

Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПРИЛУЦЬКА СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 615.277.3+615.012]-022.532-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ПОСИЛЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ
АКТИВНОСТІ ЦИСПЛАТИНУ ЗА ВИКОРИСТАННЯ С₆₀ ФУЛЕРЕНУ**

Спеціальність 03.00.20 – Біотехнологія
Галузь знань 091 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Прилуцька С.В.

Науковий консультант:
Матишевська Ольга Павлівна,
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Прилуцька С.В. Розробка технології посилення протипухлинної активності цисплатину за використання C_{60} фулерену. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України. Київ, 2020.

Цілеспрямований синтез наночастинок, здатних впливати на біологічні процеси, стимулював їх широке використання у біотехнологіях. Досліджено значну кількість наночастинок різної природи, зокрема, для поліпшення протипухлинної терапії та таргентної доставки лікарських препаратів.

Серед таких наночастинок особливу увагу привертає представник карбонових наноструктур C_{60} фулерен. Нанорозмірність (0,72 нм), сферичність, гідрофобність, біосумісність та біодоступність молекул C_{60} забезпечують їх взаємодію з біологічними молекулами, вбудовування у ліпідний бішар мембрани та проникнення всередину клітин. Унікальною є будова поверхні молекули C_{60} з системою π -кон'югованих подвійних зв'язків, що зумовлює здатність вловлювати вільні радикали та виявляти антиоксидантні властивості, а за умови фотозбудження після опромінення в УФ-Вид діапазоні продукувати токсичні АФК, що відкриває перспективи використання C_{60} фулерену у фотодинамічній протипухлинній терапії. Крім того, наноструктура здатна утворювати комплекси з хіміопрепаратами, що може бути використано для оптимізації їх дії. Тому актуальним є пошук шляхів посилення ефективності протипухлинних препаратів за їх використання у комбінації з фотоактивованим C_{60} фулереном, або у складі нековалентного комплексу з C_{60} фулереном.

Дисертацію присвячено розробці технологій застосування C_{60} фулерену для підвищення ефективності протипухлинної дії цисплатину *in vitro* та *in vivo* та з'ясуванню механізмів цитотоксичної дії цисплатину у комбінації із фотозбудженим C_{60} фулереном та у складі нековалентного наноконкомплексу з C_{60} фулереном. У роботі використано стабільний водний колоїдний розчин C_{60}

фулерену (0,15 мг/мл, 2×10^{-4} М), нормальні клітини (timoцити та еритроцити щура), клітини лейкемії ліній L1210 і CCRF-CEM, клітини карциноми легені LLC, модель трансплантованої карциноми легені Льюїс.

Встановлено, що 10 мкМ C_{60} фулерен запобігав продукуванню АФК тимоцитами, спричиненому як 100 мкМ пероксидом водню, так і 3,3 мкМ цисплатином, а також H_2O_2 -індукованому зниженню життєздатності тимоцитів та Cis-Pt -індукованому гемолізу еритроцитів.

З використанням флуоресцентно-міченого C_{60} фулерену (C_{60} -FITC) доведено його поглинання та довготривале утримання клітинами лейкемії L1210. Імуноцитохімічне фарбування з використанням FITC-мічених антитіл до молекул C_{60} продемонструвало накопичення C_{60} фулеренів у мітохондріях клітин лейкемії CCRF-CEM.

Показано, що за умови фотозбудження (опромінення світлодіодною лампою інтенсивністю 100 мВт/см², 410-700 нм) C_{60} фулерену, поглинутого чутливими та резистентними до цисплатину клітинами лейкемії L1210 спостерігається значна інтенсифікація продукування АФК, підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} , падіння мітохондрійного потенціалу та накопичення клітин у проапоптичній SubG1 фазі. Встановлено, що за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та Cis-Pt у низькій 3,3 мкМ концентрації токсичний ефект протипухлинного препарату у чутливих клітин лейкемії L1210 посилювався, а у резистентних до цисплатину клітинах L1210/Cis-Pt – відновлювався, про що свідчило зниження життєздатності клітин внаслідок індукції апоптозу.

Вперше створено та охарактеризовано нековалентний, стабільний у водному середовищі (дзета-потенціал -21,2 мВ) нанокomплекс C_{60} фулерену з Cis-Pt (C_{60} -Cis-Pt). Комплексоутворення між молекулами C_{60} та Cis-Pt підтверджено методами комп'ютерного моделювання, сканувальної тунельної мікроскопії та динамічного розсіювання світла.

Встановлено, що токсична дія C_{60} -Cis-Pt нанокomплексу на клітини LLC карциноми легені Льюїс була ефективнішою порівняно з окремою дією цисплатину за еквівалентної концентрації та призводила до пригнічення

міграційної активності клітин, їх накопичення у проапоптичній SubG1 фазі клітинного циклу, активації каспази 3/7 та збільшення кількості клітин, з ознаками раннього та пізнього апоптозу.

Вперше досліджено гостру токсичність немодифікованого C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконплексу за умови внутрішньочеревного введення мишам. Високе значення LD₅₀ для C₆₀ фулерену (721 мг/кг) підтверджує відсутність в організмі тварин токсичних ефектів за використання наноструктури у низьких дозах. Показано, що токсичність Cis-Pt (LD₅₀=15,6 мг/кг) за конплексоутворення із C₆₀ фулереном знижувалася вдвічі (LD₅₀=36,1 мг/кг).

