Biol. Stud. 2013: 7(1); 5–20 • DOI: https://doi.org/10.30970/sbi.0701.240
www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology

УДК: 548.736.1:546.26-126+615.277.3

СИНЕРГІЧНА АНТИНЕОПЛАСТИЧНА ДІЯ КОМПЛЕКСІВ ДОКСОРУБІЦИНУ І ФУЛЕРЕНУ C_{60} ЯК ЗАСОБУ ЙОГО ДОСТАВКИ ДО ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ У ДОСЛІДАХ *IN VITRO*: КЛІТИННІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ

Р. Р. Панчук[1], ***В. В. Чумак***[2], ***Н. Р. Скорохід***[1], ***Л. В. Легка***[1], ***С. В. Прилуцька***[3], ***П. Хеффетер***[4], ***В. Бергер***[4], ***Р. С. Стойка***[1,2], ***Ю. І. Прилуцький***[3]

[1]*Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна*
[2]*Львівський національний університет імені Івана Франка вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*
[3]*Київський національний університет ім. Т. Шевченка, ННЦ «Інститут біології» вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна*
[4]*Інститут ракових досліджень, Медичний університет Відня вул. Боршкегассе, 8а, Відень 1090, Австрія*
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Актуальним завданням сучасної фармацевтики є розробка нових лікарських форм, що базуються на використанні спеціальних нанорозмірних носіїв для підвищення адресності доставки ліків до клітин-мішеней. Застосування таких нанокомпозитів дає змогу не лише продовжити тривалість дії ліків в організмі, але й збільшити їхню біологічну доступність і, що важливо, знизити побічні ефекти від хіміотерапії у пацієнтів. Нами використано нанорозмірний комплекс на основі фулерену C_{60} і відомого протипухлинного препарату доксорубіцину. Встановлено, що іммобілізація доксорубіцину на фулерені C_{60} дає змогу у 2–3 рази посилити антинеопластичну дію цього лікарського препарату *in vitro* щодо різних ліній злоякісних клітин порівняно з дією вільного доксорубіцину. Цитоморфологічними дослідженнями показано, що загибель злоякісних клітин-мішеней, на які діяли згаданим вище нанокомплексом, відбувається шляхом апоптозу. Індукція апоптозу за дії цього нанокомплексу супроводжується генерацією супероксидних радикалів, рівень яких значно зростає вже на 1-шу годину дії цього комплексу і досягає максимального значення через 3 години. Одержані результати свідчать про перспективність застосування фулерен C_{60}-доксорубіцинового комплексу в хіміотерапії злоякісних пухлин.

Ключові слова: фулерен C_{60}, доксорубіцин, нанокомплекс, активні форми кисню, апоптоз, резистентність пухлин до ліків.

ВСТУП

Фулерен C_{60} – це третя алотропна модифікація вуглецю, яка була відкрита в 1985 році [12]. Завдяки унікальній структурі молекули, що нагадує футбольний

м'яч, фулерен C_{60} має низку цікавих біологічних властивостей [1]. Специфічні фізико-хімічні властивості фулерену C_{60} були однією з передумов активних досліджень у галузі персоналізованої терапії пухлин (тераностики), яка набуває особливої актуальності [2, 8, 16, 19]. Наразі функціоналізовані фулерени C_{60} активно вивчаються на предмет їх потенційного застосування у хіміотерапії пухлин. Зокрема, запропоновано використовувати комплекси фулеренів з металами (металофулерени) як контрастуючий чинник під час магнітно-резонансної томографії (МРТ). Відомо, що вони є менш токсичними для організму і демонструють у 20 разів кращі фізико-хімічні характеристики порівняно з хелатами гадолінію, які нині застосовують для цієї мети [14]. Ця властивість металофулеренів реалізується завдяки міцному зв'язуванню атома металу у вуглецевій „клітці" фулерену C_{60} і т. зв. внутрішньофулеренового перенесення електронів від металу до вуглецевої „клітки", що суттєво посилює специфічні фізичні властивості такого комплексу загалом.

Унікальна хімічна структура молекули C_{60} є причиною інших цікавих фізико-хімічних властивостей сполук на їх основі, зокрема генерування активних форм кисню (АФК) за дії видимого світла, що робить їх потенційними ліками для використання у фотодинамічній терапії злоякісних новоутворень [4, 9, 17].

Основним методом лікування раку досі залишається хіміотерапія, яка останнім часом зіткнулася з низкою суттєвих проблем, а саме швидким розвитком множинної стійкості злоякісних клітин до хіміотерапевтичних засобів і високої токсичності протипухлинних препаратів щодо нормальних клітин організму [21].

Було запропоновано іммобілізувати протипухлинні препарати на фулеренах для покращення характеристик цих лікарських засобів і надання їм нових властивостей [3]. Ковалентна кон'югація протипухлинного агента паклітакселу на фулеренах дала змогу створити ліпофільну систему доставки цього препарату з повільним його вивільненням з метою підвищення терапевтичної ефективності [22]. При цьому вдалося зберегти протипухлинний потенціал паклітакселу в складі нанокон'югату, який *in vitro* виявився рівноцінним до дії нативного паклітакселу. Іншим поширеним препаратом у хіміотерапії раку є доксорубіцин, основним недоліком якого є висока токсичність для нормальних клітин організму і невелика вибірковість дії, що суттєво знижує ефективність його лікувального ефекту. Показано, що іммобілізація доксорубіцину на фулеренах і їхніх похідних дає змогу частково знизити побічні ефекти дії цього препарату на нормальні клітини, посилити його проникнення у клітини-мішені й оптимізувати умови його вивільнення з цих комплексів залежно від pH мікросередовища [5, 7, 11, 18].

Разом з тим, молекулярні механізми дії таких нанорозмірних комплексів фулеренів із доксорубіцином залишаються маловивченими. Зокрема, невідомо, яким саме шляхом здійснюється модуляція протипухлинної активності доксорубіцину фулеренами і чи можуть ці комплекси не лише покращувати дію цього агента, але й сприяти подоланню набутої резистентності злоякісних клітин до хіміотерапії. Завданням проведеної роботи і було знайти відповіді на ці ключові питання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Водний колоїдний розчин фулерену C_{60} (0,1 мг/мл) був синтезований у Технічному університеті Ілменау (Ілменау, ФРН) за методикою [20].

Кон'югацію доксорубіцину („Pfizer", Італія) з фулереном C_{60} проводили згідно з методикою, описаною раніше [10]. Фулерен C_{60} та доксорубіцин змішували

у масовому співвідношенні 1:1,5 і отриману суміш обробляли на ультразвуковому диспергаторі упродовж 15 хв на льоді, після чого залишали її перемішуватися на ніч на магнітному змішувачі при +4°С.

Клітини лінії Jurkat Т-лейкозу людини, клітини карциноми молочної залози людини лінії MCF-7, клітини лейкемії людини HL-60 та її резистентна до вінкристину сублінія HL-60/vinc, що характеризується надекспресією Р-глікопротеїну, а також клітини карциноми шийки матки людини лінії KB-3-1 та її резистентна до колхіцину сублінія KBC-1, що характеризується надекспресією Р-глікопротеїну, та ізогенні лінії клітин HCT-116 карциноми прямої кишки людини, профіцитні й нокаутні по гену p53, були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня (Австрія). Клітини вирощували в середовищі RPMI за присутності декомплементованої сироватки крові великої рогатої худоби („Sigma", США) і 50 мкг/мл гентаміцину („Sigma", США) в інкубаторі із 5% вмістом CO_2 при 37°С. Клітини пересівали через кожні три дні розведенням клітинної суспензії у співвідношенні 1:5.

