

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХИНОН–СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ УНТ/ДНК

*Крылова Н.Г., Коваленко Е.А., Жолнеревич И.И.¹,
Ильич Т.В.², Корень С.В.³*

¹*Гродненский государственный университет им. Я. Купалы*

²*Белорусский государственный университет*

³*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии*

Адресная доставка препаратов является перспективным методом повышения эффективности терапии опухолей. Обладающие уникальными химическими и физическими свойствами, углеродные нанотрубки (УНТ) в настоящее время рассматриваются как перспективная платформа для создания средств высокоэффективной адресной доставки противоопухолевых препаратов [1–2]. С целью разработки биосовместимой УНТ–основанной системы доставки хинонов в работе выполнена оценка влияния нагруженных хинонами УНТ/ДНК комплексов в составе митохондриально–направленных липосом на респираторную активность, продукцию активных форм кислорода и трансмембранный потенциал митохондрий.

Липосомы формировались посредством ультразвуковой обработки пленки, состоящей из смеси стеариновой кислоты, декорированного катионом трифенилфосфония (TPP⁺) 1,2–диолеоила–*sn*–глицеро–3–фосфоэтаноламина и УНТ/ДНК комплексов.

Установлено, что наличие TPP⁺–группы обеспечивает накопление УНТ/ДНК комплексов в клетках (см. рис. 1а и рис. 1б). При культивировании клеток глиомы крысы линии С6 в течение 6 ч с комплексами МУНТ/ДНК в концентрации 100 мкг/мл наблюдается выраженная цитотоксичность: почти половина клеток открепляется от подложки, регистрируется большое число апоптотических телец, прикрепленные к подложке клетки приобретают округлую форму, резко уменьшается количество филоподий. УНТ образуют крупные скопления внутри клеток. Локализация УНТ – преимущественно в областях скопления митохондрий вблизи клеточного ядра. С использованием флуоресцентного зонда JC–1 изучено влияние УНТ/ДНК в различных концентрациях на митохондриальный потенциал клеток глиомы, результаты измерений представлены на рис. 1в. Видно, что снижение митохондриального потенциала регистрируется при концентрациях комплексов 65 мкг/мл и выше. Для регистрации продукции активных форм кислорода (АФК) изолированными митохондриями печени крыс использовался флуоресцентный зонд дихлородигидрофлуоресцеин (DCF), интегральная интенсивность флуоресценции DCF пропорциональна выходу АФК. Как видно из рис. 1г, комплексы УНТ/ДНК индуцируют повышение образования АФК уже в концентрации 4 мкг/мл, что может приводить к нарушению функционирования митохондрий даже при низких концентрациях УНТ. Так, установлено, что воздействие 13 мкг/мл комплексов

УНТ/ДНК на изолированные митохондрии приводит к коэффициента акцепторного контроля (АК) и росту коэффициента дыхательного контроля (ДК), однако значение коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) остается на уровне контроля; скорость набухания митохондрий снижается (см. рис. 2).

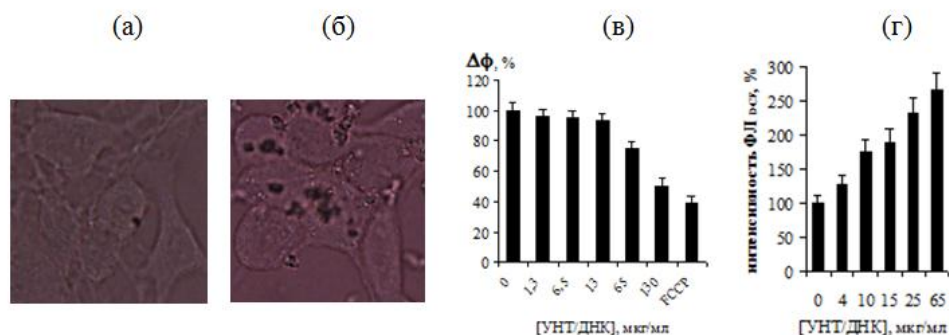


Рисунок 1 – (а–б) Изображения неокрашенных клеток глиомы в культуре после 6–и часового воздействия 100 мкг/мл комплексов МУНТ/ДНК, включенных в липосомы из стеариновой кислоты (а) и из смеси стеариновой кислоты и фосфолипида (б). (в) Митохондриальный потенциал клеток глиомы при действии комплексов УНТ/ДНК в различных концентрациях в течение 15 мин. (г) Интегральная интенсивность флуоресценции DCF за 40 мин в суспензии изолированных митохондрий печени крыс при действии комплексов УНТ/ДНК в различных концентрациях. В (в) и (г) результаты нормировались на значения в контрольных образцах без комплексов, принимаемых за 100 %.

