

Производные фуллера как модуляторы процессов клеточной пролиферации и апоптоза

М.А. Орлова¹, Т.П. Трофимова¹, А.П. Орлов², О.А. Шаталов³,
А.А. Свистунов³, Ю.К. Наполов³, В.П. Чехонин²

¹Химический факультет, кафедра радиохимии ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

²медико-биологический факультет, кафедра медицинских нанобиотехнологий
ГБОУ ВПО «Российский научно-исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³фармацевтический факультет, кафедра фармакологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Контакты: Марина Алексеевна Орлова orlova.radiochem@mail.ru

Fullerene derivatives as modulators for the cell proliferation and apoptosis processes

M.A. Orlova¹, T.P. Trofimova¹, A.P. Orlov², O.A. Shatalov³, A.A. Svistunov³, Yu.K. Napolov³, V.P. Chekhonin²

¹M.V. Lomonosov Moscow State University;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow;

³I.M. Sechenov Moscow State Medical University

Нанотехнологии, т. е. технологии создания и использования наноразмерных (~ 1–100 нанометров (10⁻⁹ метра) (нм)) объектов, при которых для достижения практического результата размер имеет принципиальное, даже критическое значение, открывают новые возможности, занимая особую нишу в различных областях науки и промышленности [1], закономерно проникая в область фармации и медицины. Особое место среди таких продуктов занимает сравнительно недавно (1985) открытый класс фуллеренов. Фуллерен — это одна из аллотропных* форм углерода (другие — алмаз, карбин и графит), представляет собой выпуклые замкнутые многогранники, составленные из четного числа трехкоординированных атомов углерода. Своим названием фуллерены обязаны инженеру и дизайнеру Ричарду Бакминстеру Фуллеру, в чьих конструкциях используется такая форма. Первоначально данный класс соединений был ограничен лишь структурами, включающими только пяти- и шестиугольные грани. Самый симметричный и наиболее полно изученный представитель класса фул-

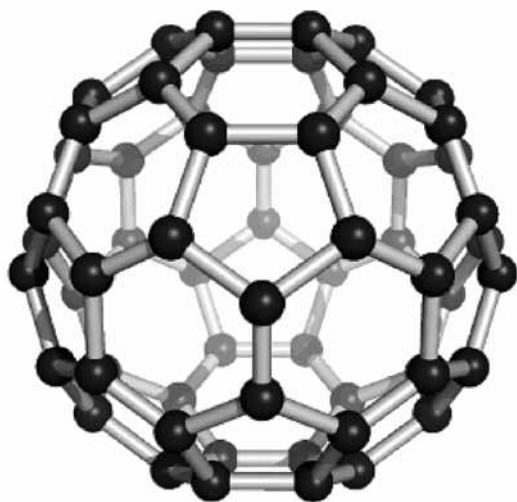
ленов — фуллерен (C₆₀), в котором углеродные атомы образуют усеченный икосаэдр, состоящий из 20 шестиугольников и 12 пятиугольников и напоминающий футбольный мяч размером 1,6–1,8 нм (рисунок).

Следующим по распространенности является фуллерен C₇₀, отличающийся от фуллерена C₆₀ вставкой пояса из 10 атомов углерода в экваториальную область C₆₀, в результате чего молекула C₇₀ оказывается вытянутой и напоминает своей формой мяч для игры в регби.

Так называемые высшие фуллерены, содержащие большее число атомов углерода (до 400), встречаются реже и часто имеют довольно сложный изомерный состав. Среди наиболее изученных высших фуллеренов можно выделить C_n, где n = 74, 76, 78, 80, 82 или 84. Если в состав молекулы фуллерена помимо атомов углерода входят атомы других химических элементов, то, если они расположены внутри углеродного каркаса, такие фуллерены называются эндоэдральными, если снаружи — экзоэдральными.