Для експериментів клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети (Costar) та 50 мл пластикові культуральні флакони (Greiner Bio-one, ФРН). Підрахунок кількості клітин здійснювали через 24 години після додавання препаратів у гемоцитометричній камері. Кількість мертвих клітин визначали після їх фарбування 0,1% розчином трипанового синього (при цьому мертві клітини мали синій колір, а живі залишалися незабарвленими). Також для оцінки антипроліферативного ефекту досліджуваних субстанцій було використано EZ4U kit (Vienna Biomedica, Відень, Австрія), що ґрунтується на здатності живих клітин відновлювати безбарвну тетразолієву сіль до кольорового субстрату – формазану.

Для візуалізації хроматину в ядрі клітин MCF-7 їх промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), фіксували 15 хв за кімнатної температури у 4% розчині параформальдегіду у ЗФР і пермеабілізували 3 хв розчином, який містив 0,1% Triton-X100 у ЗФР. Потім клітини інкубували упродовж 5 хв у ЗФР, що містив 1 мкг/мл 4,6-діамідино-2-феніліндолу (DAPI) (Sigma). Після промивання ЗФР на предметне скло з клітинами наносили спеціальне середовище GelMount (Sigma) для тривалого збереження флуоресценції та покривне скло. Клітини досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss AxioImager A1 (CarlZeiss, ФРН).

Для визначення вмісту різних АФК у клітинах-мішенях за дії досліджуваної сполуки використовували флуоресцентні барвники дихлорофлуоресцеїндіацетат (DCFDA, специфічний щодо пероксиду водню H_2O_2) і дигідроетидій (DHE, специфічний щодо супероксид-радикалів O_2^-). Для визначення рівня пероксиду водню проводили преінкубацію клітин Т-лейкемії людини лінії Jurkat з DCFDA (10 мкМ, 30 хв) перед додаванням препаратів і після завершення часу інкубації з препаратами (1, 3, 6 год) одразу аналізували флуоресценцію зразків на першому каналі (FL1) проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Для оцінки продукції супероксид-радикалів клітини карциноми прямої кишки людини лінії HCT-116 висівали на скельця у 24-лунковй планшет, додавали досліджувані сполуки і за 30 хв до завершення експерименту в середовище вносили 10 мкМ DHE. Після завершення інкубації з флуорохромом клітини промивали ЗФР, переносили покривні скельця з клітинами на предметне скло і одразу аналізували флуоресценцію зразків на червоному каналі за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, ФРН).

Кількісний аналіз показників флуоресценції проводили за допомогою програми ImageJ (NCI, США). Для статистичної обробки результатів дослідження обчислювали стандартний розкид даних у межах однієї групи, а також статистичну достовірність різниці між двома групами даних із урахуванням коефіцієнта Стьюдента (t-test). Статистично достовірною вважали різницю за $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Для підтвердження утворення стабільного комплексу між фулереном С60 і доксорубіцином були проведені детальні фізико-хімічні дослідження отриманих нанокон'югатів.

Можливість прямого комплексоутворення між молекулами фулерену C_{60} і доксорубіцину в суміші, що містила фулерен і доксорубіцин у співвідношенні 1:1, було досліджено методом UV-Vis спектроскопії. Для того, щоб виключити вплив розсіювання на базовій лінії для спектра комплексу C_{60}+Dx і створити умови для порівняльного аналізу, спектри доксорубіцину і комплексу C_{60}+Dx були прив'язані до нуля при 650 нм (рис. 1). На рис. 1 показано перетворення спектра доксорубіцину до і після комплексоутворення з фулереном С60. Гіпохромний зсув максимуму поглинання молекули антибіотика з 481,5 нм (Dx) до 479,0 нм (C_{60}+Dx) чітко вказує на утворення комплексів фулерену C_{60} і доксорубіцину у водному розчині.

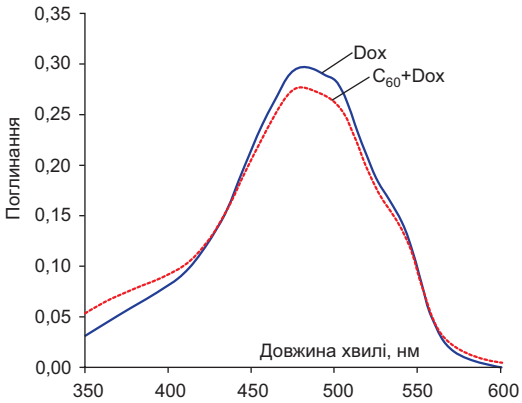

Рис. 1. Електронні спектри поглинання Dox (0,26 мМ) за наявності та за відсутності фулерену (співвідношення сполук у суміші 1:1)

Fig. 1. Electronic absorption spectra of Dox (0.26 mM) in the presence and absence of C_{60} fullerene in 1:1 composition of the mixture

Подальші дослідження взаємодії фулерену C_{60} та доксорубіцину шляхом вивчення розподілу за розмірами фулеренових кластерів були виконані за допомогою техніки DLS (рис. 2). Нами показано, що кон'югація доксорубіцину на фулерені C_{60} призводить до суттєвого збільшення середнього розміру частинок – з 160 до 600 нм. Такий феномен не може бути пояснено зовнішнім зв'язуванням молекул доксорубіцину на поверхні фулеренів і, очевидно, є наслідком формування великих кластерів, що складаються з упорядкованої суміші доксорубіцину та молекул фулерену C_{60} всередині них. У нашій попередній роботі [12] цей ефект, що отримав назву ліганд-індукована агрегація фулеренів, проявлявся у немонотонності кривих титрування фулерену C_{60} у разі його зв'язування з різними ароматичними молекулами, за даними UV-VIS спектрофотометрії.

Можливість формування впорядкованих структур, що містять фулерен C_{60} і ароматичні молекули, добре відома в хімії фулеренів (див., наприклад, [5, 7]). При цьому плоскі ароматичні молекули, які розміщуються між двома фулеренами, можуть

виступати як клей, утримуючи їх разом за рахунок ван-дер-ваальсових сил або ж шляхом скорочення внутрішнього електростатичного відштовхування молекул фулерену C_{60} у розчині. Ефект ліганд-індукованої агрегації дає змогу пояснити бімодальну форму виявленого нами розподілу розмірів у суміші C_{60}+Dx. Очевидно, що основний пік – це упорядкована суміш фулерену C_{60} і доксорубіцину, тоді як мінорний пік в основному складається тільки з молекул фулерену C_{60} (див. рис. 2). Існування великих кластерів фулерену C_{60}, які включають у себе молекули антибіотика, є надзвичайно важливим, тому що такі кластери можуть виступати як носії для доставки доксорубіцину до клітин-мішеней, що могло би потенційно посилити його біологічну дію.

