, X. Zhao, Q. Sun, G. Lin // *Sig. Transduct. Target. Ther.* 2020. Vol. 15. 262. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00342-0>

Tumor selective uptake of drug-nanodiamond complexes improves therapeutic outcome in pancreatic cancer / V. S. Madamsetty, A. Sharma, M. Toma, S. Samaniego, A. Gallud, E. Wang, K. Pal, D. Mukhopadhyay, B. Fadeel // *Nanomedicine.* 2019. Vol. 18. P. 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.020>

Turcheniuk K., Mochalin V. N. Biomedical applications of nanodiamond (Review). *Nanotechnology.* 2017. Vol. 28, N 25. P. 1–27. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6ae4>

Unique rheological behavior of detonation nanodiamond hydrosols: The nature of sol-gel transition / N. M. Kuznetsov, S. I. Belousov, A. V. Bakirov, S. N. Chvalun, R. A. Kamyshevsky, A. A. Mikhutkin, A. L. Vasiliev, P. M. Tolstoy, A. S. Mazur, E. D. Eidelman, E. B. Yudina, A. Ya. Vul // *Carbon.* 2020. Vol. 161. P. 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.01.054>

Wallace K., Sardão V., Oliveira P. Mitochondrial determinants of doxorubicin induced cardiomyopathy // *Circ. Res.* 2020. Vol. 126, N 7. P. 926–941. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314681>

Winqvist R. J., Gribkoff V. K. Targeting putative components of the mitochondrial permeability transition pore for novel therapeutics // *Biochem. Pharmacol.* 2020. Vol. 177. 113995. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113995>

References

Berdicevskiy G.M., Vasina L.V., Galkin M.A. Izuchenie vliyaniya detonatsionnykh nanoalmazov na membranu mitokhondrii [Investigation of the effect of detonation nanodiamonds on the mitochondrial membrane]. *Sovremennye dostizheniya khimiko-biologicheskikh nauk v profilakticheskoi i klinicheskoi meditsine* [Modern achievements of chemical and biological sciences in preventive and clinical medicine: Proc. All-Russ. Sci. Conf., St.-Petersburg, Russia. Pt. 2]. St.-Petersburg, North-West. St. Med. Univ. Publ., 2020, pp. 23-28. (in Russian)

Vatlin A.A., Danilenko V.N. F₀F₁-ATFaza bakterii – nanomotor dlya sinteza i gidroliza ATF, mekhanizm vzaimodeistviya s makrolipidnym antibiotikom oligomitsinom [F₀F₁-ATPase of bacteria – a nanomotor for the synthesis and hydrolysis of ATP, a mechanism of interaction with the macrolipid antibiotic oligomycin]. *Biol. Bull. Rev.*, 2020, vol. 140, no. 3, pp. 231-243. (in Russian) <https://doi.org/10.31857/S0042132420020076>

Vul A.Ya., Shenderova O.A. *Detonatsionnye nanoalmazy. Tekhnologiya, struktura, svoystva i primeneniye* [Detonation nanodiamonds. Technology, structure, properties and application]. St-Petersburg, Ioffe Inst. Publ., 2016. 381 p. (in Russian)

Solomatin A.S., Yakovlev R.Yu., Fedotcheva N.I., Leonidov N.B. Izuchenie vliyaniya modifitsirovannykh nanoalmazov na membrannyy potentsial izolirovannykh mitokhondrii [Study of the effect of modified nanodiamonds on the membrane potential of isolated mitochondria]. *Materialy mezhregionalnoi nauchnoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem Riazanskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni akademika I. P. Pavlova* [Proc. Sci. Conf. of the I. P. Pavlov Univ., Ryazan, Russia]. Ryazan, 2014, pp. 347-350. (in Russian)

Kulakova I.I., Lisichkin G.V., Yakovlev R.Yu. *Khimicheskoe modifitsirovanie poverkhnosti detonatsionnogo nanoalmaz* [Chemical modification of the surface of detonation nanodiamond]. Moscow, Moscow St. Univ. Publ., 2018. 92 p. (in Russian)