Наночастицы размером менее 100 нм (1–50 нм) имеют совершенно уникальные физико-химические

***Аллотропия** (от др.-греч. *αλλος* — «другой», *τροπος* — «поворот, свойство») — существование одного и того же химического элемента в виде 2 и более простых веществ, различных по строению и свойствам, — так называемых аллотропических (аллотропных) модификаций или форм. Явление аллотропии обусловлено либо различным составом молекул простого вещества (аллотропия состава), либо способом размещения атомов или молекул в кристаллической решетке (аллотропия формы). Углерод имеет множество модификаций: алмаз, графит, фуллерен, карбин, графен, углеродные нанотрубки, лонсдейлит и др. Точное число модификаций указать затруднительно вследствие разнообразия форм связывания атомов углерода между собой. Наиболее многочисленны молекулярные структуры фуллеренов и нанотрубок.



Структура фуллерена C_{60}

параметры, механизмы и точки биомедицинского приложения. Это связано с нахождением большинства атомов на межфазной, внешней поверхности частиц, что обуславливает особые квантово-механические закономерности их действия. Фуллерены, в отличие от других углеродных наночастиц и материалов, могут вступать в реакции присоединения по двойным связям (с получением экзопроизводных), внедрения атомов и кластеров внутрь углеродной сферы (эндопроизводные) и способны к образованию гетерофуллеренов (металлофуллеренов) и супрамолекул. Они обладают целым спектром разнообразных свойств, влияющих на человеческий организм. Многие представители обширного семейства водорастворимых производных фуллеренов и созданных на их основе наночастиц привлекают внимание как средства адресной доставки лекарств, противовирусные и противоопухолевые агенты. Сегодня получено огромное количество таких производных фуллерена C_{60} . Однако для внедрения фуллереновых производных в медицинскую практику необходимо понимание причин и механизмов прямых и отдаленных последствий их эффектов *in vivo*, основанных на внедрении в регуляцию процессов пролиферации, апоптоза и некроза клеток. Большое влияние на последующие свойства фуллереновых наночастиц имеет способ их получения и функционализации, а также морфология — их размеры, форма, рельеф поверхности, аффинность к клеточным структурам, т. е. параметры, в зависимости от которых биологические эффекты наночастиц могут меняться от цитопротекторного до цитотоксического. Основным эффекторным воздействием фуллеренов долгое время считалась индукция образования активных форм кислорода, однако в последние годы показано, что в зависимости от размеров фуллерены могут внедряться в органеллы клеток, встраиваться в структуры молекул белков и ДНК, изменяя их конформационную лабильность и оказывая воздействие на их функ-

ционирование, что ведет к изменениям параметров метаболизма и клеточного цикла. Так, фуллерен (C_{60}) и его водорастворимые производные, полученные присоединением разнообразных функциональных групп к сетке фуллерена, в различных условиях могут выступать как цитопротекторы, так и как цитотоксические агенты [2]. В частности, ряд гидроксированных производных C_{60} и C_{60} -малонаты ведут себя как поглотители (акцепторы, губки) радикалов и защищают клетки от повреждений, опосредованных оксидативным стрессом [2–7]. Однако при более высоких концентрациях, а также под действием излучения в ультрафиолетовом спектре они же способны приводить к клеточной смерти через активные формы кислорода (АФК) — АФК-зависимые и АФК-независимые механизмы [7–10].

Для некоторых производных фуллерена описано цитотоксическое влияние на определенные (в частности, раковые) клетки [11]. Это может быть целенаправленно использовано в терапии опухолей без заметного повреждения здоровой ткани [12]. Все производные фуллерена, несущие S-триазиновый фрагмент, в разной степени ингибировали рост бактерий [13].

Коллоидные растворы C_{60} при взаимодействии с водой способны образовывать агрегаты различного размера и, соответственно, различной токсичности. Поэтому наряду с повышением привлекательности фуллеренов для использования в медицинских целях существует также некоторая неопределенность относительно их токсичности и отдаленных последствий их применения. Функционализация (сужение и усиление направленности конкретной функции за счет прикрепления соответствующих молекул) C_{60} при уменьшении видимой токсичности может существенно влиять на характер взаимодействия фуллеренов с биологическими системами [14], что повышает неопределенность последствий, а иногда даже создает эффект «троянского коня». Поэтому очень важно правильно оценить риски и последствия развития фуллерен-нанотехнологий.