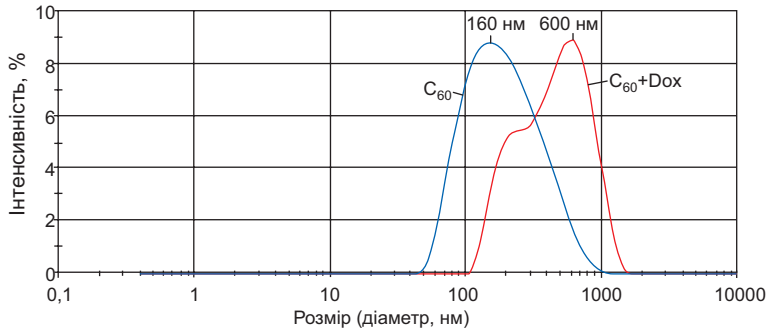

Рис. 2. Розподіл суміші фулерену C_{60} і доксорубіцину за розміром молекул

Fig. 2. Size distribution of C_{60}FAS and C_{60}+Dox complex

За даними молекулярного моделювання максимальне заповнення поверхні молекули фулерену C_{60} зв'язаними молекулами доксорубіцину становить 1:3 (тобто в оптимальніших умовах з однією молекулою фулерену C_{60} можуть одночасно зв'язатися три молекули доксорубіцину (див. рис. 3). Однак подальші дослідження вказують на те, що оптимальне співвідношення фулерену та доксорубіцину має бути дещо меншим – 1:1,5–2, що дає змогу досягти найбільш вираженого синергічного ефекту в їх дії.

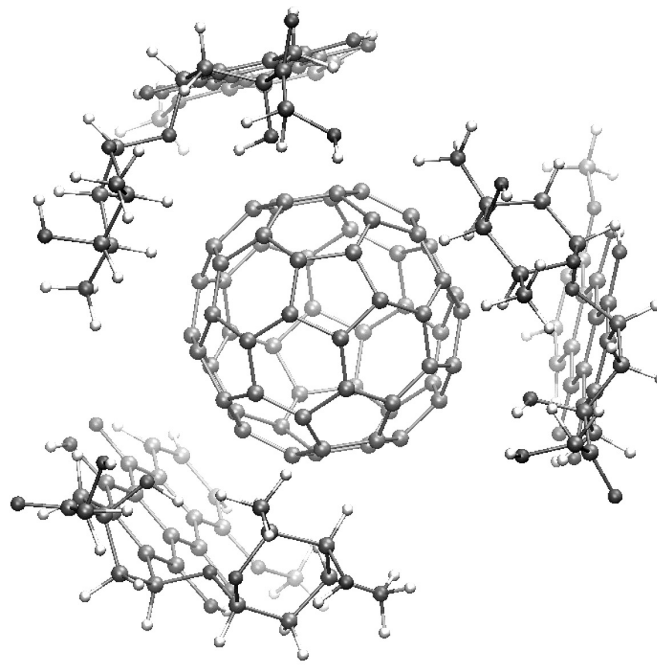

Рис. 3. Експериментально обрахована структура комплексу фулерену C_{60} і доксорубіцину у співвідношенні 1:3

Fig. 3. Calculated structure of 1:3 C_{60}+Dox complex

На першому етапі дослідження було проведено аналіз цитотоксичної дії нанокомпозиту на основі фулерену C_{60} і доксорубіцину на різні лінії злоякісних клітин та порівняно з такою активністю доксорубіцину у вільному стані. Як видно з рис. *4*, А, на клітинах Т-лейкемії людини фулерен-вмісні нанокомпозити діють у середньому в 2–2,5 разу активніше, ніж нативний доксорубіцин, причому такий ефект спостерігався як для низьких (0,1 мкМ), так і для високих концентрацій (0,5 мкМ) досліджуваних сполук. Важливо зазначити, що навіть у максимальній дозі (1,9 мкг/мл, що еквівалентна 1 мкМ доксорубіцину в нанокомпозиті) фулерени не проявляли вираженої токсичності щодо досліджуваних клітин (15% мертвих клітин порівняно з 3–5% у контролі), тому виявлений феномен неможливо пояснити лише кумулятивним ефектом від дії доксорубіцину та фулеренів (рис. 1, *Б*). Аналогічна тенденція була виявлена і для карциномних клітин лінії HCT-116 (рис. 4, *В, Г*). Зокрема, вже в концентрації 0,5 мкМ фулерен-доксорубіцинові комплекси призводили до загибелі понад 55% клітин, тоді як нативний доксорубіцин у цій же дозі виявляв значно слабший ефект – усього 20% мертвих клітин (рис. 4, *В, Г*). Ще більш виражений ефект від дії фулерен-доксорубіцинових комплексів спостерігали при дозі 1 мкМ, коли гинуло понад 80% клітин, тоді як за дії нативного доксорубіцину цей показник становив лише 45%. Нами не виявлено принципової різниці за дії фулерен-

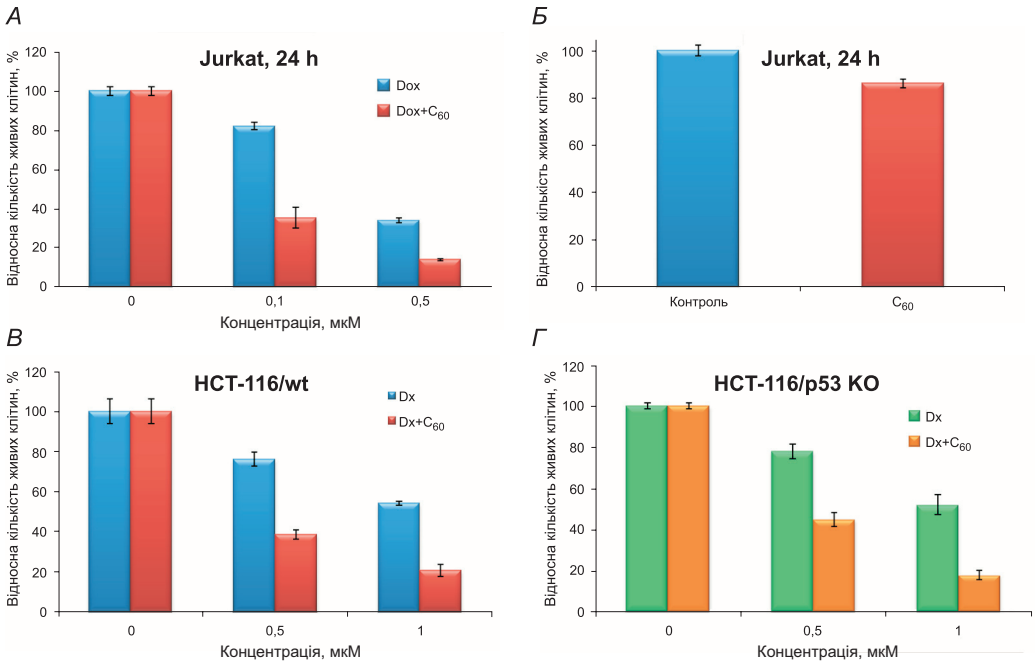

Рис. 4. Дослідження цитотоксичної активності фулерен-доксорубіцинових комплексів порівняно з нативним доксорубіцином і нативними фулеренами на клітинах Т-лейкемії людини лінії Jurkat (*А, Б*) і клітинах карциноми прямої кишки людини лінії HCT-116 дикого типу (*В*) та з нокаутом гена p53 (*Г*)

Fig. 4. Study of cytotoxic activity of C_{60}-doxorubicin complexes in comparison with native doxorubicin and native fullerenes in human T-leukemia Jurkat cells (*А, Б*) and human colorectal carcinoma cells of HCT-116 line – wild-type (*В*) and with knockout of p53 gene (*Г*)

нанокомпозитних комплексів на клітини, профіцитні по гену p53, та сублінію HCT-116 із нокаутом цього гена (HCT-116/p53 KO), що свідчить про p53-незалежний шлях індукції клітинної смерті цими сполуками. Отже, іммобілізація доксорубіцину на фулерені C_{60} дає змогу у 2–3 рази посилити його протипухлинний ефект щодо лейкемічних і карциномних клітин порівняно з доксорубіцином у нативному стані. У той же час білкові продукти гена p53 не відіграють важливої ролі у цьому процесі.

