



УДК 546.26.043

С. В. Прилуцька

Дія комплексу C_{60} фулерену і доксорубіцину на пухлинні клітини *in vitro* та *in vivo*

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Р. С. Стойкою)

*Запропоновано технологічну схему для отримання стабільного водного розчину C_{60} фулерену з антибіотиком антрациклінового ряду доксорубіцином (Докс). Встановлено антинеопластичний ефект створеного комплексу C_{60} +Докс *in vitro* на клітини асцитної карциноми Ерліха, лейкозу L1210 та карциноми легені Льюїса, а також його протипухлинну дію на ріст карциноми легені Льюїса *in vivo*. Дані результати свідчать про потенційно високу ефективність застосування комплексу C_{60} +Докс в хіміотерапії злоякісних новоутворень.*

Однією з актуальних проблем розвитку сучасної біотехнології є вирішення комплексного завдання, що лежить на стику таких наук, як хімія, фізика, матеріалознавство, біологія, медицина, та передбачає цілеспрямований дизайн, синтез і вивчення функціональних властивостей наноматеріалів (розміром до 100 нм принаймні в одному з вимірів). Останнім притаманна висока біодоступність, низька токсичність та висока специфічна біоактивність. Відзначимо, що в найближчому майбутньому за допомогою запропонованих унікальних нанобіотехнологій буде розв'язана проблема ранньої діагностики злоякісних пухлин із визначенням їх локалізації і адресної доставки лікарських препаратів до органів-мішеней. Серед можливих перспективних і ефективних біомедичних лікарських засобів значне місце займає C_{60} фулерен.

C_{60} фулерен — це молекула майже сферичної форми діаметром 0,72 нм, поверхня якої складається з 60 атомів вуглецю, поєднаних між собою одинарними і подвійними хімічними зв'язками. Її можна синтезувати доступними хімічними методами, вона характеризується високою хімічною стабільністю та унікальними фотофізичними властивостями [1]. Завдяки нанорозміру, поєднанню міцності з малою масою, анти/прооксидантним властивостям [2, 3], біодоступності [4], здатності проникати всередину клітин [5, 6], немодифіковані C_{60} фулерени розглядають як фармацевтично цінні сполуки нового класу [7, 8]. Однак відзначимо, що поряд зі значними перспективами у використанні цих речовин у профілактиці та лікуванні захворювань, на цьому шляху існують також певні проблеми і перестороги. Так, дані біологічних досліджень водних дисперсій молекул C_{60} вказують на їх можливий токсичний вплив на організм людини. З іншого боку, наводяться докази, що немодифіковані C_{60} фулерени

© С. В. Прилуцька, 2014

при низьких концентраціях не є токсичними або принаймні не виявляють гострої токсичної дії у системах *in vitro* та *in vivo* [9, 10]. Встановлено, що токсичність молекул C_{60} істотно залежить від модифікації їхньої поверхні, умов синтезу і обробки, концентрації наночастинок у середовищі розчинника і відповідно розміру утворених з них агрегатів (кластерів). Припускають, що головними механізмами цитотоксичної дії C_{60} фулеренів є викликане ними перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), розвиток на цьому тлі оксидативного стресу та пов'язані з цим наслідки, зокрема ушкодження ДНК і некроз [11].

Одним із найпоширеніших терапевтичних засобів у хіміотерапії раку є антибіотик антрациклінового ряду — доксорубіцин (Докс) [12]. Однак його головними недоліками є кардіотоксичність і невисока специфічність, що істотно знижує ефективність лікувальної дії. Тому для покращення ефективності терапевтичної дії Докс необхідно розвивати альтернативні методи лікування злоякісних пухлин, включаючи цілеспрямований пошук нових субстанцій (зокрема, таргетних носіїв і агентів, які сприятимуть зниженню побічних ефектів). Можна припустити, що іммобілізація Докс на C_{60} фулерені [13] запобігатиме його токсичній дії на інтактні клітини і посилюватиме його проникнення в клітини-мішені.

Метою роботи було оцінити токсичний ефект комплексу C_{60} фулерену з доксорубіцином (C_{60} +Докс) *in vitro* на різні типи трансформованих клітин (асцитна карцинома Ерліха, лейкоз L1210 та карцинома легені Льюїса), а також протипухлинний ефект вказаного комплексу на ріст пухлин у експериментальних тварин із трансплантованою карциномою легені Льюїса; порівняти отримані результати з дією C_{60} фулерену окремо за умов *in vitro* та *in vivo*.