Споры о токсичности наночастиц C_{60} и гидроксированных фуллеренов подробно описаны в ряде источников [15]. В последнее время особый интерес лежит в области доставки функциональной лекарственной составляющей в отдельные органы и ткани организма (drug delivery). Производные фуллеренов, особенно порфириновые и супрамолекулярные, способны выполнять функции как транспортера, так и самого лекарства. Последнее обусловлено тем, что фуллерены обладают собственным влиянием на оксидативный стресс, пролиферацию, апоптоз, экспрессию генов и другие функции клеток и систем организма.

В 2005 г. издан ряд монографий, подробно описывающих органическую химию фуллеренов [16, 17] и результаты их применения в биомедицинских исследованиях [18]. Написано и немало обзоров по изуче-

нию синтеза новых соединений этого класса [19–24] и их возможного медицинского применения [25–31]. Рассмотрено антимикробное действие фуллеренов и их производных [32]. Особое значение для медицины имеют водорастворимые фуллерены, среди которых значительное место занимают их порфириновые производные [33, 34] и фуллеролы (гидроксифуллерены, фуллеренолы) [35]. В силу того, что основное направление исследований по фуллеренам связано с синтезом новых конструкций, информация о биохимических результатах во многих случаях носит хаотичный характер.

Вопрос о том, являются ли фуллерены полезными с точки зрения практической медицины или они представляют собой еще один фактор риска, активно дискутируется в научной литературе и пока не имеет однозначного ответа. Нельзя не учитывать экологическую и техногенную составляющую воздействия фуллеренов, поскольку эти соединения появляются в окружающей среде из природных и антропогенных источников, таких как извержения вулканов, лесные пожары и сжигание углеродных материалов [36, 37].

Кроме того, в последнее время резко увеличилось производство и применение инженерных фуллеренов в различных отраслях промышленности. Все это повышает важность проблемы всесторонней оценки их токсичности для окружающей среды и здоровья человека.