Створення нових нанорозмірних форм уже відомих ліків, крім забезпечення їх цілеспрямованої доставки до клітин-мішеней, також має сприяти покращенню їх фармакодинаміки, що допомагало б таким нанокомпозитам долати стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії. Для того, щоб перевірити, чи має такий вплив іммобілізація доксорубіцину на фулеренах, нами було досліджено цитотоксичну активність цих комплексів на двох моделях клітинних ліній, резистентних до хіміотерапії. Було обрано клітини лейкемії людини лінії HL-60 та резистентну до вінкристину сублінію HL-60/vinc, клітини карциноми шийки матки людини лінії KB-3-1 та її резистентну до вінкристину сублінію KBC-1. Обидві лінії клітин характеризуються надекспресією ABC-транспортера P-глікопротеїну, який за допомогою активного транспорту викачує молекули ліків із пухлинної клітини у позаклітинне середовище [13].

Як видно з даних, наведених на рис. 5, різниця між фулерен-доксорубіциновими нанокомпозитами і нативним доксорубіцином у їхній дії на чутливі до ліків клітини

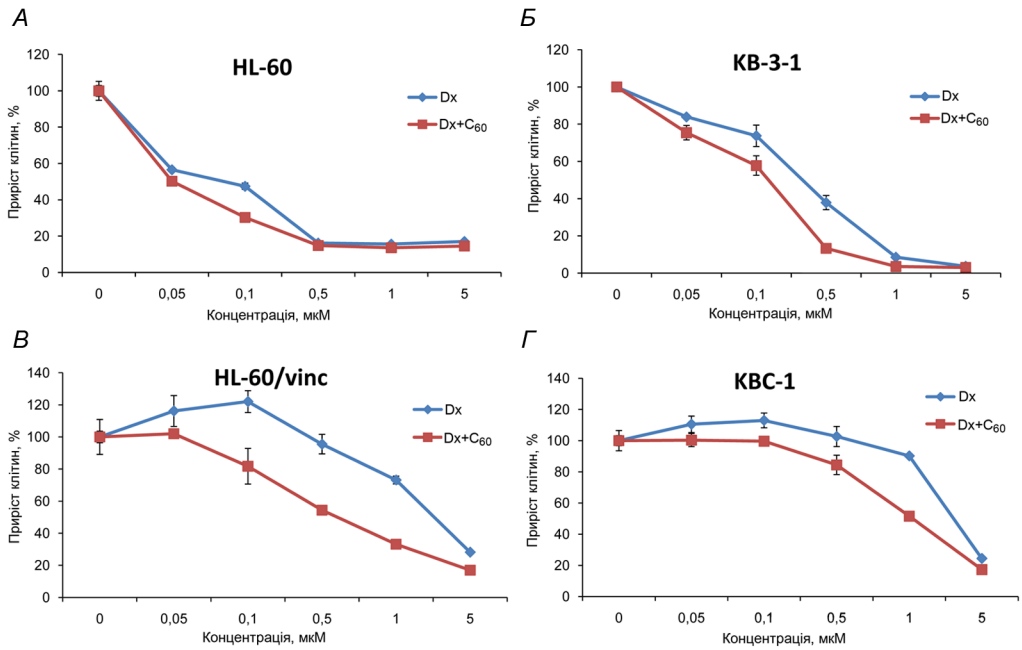

Рис. 5. Дослідження здатності фулерен-доксорубіцинових комплексів долати стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії на моделі лейкемії людини лінії HL-60 та її сублінії HL-60/vinc, резистентної до вінкристину (*А*), та карциноми шийки матки людини лінії KB-3-1, і її сублінії KBC-1, резистентної до колхіцину (*Б*)

Fig. 5. Study of capability of C_{60}-doxorubicin complexes to overcome multidrug resistance of tumor cells in the model of human leukemia cells of HL-60 line and its vincristine resistant subline HL-60/vinc (*А, Б*), and human cervix carcinoma cells of KB-3-1 line and its colchicine resistant subline KBC-1 (*В, Г*)

практично відсутня. Це можна пояснити гіперчутливістю цих клітин до доксорубіцину. Однак у випадку із резистентними сублініями HL-60/vinc і KBC-1, стійкість яких до доксорубіцину зростає у 100 разів, фулерен-нанокомпозитні комплекси демонстрували у 2–4 рази потужніший ефект, ніж нативний доксорубіцин (рис. 5). Цей феномен можна пояснити більш адресною доставкою доксорубіцину в клітини-мішені за допомогою фулеренів і швидшим накопиченням цього лікарського засобу в пухлинних клітинах, через що ABC-транспортери не встигають видалити його у позаклітинне середовище.

Щоб пересвідчитися, чи швидше накопичення доксорубіцину в клітинах-мішенях за дії нанокомпозитів також може інтенсифікувати процеси клітинної смерті (апоптозу), індукованого цим протипухлинним препаратом, були вивчені зміни у структурі хроматину карциномних клітин лінії MCF-7 за допомогою барвника DAPI. Як відомо, гіперконденсація хроматину та розпад ядра на окремі фрагменти є однією з типових ознак апоптозу. Показано, що за дії доксорубіцин-нанокомпозитних комплексів на основі фулеренів перші зміни у структурі ядерного хроматину клітин MCF-7 спостерігаються вже за дози 0,5 мкМ, тоді як доксорубіцин за аналогічної концентрації не виявляв подібного ефекту. Вища доза доксорубіцину (1 мкМ) призводила до появи типових ознак апоптозу (округлення клітини, поява випинань мембрани, гіперконденсація хроматину). Однак за дії фулерен-доксорубіцинових комплексів у аналогічній концентрації цей ефект був значно більш виражений (рис. 6). Таким чином, поєднання доксорубіцину з фулереном не лише призводить до більш ефективної дії на клітини-мішені порівняно з дією нативного доксорубіцину, але й супроводжується потужнішою активацією апоптозу.