Матеріали та методи дослідження. Для приготування водного колоїдного розчину немодифікованих C_{60} фулеренів використовували розчин C_{60} фулерену в толуолі (чистота >99,5%), де його концентрація відповідала максимальній розчинності $\sim 2,9$ мг/мл, та однаковий об'єм дистильованої води. Утворені фази піддавали дії ультразвуку. Процедура продовжували до повного випаровування толуолу і набуття водною фазою жовтого забарвлення. За допомогою фільтрації водного розчину відділяли розчинний продукт від нерозчинених молекул C_{60} . Цей метод дозволяє отримати різні його концентрації у воді — від 0,01 до 1,2 мг/мл. Вимірювали спектри поглинання C_{60} фулерену у воді в діапазоні довжин хвиль від 200 до 700 нм при кімнатній температурі. Як виявилось, в УФ-ділянці спектра домінують дві інтенсивні широкі смуги поглинання з максимумами при 265 й 345 нм [4]. Водний колоїдний розчин цієї сполуки при концентрації 0,15 мг/мл і температурі 4 °C є стабільним протягом 12 міс. Отримані електронно-мікроскопічні зображення і дані малокутового розсіяння нейтронів чітко вказують на присутність у воді як окремих молекул C_{60} , так і їх агрегатів з характерним розміром до 80 нм (дані не представлені).

В експериментах використовували Докс ("Pfizer", Italy; ліофілізований порошок 10 мг), розчинений у фізіологічному розчині (0,9% NaCl) при вихідній концентрації 0,15 мг/мл. Іммобілізацію Докс на C_{60} фулерені проводили за методикою: вихідний водний розчин C_{60} фулерену і Докс змішували в об'ємному співвідношенні 1 : 2. Отриману суміш обробляли ультразвуковим диспергатором упродовж 20 хв, після чого перемішували ще 12 год магнітною мішалкою при кімнатній температурі. Вимірювали спектри поглинання нативного Докс і суміші C_{60} +Докс у діапазоні довжин хвиль від 400 до 600 нм при кімнатній температурі. Виразений гіпохромний ефект, що спостерігався в експерименті, свідчить про формування стабільного комплексу між Докс і C_{60} фулереном [13].

Доследи in vitro. Для оцінки цитотоксичного ефекту комплексу C_{60} +Докс і C_{60} фулерену (для порівняння) були використані клітини асцитної карциноми Ерліха, лейкозу L1210 і кар-

циноми легені Льюїса, що отримані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (м. Київ). 10 мкл водного колоїдного розчину C_{60} фулерену або суміші C_{60} + Докс додавали до 100 мкл суспензії клітин у кількості $\sim 3 \cdot 10^5$ та інкубували впродовж 18 год. Токсичний ефект досліджуваних препаратів вивчали з використанням МТТ-тесту [14], заснованого на здатності мітохондріальних дегідрогеназ дихального ланцюга перетворювати 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразолій бромід (МТТ) на формазан, який кристалізується в клітині. Суспензію клітин, що містила цей препарат, інкубували в присутності МТТ упродовж 3,5 год при 37 °С. Осад формазану розчиняли в концентрованому розчині DMSO. Вимірювання екстинкції проводили на цифровому спектрофотометрі (μ Quant, БіоТЕК, США) на довжині хвилі 540 нм. Цитотоксичну активність досліджуваного препарату розраховували за формулою: $(1 - \varepsilon/\varepsilon_0) \cdot 100\%$, де ε_0 і ε — екстинкція контрольної та дослідної проби відповідно.

Дослиди in vivo. Самці мишей лінії С57В/6 (вага 20–25 г) перебували на стандартній дієті віварію (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ) при температурі (25 ± 1) °С. Усі експерименти проводили відповідно до нормативів Європейської конвенції про захист хребетних тварин під контролем біоетичної комісії вказаної установи.

Карцинома легені Льюїса була трансплантована внутрішньом'язово в кінцівку мишей ($5 \cdot 10^5$ пухлинних клітин у 0,2 мл фізіологічного розчину). Як відомо, цей тип пухлини характеризується високим ступенем метастазування в легеню [8]. Тварини розподіляли на три групи: перша — миші з перещепленою пухлиною, яким на наступну добу після цього внутрішньочеревно вводили 0,9% NaCl в об'ємі 0,2 мл п'ять разів через день (контроль, $n = 7$); друга — миші, яким на наступну добу після перещеплення пухлини внутрішньочеревно вводили водний колоїдний розчин C_{60} фулерену в об'ємі 0,2 мл п'ять разів через день ($n = 7$) [8]; третя — миші, яким на наступну добу після перещеплення пухлини внутрішньочеревно вводили суміш C_{60} +Докс в об'ємі 0,2 мл п'ять разів через день ($n = 7$). Кінцеві дози C_{60} фулерену та комплексу C_{60} +Докс становили 7,5 мг/кг. Характер введення препаратів, що містили C_{60} фулерен, обрано з урахуванням того факту, що молекули C_{60} , які вводили внутрішньочеревно щурам (доза — 500 мг/кг), виводилися з організму впродовж 2–4 діб [15]. Варто також зазначити, що використана доза C_{60} фулерену в експериментах була значно нижчою за значення ЛД₅₀, що при пероральному введенні мишам становила 600 мг/кг ваги тіла [15].