Мы представляем цикл лекций, где попытались сконцентрировать внимание на основных аспектах воздействия фуллеренов на живые организмы, в том числе связанных с апоптозом и пролиферацией нормальных и опухолевых клеток, которые особенно важны для диагностики и терапии злокачественных опухолей и нейродегенеративных заболеваний. Мы также рассмотрим тенденции интенсивно развивающихся направлений использования фуллереновых наночастиц для адресной доставки лекарств. Цикл лекций состоит из 4 частей, посвященных: 1) оксидативному стрессу; 2) влиянию на сигнальные пути апоптоза; 3) противоопухолевой активности; 4) возможности использования фуллеренов для адресной доставки лекарств и 5) применению в фотодинамической и радиотерапии опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Duncan R., Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharmaceutics* 2011;8:2101–41.
2. Harhaji L., Isakovic A., Raicevic N. et al. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol* 2007;568:89–98.
3. Dugan L.L., Turetsky D.M., Du C. et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1997;94:9434–9.
4. Monti D., Moretti L., Salvioli S. et al. C₆₀ carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:711–7.
5. Dugan L.L., Gabrielsen J.K., Yu S.P. et al. Buckminsterfullerene free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* 1996;3:129–35.
6. Isakovic A., Markovic Z., Nikolic N. et al. Inactivation of nanocrystalline C₆₀ cytotoxicity by γ -irradiation. *Biomaterials* 2006;27:5049–58.
7. Isakovic A., Markovic Z., Todorovic-Markovic B. et al. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicol Sci* 2006;91:173–83.
8. Yamawaki H., Iwai N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1495–C1502.
9. Yang X.L., Fan C.H., Zhu H.S. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C₆₀] fullerene derivatives and its mechanism. *Toxicol in Vitro* 2002;16:41–6.
10. Rancan F., Rosan S., Boehm F. et al. Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C₆₀ mono-adduct and a malonic acid C₆₀ tris-adduct on Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* 2002;67:157–62.
11. Bosi S., Feruglio L., Da Ros T. et al. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *J Med Chem* 2004;47:6711–5.
12. Chen C., Xing G., Wang J. et al. Multihydroxylated [Gd@C₈₂(OH)₂₂]n nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. *Nano Lett* 2005;5(10):2050–7.
13. Darwish A.D. Fullerenes. *Annu Rep Prog Chem A* 2010;106:356–75.
14. Gao J., Wang H.L., Shreve A., Iyer R. Fullerene derivatives induce premature senescence: A new toxicity paradigm or novel biomedical applications. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;244:130–43.
15. Jung H., Wang C., Jang W. Nano-C₆₀ and hydroxylated C₆₀: Their impacts on the environment. *Toxicol Envir Health Sci* 2009;1:132–9.
16. Сидоров Л.Н., Юровская М.А., Боршевский А.Я. и др. Фуллерены. М.: Экзамен, 2005.
17. Hirsch A., Brettreich M. Fullerenes: chemistry and reactions. Weinheim, Wiley-VCH, 2005.
18. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. СПб.: Росток, 2006.
19. Трошин П.А., Любовская З.Н. Органическая химия фуллеренов: основные реакции, типы соединений фуллеренов и перспективы их практического применения. *Успехи химии* 2008;77:324–69.
20. Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S. et al. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *J Reprod Toxicol* 2010;30:343–52.
21. Markovic Z., Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* 2008;29:3561–73.
22. Grausova L., Vacik J., Vorlicek V. et al. Fullerene C₆₀ films of continuous and micropatterned morphology as substrates for adhesion and growth of bone cells. *Diamond Relat Mater* 2009;18:578–86.
23. Aschberger K., Johnston H.J., Stone V. et al. Review of fullerene toxicity and exposure — Appraisal of a human health risk assessment, based on open literature. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010;58:455–73.
24. Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Biological applications of fullerene derivatives: a brief overview. *Croat Chem Acta* 2001;74:743–55.
25. Da Ros T. Twenty Years of Promises: Fullerene in Medicinal Chemistry. In.: *Medicinal Chemistry and Pharmacological*

- Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes. Series: Carbon Materials: Chemistry and Physics, Vol. 1, 2008. Pp. 1–21.
26. Bakry R., Vallant R.M., Najam-ul-Haq M. et al. Medicinal applications of fullerenes. *Int J Nanomed* 2007;4:639–49.
27. Satoh M., Takayanagi I. Pharmacological Studies on Fullerene (C₆₀), a Novel Carbon Allotrope, and Its Derivatives. *J Pharmacol Sci* 2006;100:513–8.
28. Chawla P., Chawla V., Maheshwari R., Saraf A. Fullerenes: from carbon to nanomedicine. *Mini Reviews in Med Chem* 2010;10:662–77.
29. Partha R., Conyers J.L. Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int J Nanomed* 2009;4:261–75.
30. Yan L., Zhao F., Li S. et al. Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale* 2011;3:362–82.
31. Parveen S., Misra R., Sahoo S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine* 2012;8(2):147–66.
32. Huh A.J., Kwon Y.J. «Nanoantibiotics»: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release* 2011;7:128–45.
33. Койфман О.И., Мамардашвили Н.Ж., Антипин И.С. Синтетические рецепторы на основе порфиринов и их конъюгатов с калекс[4]аренами. М.: Наука, 2006.
34. Satake A., Kobuke Y. Dynamic supramolecular porphyrin system. *Tetrahedron* 2005;61:13–41.
35. Tykhomyrov A.A., Nedzvetsky V.S., Klochkov V.K., Andrievsky G.V. Nanostructures of hydrated C₆₀ fullerene (C₆₀HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals. *Toxicology* 2008;246:158–65.
36. Buseck P.R. Geological fullerenes: review and analysis. *Earth Planet Sci Lett* 2002;203:781–92.
37. Shinohara N., Gamo M., Nakanishi J. Fullerene C₆₀: inhalation hazard assessment and derivation of a period-limited acceptable exposure level. *Toxicol Sci* 2011;123:576–89.