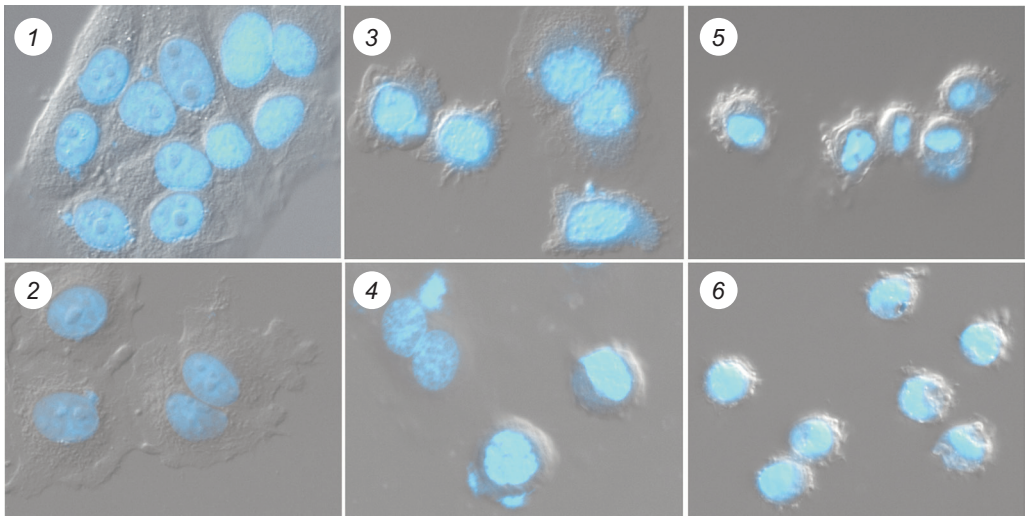

Рис. 6. Цитоморфологічне дослідження ультраструктури хроматину клітин аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 за дії фулерен-доксорубіцинових комплексів і нативного доксорубіцину (24 год, фарбування DAPI): *1* – контроль; *2* – фулерени; *3* – доксорубіцин, 0,5 мкМ; *4* – доксорубіцин+C_{60}, 0,5 мкМ; *5* – доксорубіцин, 1 мкМ; *6* – доксорубіцин + C_{60}, 1 мкМ

Fig. 6. Cytomorphological study of chromatin ultrastructure of human breast adenocarcinoma cells of MCF-7 line under the action of C_{60}-doxorubicin complexes and native doxorubicin (24 h, DAPI staining): *1* – control; *2* – fullerenes; *3* – doxorubicin, 0.5 μM; *4* – doxorubicin + C_{60}, 0.5 μM; *5* – doxorubicin, 1 μM; *6* – doxorubicin + C_{60}, 1 μM

Незважаючи на те, що основною молекулярною мішенню доксорубіцину є ДНК-топоізомераза II, нещодавно показано, що АФК, а саме супероксид-радикали, відіграють важливу роль в індукції апоптозу за дії цього чинника [15]. Оскільки з літератури відомо, що фулерени також індукують генерацію АФК [6], наступним етапом цієї роботи було проаналізувати, чи здатні фулерени C_{60} підсилювати продукцію АФК (а саме пероксиду водню та супероксид-радикалів) доксорубіцином.

Як видно з рис. 7, вже на 1-шу годину після дії фулеренів у дозі 1 мкМ спостерігається трикратне зростання продукції супероксид-радикалів у клітинах карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116. Доксорубіцин діє значно слабше, призводячи лише до 2-кратного зростання продукції АФК незалежно від дози (0,5 та 1 мкМ). У той же час кон'югат доксорубіцину з фулеренами призводив до майже п'ятикратного зростання рівня супероксид-радикалів у клітинах-мішенях за дози 0,5 мкМ, а у ще вищій концентрації цього нанокомпозиту (1 мкМ) нами виявлено початкові ознаки апоптозу злоякісних клітин, тоді як нативний докосорубіцин не призводив до таких змін. На пізніших часових точках (3 год) рівень АФК за дії нативного доксорубіцину зростає ще більше порівняно з 1-ю год – у 2 і 5 разів (за концентрації 0,5 мкМ і 1 мкМ, відповідно). Це ж стосується і нативних фулеренів (збільшення продукції АФК у 5 разів) (рис. 8, 10). Однак за дії фулерен-нанокомпозитних комплексів цей показник зростає ще більше – у 8 і 10 разів, відповідно, залежно від дози (0,5 і 1 мкМ). У той же час, вже на 6-ту годину інкубації рівень супероксид-радикалів за дії як фулеренів, так і доксорубіцину знову спадає до базального рівня (рис. 9, 10). Це свідчить про значне пришвидшення індукції клітинної смерті фулерен-доксорубіциновими комплексами, що може опосередковуватися АФК, а саме супероксид-радикалами.

Для того, щоб виключити потенційний вплив інших вільних радикалів у реалізації цитотоксичної дії фулерен-доксорубіцинових комплексів, нами було досліджено вплив цих сполук на продукцію пероксиду водню за допомогою проточної цитометрії у клітинах Т-лейкемії людини лінії Jurkat. Виявлено, що фулерени C_{60} призводять до несуттєвого зростання (на 20%) продукції пероксиду водню вже на 1-шу годину після додавання до клітин, однак ні доксорубіцин, ні фулерен-доксорубіцинові комплекси такої дії не виявляли (рис. 11, 12). Аналогічний ефект спостерігався як на 3-тю, так і на 6-ту години дії цих нанокомпозитів. Отже, іммобілізація доксорубіцину на фулеренах може суттєво змінювати фізико-хімічні властивості цих молекул, оскільки нанокомпозити доксорубіцину з фулеренами не індукують продукції пероксиду водню, на відміну від нативних фулеренів.

Виходячи з отриманих даних, можна припустити, що саме підсилення продукції супероксид-радикалів доксорубіцином завдяки його іммобілізації на фулеренах є основною причиною посилення його терапевтичного ефекту на різні лінії злоякісних клітин. Це ж явище також може пояснювати і більш ефективне долання резистентності злоякісних клітин до хіміотерапії за дії доксорубіцин-нанокомпозитних комплексів порівняно з нативним доксорубіцином, що також було виявлено нами (рис. 5).

На рис. 13 схематично показано можливі молекулярні механізми дії досліджуваних нанокомпозитів доксорубіцину з фулереном C_{60}.

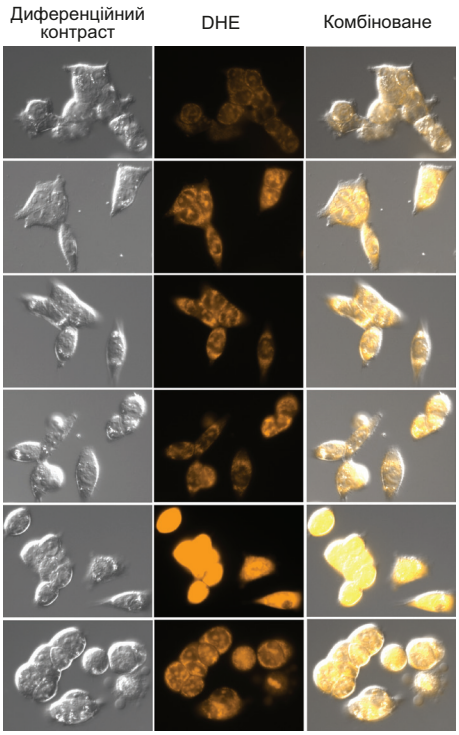

Рис. 7. Дослідження впливу фулерен-доксорубіцинових комплексів і нативного доксорубіцину на продукцію супероксид-радикалів (O_2^-) у клітинах лінії НСТ-116 карциноми прямої кишки людини (забарвлення DHE, флуоресцентна мікроскопія, 1 год)