Кінетику росту карциноми легені Льюїса у мишей досліджували шляхом вимірювання її поперечних розмірів (a й b — довжина й ширина (в мм) відповідно) та розрахунку об'єму пухлини за формулою: $V = 1/2((a + b)/2)^3$ [8]. Вимірювання розпочинали на 10-у добу після перещеплення пухлини, коли її спостерігали візуально, і закінчували на 21-у добу експерименту після загибелі першої тварини у контрольній групі.

Статистичний аналіз вірогідності експериментальних даних проводили за допомогою t -критерію Стьюдента (рівень значущості $p \leq 0,05$) з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова–Смірнова.

Результати та їх обговорення. Отриманими результатами з вивчення цитотоксичної активності (за допомогою МТТ-тесту) досліджуваних препаратів щодо пухлинних клітин різного типу доведено, що C_{60} фулерен (0,15 мг/мл) проявляє максимальний токсичний ефект на клітини асцитної карциноми Ерліха ($\sim 26\%$), взагалі не виявляє такої дії щодо клітин лейкозу L1210 і, навпаки, на $\sim 17\%$ стимулює ріст клітин карциноми легені Льюїса (*вибірковість цитотоксичної дії C_{60} фулерену*). Можливо, це зумовлено посиленням

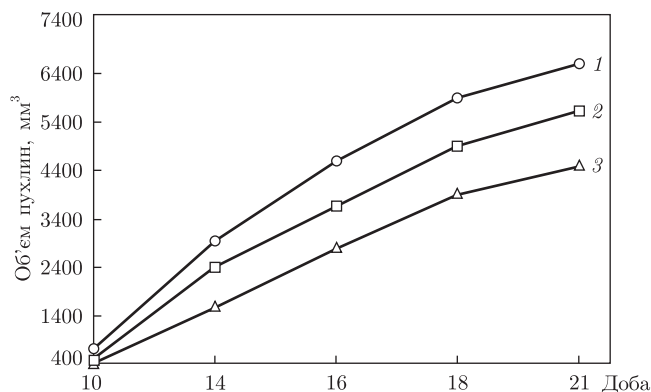


Рис. 1. Динаміка росту карциноми легені Льюїса у мишей трьох груп: 1 — контроль; 2 — за умов введення C₆₀ фулерену; 3 — за умов введення комплексу C₆₀ + Докс. $p \leq 0,05$ відносно контролю. Номери кривих відповідають номерам груп

метаболізму, що зумовлює зростання проліферативної активності клітин карциноми легені Льюїса.

Застосування комплексу C₆₀+Докс порівняно з дією C₆₀ фулерену характеризувалося значним зростанням токсичного впливу на всі типи пухлинних клітин *in vitro*: на ~78% щодо клітин асцитної карциноми Ерліха, ~60% щодо клітин лейкозу L1210 і ~91% щодо клітин карциноми легені Льюїса.

Кінетика росту карциноми легені Льюїса *in vivo* впродовж тривалості експерименту (з 10 до 21-ї доби) має нелінійний характер (рис. 1). Отримані дані свідчать, що у другій групі (введення C₆₀ фулерену) гальмування росту (об'єму) пухлини на 16 і 21-у добу експерименту становило 18 і 17% відповідно у порівнянні з контрольною групою, у той час як у третій групі (введення комплексу C₆₀+Докс) — 37 і 33% відповідно. Отже, протипухлинна дія вказаного комплексу майже вдвічі перевищила протипухлинну дію C₆₀ фулерену.

Таким чином, створено стабільний комплекс C₆₀+Докс, який можна розглядати як *новий фармакологічний препарат*. Як за умов *in vitro*, так і *in vivo* використання комплексу C₆₀+Докс призводить до підвищеного токсичного впливу на пухлинні клітини порівняно з використанням вільного C₆₀ фулерену.