Для оценки влияния нагруженных хинонами комплексов УНТ/ДНК в составе митохондриально–направленных липосомальных форм на функциональную активность митохондрий нами изучены респираторная активность, митохондриальный потенциал, продукция активных форм кислорода и скорость набухания изолированных митохондрий печени крыс, энергезированных сукцинатом. Анализ результатов показал, что в составе комплексов УНТ/ДНК менадион и доксорубицин значительно повышают скорость набухания митохондрий, продукцию АФК, снижают коэффициенты ДК и АДФ/О. Для менадиона также регистрируется снижение митохондриального потенциала. Эти данные свидетельствуют о нарушении функционирования электрон–транспортной цепи, дестабилизации кальциевого гомеостаза митохондрий. Скорость набухания митохондрий при действии свободного тимохинона была выше, чем для тимохинона в составе комплексов. Присутствие тимохинона в УНТ/ДНК комплексах не оказывало влияния на респираторную активность изолированных митохондрий (при сравнении с УНТ/ДНК комплексами без хинона). Следует отметить, что полученные эффекты могут быть обусловлены как эффективной доставкой и накоплением хинонов в митохондриях, так и непосредственным взаимодействием комплексов УНТ/ДНК–хинон с электрон–транспортной цепью и/или мембранными структурами митохондрий.

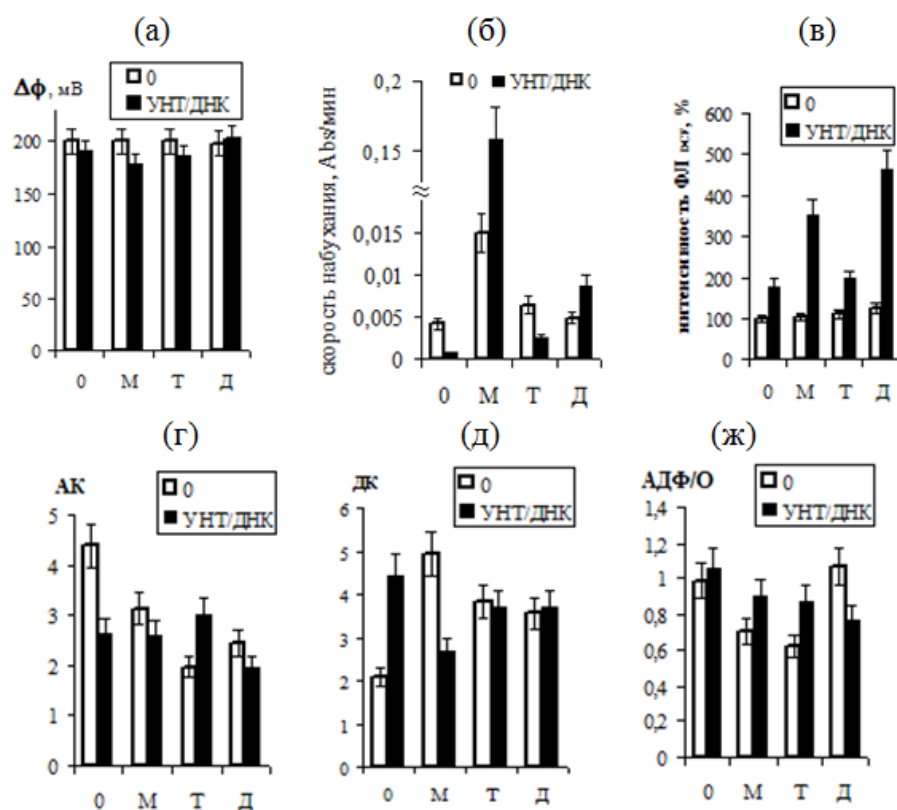


Рисунок 2 – Митохондриальный потенциал (а), скорость набухания (б), продукция АФК (в), коэффициенты респираторной активности (г–ж) изолированных митохондрий печени крыс при действии 13 мкг/мл комплексов УНТ/ДНК, нагруженных менадионом (М, 10 мкмоль/л), тимохиноном (Т, 10 мкмоль/л) и доксорубицином (Д, 1 мкмоль/л). 0 – контрольные образцы без комплексов.

Таким образом, комплексы УНТ/ДНК в составе липосомальных форм, декорированных катионом трифенилфосфониума, эффективно накапливаются в клетках и могут служить платформой адресной доставки хинонов в митохондрии. В то же время, УНТ/ДНК индуцируют образование АФК в митохондриях, и в высоких концентрациях приводят к дисфункции митохондрий, что обуславливает их цитотоксичность.

Список использованных источников

1. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools / S.Y. Madani [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2011. – Vol. 6. – P. 2963–2979.
2. How do carbon nanotubes serve as carriers for gemcitabine transport in a drug delivery system? / U. Arsaung [et al.] // *J. Mol. Graph. Model*. – 2011. –Vol. 29. –P. 591–596.