Fig. 7. Study of influence of C_{60}-doxorubicin complexes and native doxorubicin on production of superoxide radicals (O_2^-) in human colorectal carcinoma cells of HCT-116 line (DHE staining, fluorescence microscopy, 1 h)

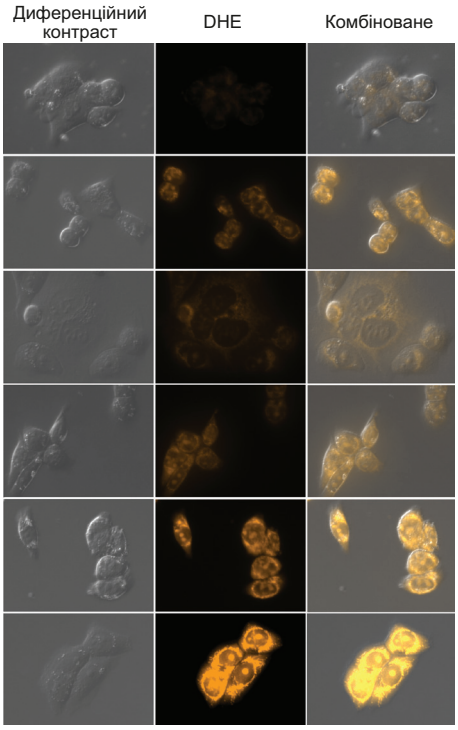

Рис. 8. Дослідження впливу фулерен-доксорубіцинових комплексів і нативного доксорубіцину на продукцію супероксид-радикалів (O_2^-) у клітинах лінії НСТ-116 карциноми прямої кишки людини (забарвлення DHE, флуоресцентна мікроскопія, 3 год)

Fig. 8. Study of influence of C_{60}-doxorubicin complexes and native doxorubicin on production of superoxide radicals (O_2^-) in human colorectal carcinoma cells of HCT-116 line (DHE staining, fluorescence microscopy, 3 h)

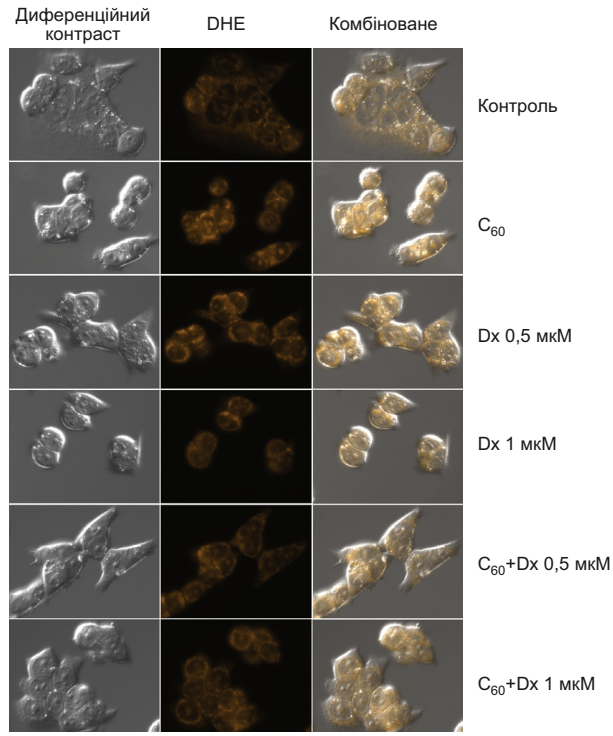

Рис. 9. Дослідження впливу фулерен-доксорубіцинових комплексів і нативного доксорубіцину на продукцію супероксид-радикалів (O_2^-) у клітинах лінії HCT-116 карциноми прямої кишки людини (забарвлення DHE, флуоресцентна мікроскопія, 6 год)

Fig. 9. Study of influence of C_{60}-doxorubicin complexes and native doxorubicin on production of superoxide radicals (O_2^-) in human colorectal carcinoma cells of HCT-116 line (DHE staining, fluorescence microscopy, 6 h)

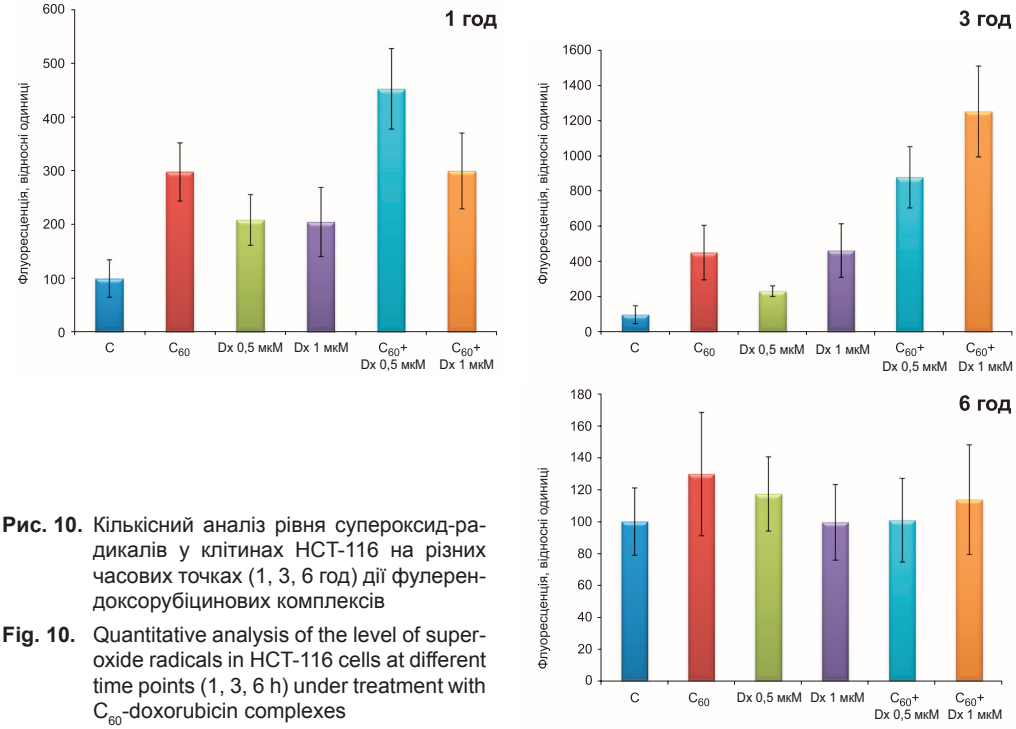

Рис. 10. Кількісний аналіз рівня супероксид-радикалів у клітинах HCT-116 на різних часових точках (1, 3, 6 год) дії фулерен-доксорубіцинових комплексів

Fig. 10. Quantitative analysis of the level of superoxide radicals in HCT-116 cells at different time points (1, 3, 6 h) under treatment with C_{60}-doxorubicin complexes