Можна припустити, що завдяки унікальній системі спряжених подвійних зв'язків на поверхні C₆₀ фулерену він здатен нейтралізувати активні форми кисню (АФК), приєднуючи неспарений електрон і перетворюючись на стабільний радикал C₆₀⁻. Це дозволяє запобігати цитотоксичним ефектам АФК, які продукуються в інтактних клітинах у випадку використання традиційного протипухлинного препарату Докс (*антиоксидантна активність* C₆₀ фулерену). Крім цього, C₆₀ фулерен може слугувати засобом доставки протипухлинного чинника, зокрема Докс, до клітин злоякісних пухлин (*C₆₀ фулерен як носій лікарських препаратів*).

1. Матисhevська О. П., Прилуцька С. В., Гринюк І. І. Фулерени C₆₀ — біологічно активні молекули. І. Фізико-хімічні властивості та біодоступність // Біотехнологія. — 2010. — **3**, № 1. — С. 18–26.
2. Burlaka A. P., Sidorik E. P., Prylutska S. V. et al. Catalytic system of the reactive oxygen species on the C₆₀ fullerene basis // Exp. Oncol. — 2004. — **26**. — P. 326–327.
3. Prylutska S. V., Grynjuk I. I., Matyshevska O. P. et al. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro* // Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct. — 2008. — **16**. — P. 698–705.
4. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L. et al. Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data // Carbon. — 2004. — **42**. — P. 1203–1206.

5. Prylutska S. V., Matyshevska O. P., Grynyuk I. I. et al. Biological effects of C₆₀ fullerenes *in vitro* and in a model system // Mol. Cryst. Liq. Cryst. – 2007. – **468**. – P. 265–274.
6. Prylutska S., Bilyy R., Overchuk M. et al. Water-soluble pristine fullerenes C₆₀ increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane // J. Biomed. Nanotechnol. – 2012. – **8**. – P. 522–527.
7. Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes. – Ser. Carbon Materials: Chemistry and Physics / Ed. F. Cataldo, T. Da Ros. – Berlin: Springer, 2008. – Vol. 1.
8. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutsky Yu. I. et al. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis // Exp. Oncol. – 2011. – **33**. – P. 162–164.
9. Andrievsky G., Klochkov V., Derevyanchenko L. Is the C₆₀ Fullerene Molecule Toxic?! // Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct. – 2005. – **13**. – P. 363–376.
10. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Grebinyk S. M. et al. Comparative study of biological action of fullerenes C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells // Mat.-wiss. u. Werkstofftech. – 2009. – **40**. – P. 238–241.
11. Rouse J. G., Yang J., Barton A. R., Monteiro-Reviere N. A. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes // Toxicol. In Vitro. – 2006. – **20**. – P. 1313–1320.
12. Hrelia S., Fiorentini D., Maraldi T. et al. Doxorubicin induced early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes // Biochem. Biophys. Acta. – 2002. – **64**. – P. 139–145.
13. Evstigneev M. P., Buchelnikov A. S., Voronin D. P. et al. Complexation of C₆₀ fullerene with aromatic drugs // Chem. Phys. Chem. – 2013. – **14**. – P. 568–578.
14. Carmichael J., De Graff W. G., Gazdar A. F. et al. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay // Br. J. Cancer. – 1991. – **63**. – P. 75–83.
15. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M. et al. C₆₀ fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity // Nano Lett. – 2005. – **5**. – P. 2578–2585.

Київський національний
університет ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 26.11.2013

С. В. Прилуцкая

Действие комплекса C₆₀ фуллерена и доксорубицина на опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*

*Предложена технологическая схема для получения стабильного водного раствора C₆₀ фуллерена с антибиотиком антрациклинового ряда доксорубицином (Докс). Установлен антинеопластичный эффект созданного комплекса C₆₀+Докс *in vitro* на клетки асцитной карциномы Эрлиха, лейкоза L1210 и карциномы легкого Льюиса, а также его противоопухолевое действие на рост карциномы легкого Льюиса *in vivo*. Данные результаты свидетельствуют о потенциально высокой эффективности применения комплекса C₆₀+Докс в химиотерапии злокачественных новообразований.*

S. V. Prylutska

Effect of the complex of C₆₀ fullerene with doxorubicin on tumor cells *in vitro* and *in vivo*

*A technological scheme for preparing a stable aqueous solution of C₆₀ fullerene with an antibiotic doxorubicin (Dox) of the anthracycline row is proposed. The toxic effect of the C₆₀+Dox complex on cells of Ehrlich ascites carcinoma, leukemia L1210, and Lewis lung carcinoma is demonstrated. Its antitumor effect on Lewis lung carcinoma *in vivo* was also shown. Thus, a high efficiency of the C₆₀+Dox complex in the anticancer therapy is postulated.*