Berdichevskiy G.M., Vasina L.V., Rjumina E.V., Sharoyko V.V., Semenov K.N. Perspektivy ispol'zovaniya nanoalmazov v meditsine (obzor) [Perspectives for the use of nanodiamonds in medicine (review)]. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 2021, vol. 24, no. 1, pp. 42-45. (in Russian). <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-05>

Gershanovich M.L., Filov V.A., Kotova D.G., Stukov A.N. Rezultaty kooperirovannogo klinicheskogo izucheniya protivopukholevogo preparata dioksadet po II faze [Results of a phase II cooperative clinical study of the anticancer drug dioxadet]. *Problems in Oncology*, 1998, vol. 44, no. 2, pp. 216-220. (in Russian)

Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Sheiko E.A. Mitokhondrii transformirovannoi kletki kak mishen protivopukholevogo vozdeistviya [Mitochondria of transformed cell as a target of antitumor influence]. *Res. Pract. Med. J.*, 2020, vol. 7, no. 2, pp. 92-108. (in Russian). <http://doi.org/10.17709/2409-2231-2020-7-2-9>

Berdichevskiy G.M., Vasina L.V., Ageev S.V., Meshcheriakov A.A., Galkin M.A., Ishmukhametov R.R., Nashchekin A.V., Kirilenko D.A., Petrov A.V., Martynova S.D., Semenov K.N., Sharoyko V.V. A comprehensive study of biocompatibility of detonation nanodiamonds. *J. Mol. Liq.*, 2021, vol. 332, 15763. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115763>

Ahmad Z., Hassan S.S., Azim S.A. Therapeutic connection between dietary phytochemicals and ATP synthase. *Curr. Med. Chem.*, 2017, vol. 24, no. 35, pp. 3894-3906. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170823125330>

Poot M., Zhang Yu-Z., Krämer J.A., Wells K.S., Jones L.J., Hanzel D.K., Lugade A.G., Singer V.L., Haugland R.P. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J. Histochem. Cytochem.*, 1996, vol. 44, is. 12, pp. 1363-1372. <https://doi.org/10.1177/44.12.8985128>

D'Alessandro M., Turina P., Melandri B.A. Quantitative evaluation of the intrinsic uncoupling modulated by ADP and Pi in the reconstituted ATP synthase of *Escherichia coli*. *BBA-Bioenergetics*, 2011, vol. 1807, is. 1, pp. 130-143. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.08.011>

Galkin M.A., Russell A.N., Vik S.B., Berry R.M., Ishmukhametov R.R. Detergent-free ultrafast reconstitution of membrane proteins into lipid bilayers using fusogenic complementary-charged proteoliposomes. *J. Vis. Exp.*, 2018, vol. 134, e56909. <https://doi.org/10.3791/56909>

Mizutani H., Oikawa S., Hiraku Y., Murata M., Kojima M., Kawanishi Sh. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper(II) and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Cancer Sci.* 2003, vol. 94, is. 8, pp. 686-691. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01503.x>

Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., Janssens S., Crijns H.J., Moens A.L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2012, vol. 52, is. 6, pp. 1213-1225. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>

Fedel M. Hemocompatibility of carbon nanostructures. *C – J. Carbon Res.*, 2020, vol. 1, is. 1, 12. <https://doi.org/10.3390/c6010012>

Hong S., Pedersen P.L. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2008, vol. 72, is. 4, pp. 590-641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-08>

Ishmukhametov R.R., Galkin M.A., Vik S.B. Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less Escherichia coli F1F0 ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, vol. 1706, is. 1-2, pp. 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.012>

Ishmukhametov R.R., Russell A.N., Berry R.M. A modular platform for one-step assembly of multi-component membrane systems by fusion of charged proteoliposomes. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7, 13025. <https://doi.org/10.1038/ncomms13025>

Panwar N., Soehartono A.M., Chan K.K., Zeng S., Xu G., Qu J., Coquet P., Yong K.T., Chen X., Nanocarbons for biology and medicine: sensing, imaging, and drug delivery. *Chem. Rev.*, 2019, vol. 119, is. 16, pp. 9559-9656. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00099>

Ali M.S., Metwally A.A., Fahmy R.H., Osman R. Nanodiamonds: Minuscule gems that ferry antineoplastic drugs to resistant tumors. *Int. J. Pharm.*, 2019, vol. 558, pp. 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.090>