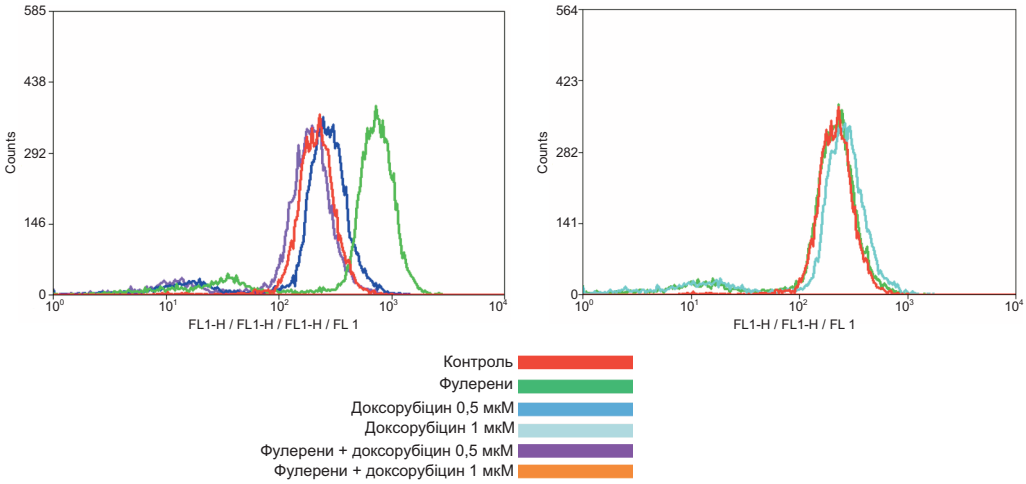

Рис. 11. Дослідження впливу фулерен-доксорубіцинових комплексів і нативного доксорубіцину на продукцію пероксиду водню (H_2O_2) у клітинах лінії Jurkat Т-лейкемії людини, 1 год (забарвлення DCFDA, проточна цитофлуориметрія)

Fig. 11. Study of influence of C_{60}-doxorubicin complexes and native doxorubicin on production of hydrogen peroxide radicals (H_2O_2) in human T-leukemia Jurkat cells, 1 h (DCFDA staining, flow cytometry)

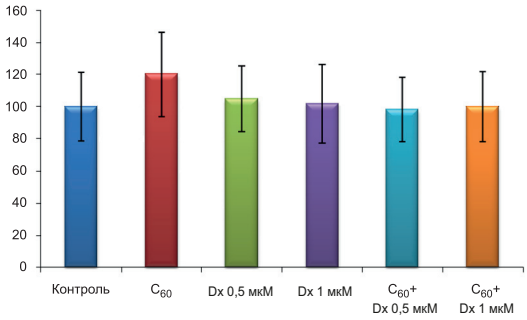

Рис. 12. Кількісний аналіз рівня пероксиду водню у клітинах Jurkat за дії фулерен-доксорубіцинових комплексів

Fig. 12. Quantitative analysis of level of hydrogen peroxide in human Jurkat T-leukemia cells under treatment with C_{60}-doxorubicin complexes

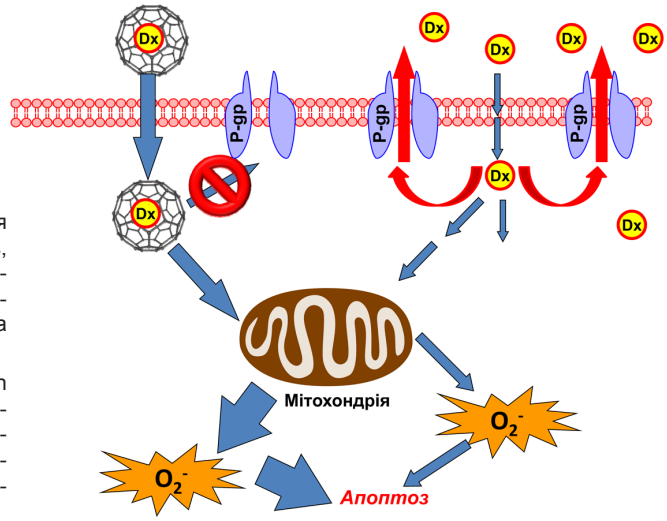

Рис. 13. Схематичне зображення молекулярних механізмів, які задіяні у протипухлинній дії фулерен-доксорубіцинових комплексів на злоякісні клітини

Fig. 13. Schematic representation of the molecular mechanisms involved in the antitumor action of C_{60}-doxorubicin complexes towards tumor cells

ВИСНОВКИ

Іммобілізація доксорубіцину на фулерені C_{60} дає змогу у 2–3 рази посилити протипухлинний ефект цього препарату в експериментах *in vitro* на різних лініях злоякісних клітин, а також у 2–4 рази посилити його токсичну дію на пухлинні клітини, резистентні до хіміотерапії. Протипухлинний ефект супроводжується більш інтенсивною індукцією апоптозу за дії фулерен C_{60}-доксорубіцинового комплексу порівняно з дією нативного доксорубіцину. Він також супроводжується продукцією клітинами-мішенями супероксид-радикалів, рівень яких значно зростає вже на 1-шу годину дії цього комплексу, досягаючи максимального значення через 3 години. Разом з тим, не виявлено змін у продукції пероксиду водню за дії фулерен C_{60}-доксорубіцинового комплексу, що свідчить про головну роль супероксид-радикалів у реалізації протипухлинного ефекту нанокомпозитів на основі доксорубіцину і фулерену C_{60}.

ПОДЯКИ

Робота була підтримана грантами, наданими к.б.н. Ростиславу Панчуку Державним Фондом Фундаментальних Досліджень у 2012 році (у рамках Гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених (№Ф36-408/2012) і Державним Агентством з питань науки, інновацій та інформатизації України (у рамках українсько-австрійського білатерального проекту №М/246-2012).

1. *Матишевська О.П., Прилуцька С.В., Гринюк І.І.* Фулерени C_{60} – біологічно активні молекули. І. Фізико-хімічні властивості та біодоступність. **Біотехнологія**, 2010; 3: 18–26.
2. *Прилуцька С.В., Кічмаренко Ю.М., Богуцька К.І.* та ін. Фулерен C_{60} та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи. **Біотехнологія**, 2012; 5(3): 9–17; Chenetal, 2012
3. *Туров В.В., Угнивенко А.П., Барвинченко В.Н.* и др. Строение гидратного слоя поверхности композитных систем SiO_2/ДНК(Dox) и SiO_2/ДНК(Dox)/фуллерен C_{60}. **Хімія, фізика та технологія поверхні**, 2011; 2(2): 190–200.
4. *Arbogast J.W., Darmanyan A.P., Foote C.S.* et al. Photophysical properties of C_{60}. **J. Phys. Chem**, 1991; 95: 11–2.
5. *Balch A.L., Olmstead M.M.* Structural chemistry of supramolecular assemblies that place flat molecular surfaces around the curved exteriors of fullerenes. **Coord. Chem. Rev**, 1999; 185–186: 601–617.
6. *Bogdanović G., Kojić V., Dordević A.* et al. Modulating activity of fullerol C_{60}(OH)22 on doxorubicin-induced cytotoxicity. **Toxicol. In Vitro**, 2004;18(5): 629–37.
7. *Boyd P.D.W., Reed C.A.* Fullerene-porphyrin constructs. **Acc. Chem. Res**, 2005; 38: 235–242.
8. *Burlaka A.P., Sidorik E.P., Prylutska S.V.* et al. Catalytic system of the reactive oxygen species on the C_{60} fullerene basis. **Exp. Oncol**, 2004; 26(4); 326–327.
9. *Chaudhuri P., Paraskar A., Soni S.* et al. Fullerenol-cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy. **ACS Nano**, 2009; Sep 22; 3(9): 2505–14. doi: 10.1021/nn900318y.
10. *Chen Z., Ma L., Liu Y.* et al. Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics. **Theranostics**, 2012; 2(3): 238–250.
11. *Davydenko M.O., Radchenko E.O., Yashchuk V.M.* et al. Sensibilization of fullerene C_{60} immobilized at silica nanoparticles for cancer photodynamic therapy. **J. Mol. Liq**, 2006; 127(1–3): 145–147.
12. *Evstigneev M.P., Buchelnikov A.S., Voronin D.P.* et al. Complexation of C_{60} fullerene with aromatic drugs. **Chem. Phys. Chem**, 2013: 4(3): 568–578.

13. *Heister E., Neves V., Tilmaciu C.* et al. Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. **Carbon**, 2009; 47(9): 2152–2160.
14. *Injac R., Perse M., Cerne M.* et al. Protective effects of fullerenol C_{60}(OH)24 against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. **Biomaterials**, 2009 Feb; 30(6): 1184–96. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.060. Epub 2008 Dec 1.
15. *Kroto H.W, Heath J.R, O'Brien S.C.* et al C_{60}-Buckminster fullerene. **Nature**, 1985; 318:162–3.
16. *Ling V.* Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. **Cancer Chemother. Pharmacol**, 1997; 40(7): 3–8.
17. *Mikawa M., Kato H., Okumura M.* et al. Paramagnetic Water-Soluble Metallofullerenes Having the Highest Relaxivity for MRI Contrast Agents. **Bioconjugate Chem**, 2001, 12, 510–514.
18. *Minotti G., Menna P., Salvatorelli E.* et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev**, 2004 Jun; 56(2): 185–229.
19. *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 Jun; 8(3): 522–7.
20. *Prylutska S.V., Burlaka A.P., Klymenko P.P.* et al. Using water-soluble C_{60} fullerenes in anticancer therapy. **Cancer Nanotechnol**, 2011; 2(1): 105–110.
21. *Prylutska S.V., Burlaka A.P., Matyshevska O.P.* et al. Effect of the visible light irradiation of fullerene-containing composites on the ROS generation and the viability of tumor cells. **Exp. Oncol**, 2006; 28(2): 160–162.
22. *Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutskyy Yu.I.* et al. Comparative study of antitumor effect of pristine C_{60} fullerenes and doxorubicin. **Біотехнологія**, 2011; 4(6): 82–87.
23. *Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutskyy Yu.I.* et al. Pristine C_{60} fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. **Exp. Oncol**, 2011; 33(3): 162–164.
24. *Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L.* et al. Structure of C_{60} fullerene in water: spectroscopic data. **Carbon**, 2004; 42(5–6): 1203–1206.
25. *Young R.C.* In: **Drug resistance in cancer therapy**. Kluwer, Dordrecht; 1989, 1–26.
26. *Zakharian T.Y., Seryshev A., Sitharaman B.* et al. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture. **J. Am. Chem. Soc**, 2005 Sep 14; 127(36): 12508–9.

SYNERGETIC ANTINEOPLASTIC ACTION OF DOXORUBICIN AND FULLERENE C_{60} AS MEANS OF ITS DELIVERY TOWARDS HUMAN CANCER CELLS *IN VITRO*: CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS

R. R. Panchuk[1], ***V. V. Chumak***[2], ***N. R. Skorokhyd***[1], ***L. V. Lehka***[1], ***S. V. Prylutska***[3], ***W. Berger***[4], ***P. Heffeter***[4], ***R. S. Stoika***[1,2], ***Yu. I. Prylutsky***[3]

[1]*Institute of Cell Biology of NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

[2]*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine*

[3]*Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrska St., Kyiv 01033, Ukraine*

[4]*Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, 8a, Borshkegasse St., Vienna 1090, Austria*
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Development of new pharmaceutical formulations based on using specific nanoscale carriers for improved drug delivery to target cells is one of crucial tasks of current

pharmaceutics. Usage of such nanocomposites does not only extend the duration of action of drugs in the organism of patients, but also increases their bioavailability and, most importantly, reduces side effects of chemotherapy. We used nanocomplex based on fullerene C_{60} and well-known anticancer drug doxorubicin (Dx). It was found that immobilization of doxorubicin on fullerene C_{60} leads to 2–3 fold increase of the antineoplastic action of this drug *in vitro* towards various tumor cell lines compared with the effect of free doxorubicin. Cytomorphological studies have shown that the death of these tumor cells treated with this nanocomplex, occurs by apoptosis. Apoptosis induction by the action of C_{60}-Dx complex is accompanied by the generation of superoxide radicals whose level increases significantly as soon as at the 1st hour after addition of this complex and reaches a maximum value in 3 hours. The obtained results suggest a prospectivity of application of fullerene-C_{60}-doxorubicin complex in chemotherapy of malignant tumors.

Keywords: fullerene C_{60}, doxorubicin, nanocomplex, reative oxygen species, apoptosis, cancer drug resistance.

СИНЕРГИЧЕСКОЕ АНТИНЕОПЛАСТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА ДОКСОРУБИЦИНА И ФУЛЛЕРЕНА C_{60} КАК СРЕДСТВА ЕГО ДОСТАВКИ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ КЛЕТКАМ ЧЕЛОВЕКА В ОПЫТАХ *IN VITRO*: КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Р. Р. Панчук[1], ***В. В. Чумак***[2], ***Н. Р. Скорохид***[1], ***Л. В. Легкая***[1], ***С. В. Прилуцкая***[3], ***П. Хеффетер***[4], ***В. Бергер***[4], ***Р. С. Стойка***[1, 2], ***Ю. И. Прилуцкий***[3]

[1]*Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова 14–16, Львов 79005, Украина*

[2]*Львовский национальный университет имени Ивана Франко ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

[3]*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко ул. Владимирская, 2, Киев 01033, Украина*

[4]*Институт раковых исследований, Медицинский Университет Вены ул. Боршкегассе, 8а, Вена 1090, Австрия*

e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Актуальной задачей современной фармацевтики является разработка новых лекарственных форм, основанных на использовании специальных наноразмерных носителей для повышения адресности доставки лекарств к клеткам-мишеням. Применение таких нанокомпозитов позволяет не только продлить действие лекарств в организме, но и увеличить их биодоступность и, что немаловажно, снизить побочные эффекты от химиотерапии у пациентов. Нами использованы нанокомплекс на основе фуллерена C_{60} и известного противоопухолевого препарата доксорубицина. Установлено, что иммобилизация доксорубицина на фуллерен C_{60} позволяет в 2–3 раза усилить антинеопластическое действие этого лекарственного препарата *in vitro* в отношении различных линий злокачественных клеток по сравнению с действием свободного доксорубицина. Цитоморфологическими исследованиями показано, что гибель злокачественных

клеток-мишеней, на которые действовали вышеупомянутым нанокомплексом, происходит путем апоптоза. Индукция апоптоза при действии этого нанокомплекса сопровождается генерацией супероксидных радикалов, уровень которых значительно возрастает уже на 1-й час действия этого комплекса и достигает максимального значения через 3 часа. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения фуллерен C_{60}-доксорубицинового комплекса в химиотерапии злокачественных опухолей.

Ключевые слова: фуллерены C_{60}, доксорубицин, нанокомплекс, активные формы кислорода, апоптоз, резистентность опухолей к лекарствам.

Одержано: 07.11.2012