Petit T., Puskar L. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diam. Relat. Mater.*, 2018 vol. 89, pp. 52-66. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.08.005>

Fu X., Shi Y., Qi T., Qiu S., Huang Y., Zhao X., Sun Q., Lin G. Precise design strategies of nanomedicine for improving cancer therapeutic efficacy using subcellular targeting. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 2020, vol. 15, 262. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00342-0>

Madamsetty V.S., Sharma A., Toma M., Samaniego S., Gallud A., Wang E., Pal K., Mukhopadhyay D., Fadeel B. Tumor selective uptake of drug-nanodiamond complexes improves therapeutic outcome in pancreatic cancer. *Nanomedicine*, 2019, vol. 18, pp. 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.020>

Turcheniuk K., Mochalin V.N. Biomedical applications of nanodiamond (Review). *Nanotechnology*, 2017, vol. 28, 252001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6ae4>

Kuznetsov N.M., Belousov S.I., Bakirov A.V., Chvalun S.N., Kamyshinsky R.A., Mikhutkin A.A., Vasiliev A.L., Tolstoy P.M., Mazur A.S., Eidelman E.D., Yudina E.B., Vul A.Y. Unique rheological behavior of detonation nanodiamond hydrosols: The nature of sol-gel transition. *Carbon*, 2020, vol. 161, pp. 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.01.054>

Wallace K., Sardão V., Oliveira P. Mitochondrial determinants of doxorubicin induced cardiomyopathy. *Circ. Res.*, 2020, vol. 126, no. 7, pp. 926-941. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314681>

Winqvist R.J., Gribkoff V.K. Targeting putative components of the mitochondrial permeability transition pore for novel therapeutics. *Biochem Pharmacol*, 2020, vol. 177, 113995. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113995>

Сведения об авторах

Бердичевский Григорий Михайлович

аспирант

Первый Санкт-Петербургский

государственный медицинский университет

им. акад. И. П. Павлова

Россия, 197022, г. Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, 6-8

e-mail: grishaberd@gmail.com

Васина Любовь Васильевна

доктор медицинских наук,

заведующий кафедрой

Первый Санкт-Петербургский

государственный медицинский университет

им. акад. И. П. Павлова

Россия, 197022, г. Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, 6-8

e-mail: lubov.vasina@gmail.com

Information about the authors

Berdichevskiy Grigory Mikhailovich

Undergraduate

Pavlov University

6-8, Lev Tolstoy st., Saint-Petersburg,

197022, Russian Federation

e-mail: grishaberd@gmail.com

Vasina Lubov Vasilievna

Doctor of Sciences (Medicine),

Head of Department

Pavlov University

6-8, Lev Tolstoy st., Saint-Petersburg,

197022, Russian Federation

e-mail: lubov.vasina@gmail.com

Галкин Михаил Александрович

кандидат биологических наук, доцент
Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова
Россия, 197022,
г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8
e-mail: miat2002@mail.ru

Galkin Mikhail Aleksandrovich

Candidate of Sciences (Biology),
Assistant Professor
Pavlov University
6-8, Lev Tolstoy st., Saint-Petersburg,
197022, Russian Federation
e-mail: miat2002@mail.ru

Шаройко Владимир Владимирович

доктор биологических наук, профессор
Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8
e-mail: sharoyko@gmail.com

Sharoyko Vladimir Vladimirovich

Doctor of Sciences (Biology), Professor
Pavlov University
6-8, Lev Tolstoy st., Saint-Petersburg, 1
97022, Russian Federation
e-mail: sharoyko@gmail.com

Семенов Константин Николаевич

доктор химических наук,
заведующий кафедрой
Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8
e-mail: knsemenov@gmail.com

Semenov Konstantin Nikolaevich

Doctor of Sciences (Chemistry),
Head of Department
Pavlov University
6-8, Lev Tolstoy st., Saint-Petersburg,
197022, Russian Federation
e-mail: knsemenov@gmail.com

Статья поступила в редакцию **09.04.2022**; одобрена после рецензирования **01.07.2022**; принята к публикации **22.07.2022**
Submitted **April, 09, 2022**; approved after reviewing **July, 01, 2022**; accepted for publication **July, 22, 2022**