C₆₀-Cis-Pt наноконплекс за дози 7,5 мг/кг (3,75 мг/кг C₆₀ фулерену та 3,75 мг/кг Cis-Pt) ефективніше пригнічував ріст перещепленої карциноми легені Льюїс та утворення метастазів у легенях миші порівняно з дією Cis-Pt за еквівалентної дози. Виявлені протипухлинний та антиметастатичний ефекти C₆₀-Cis-Pt наноконплексу супроводжувалися подовженням тривалості життя мишей-пухлиноносіїв, нормалізацією їх маси тіла та показників крові.

Запропоновані технології застосування C₆₀ фулерену як за комбінованої дії з цисплатином після фотоактивації наноструктури, так і за конплексоутворення із цисплатином дозволили знизити діючу дозу цитостатика та посилити його протипухлинні ефекти. Отримані результати свідчать про перспективність використання C₆₀ фулерену як фотосенсибілізатора у фотодинамічній протипухлинній терапії, а також як таргентного носія протипухлинних препаратів.

Ключові слова: C₆₀ фулерен, цисплатин, наноконплекс, тимоцити, еритроцити, клітини L1210 і LLC, резистентність до хіміопрепаратів, IC₅₀, LD₅₀, апоптоз, протипухлинні та антиметастатичні ефекти.

ANNOTATION

Prylutska S.V. Elaboration of technology to enhance cisplatin antitumor activity by using C₆₀ fullerene. Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for Doctor of Science degree on specialty 03.00.20 – biotechnology. – Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2020.

The targeted synthesis of nanoparticles with specific biological properties has stimulated their widespread usage in the biotechnologies. Considerable number of nanoparticles of various nature has been investigated, in particular, in terms of anticancer therapy enhancing and targeted drug delivery.

Among such nanoparticles, C₆₀ fullerene has attracted considerable attention due to its nanosize (0,72 nm), almost sphericity, hydrophobicity, biocompatibility and bioavailability. C₆₀ molecules can interact with biological molecules, incorporate into the lipid bilayer of the membrane and penetrate the cells. The structure of the C₆₀ molecule surface with π -conjugated double bonds is unique, that determines the ability to scavenge free radicals and exhibit antioxidant properties, as well as to generate toxic reactive oxygen species (ROS) after UV/Vis irradiation, that opens the perspectives of using C₆₀ fullerenes in photodynamic antitumor therapy. In addition, the carbon nanostructure can form complexes with chemotherapeutic agents which can be used to optimize their action. Therefore, it is important to find ways to enhance the efficiency of anticancer drugs when used in combination with photoactivated C₆₀ fullerene, or as part of a noncovalent nanocomplex with C₆₀ fullerene.

The dissertation is devoted to elaboration of the new biotechnological approaches to traditional antitumor drugs application in combination with C₆₀ fullerene. Stable aqueous colloidal solution of C₆₀ fullerene (0,15 mg/ml, 2×10^{-4} M), normal cells (Wistar rat thymocytes and erythrocytes), leukemia L1210 and CCRF-CEM cells, lung carcinoma LLC cells and transplanted model of Lewis lung carcinoma were used in the work.

It was found that 10 μM C_{60} fullerene prevented both ROS production in thymocytes caused by 100 μM H_2O_2 or 3,3 μM Cis-Pt, H_2O_2 -induced decrease of thymocytes viability and Cis-Pt-induced erythrocytes hemolysis.

With the use of fluorescent-labeled C_{60} fullerene (C_{60} -RITC) the accumulation of nanostructure in leukemic L1210 cells was shown. Immunocytochemical staining with the use of FITC-labeled antibodies to C_{60} fullerene demonstrated accumulation of C_{60} fullerenes in the mitochondria of CCRF-CEM leukemic cells.

Photoexcitation (irradiation with light-emitting diode lamp, 410-700 nm) of C_{60} fullerene accumulated by sensitive and resistant to cisplatin leukemic L1210 cells was accompanied by significant increase of ROS production, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, dissipation of mitochondrial membrane potential and cell accumulation in proapoptotic SubG1 phase. Combined action of photoexcited C_{60} fullerene and Cis-Pt in a low 3,3 μM concentration was followed by cisplatin toxic effect intensification in sensitive leukemic L1210 cells and by its restoration in cisplatin-resistant L1210/Cis-Pt cells. The observed effect was followed by the decrease of both sensitive and resistant leukemic cells viability due to the induction of apoptosis.

The noncovalent and stable in aqueous medium nanocomplex of C_{60} fullerene with Cis-Pt (C_{60} -Cis-Pt) was created and characterized for the first time. Complexation between the C_{60} and Cis-Pt molecules was confirmed by computer simulation, scanning tunneling microscopy and dynamic light scattering.

The toxic effect of C_{60} -Cis-Pt nanocomplex against Lewis lung carcinoma LLC cells was shown to be more effective compared to the effect of free cisplatin at equivalent concentration and was confirmed by cells accumulation in proapoptotic SubG1 phase, caspase 3/7 activation, increased content of cells at early and late stages of apoptosis, inhibition of cells migration activity.

The acute toxicity of pristine C_{60} fullerene and C_{60} -Cis-Pt nanocomplex was studied after intraperitoneal (i.p.) administration to mice. The high LD_{50} value for C_{60} fullerene (721 mg/kg) confirmed the absence of toxic effects at low dose of carbon nanostructure in the body of animals. The reduced toxicity of Cis-Pt (LD_{50} =15,6 mg/kg) at complexation with C_{60} fullerene (LD_{50} =36,1 mg/kg) at i.p. administration to mice was shown.

C₆₀-Cis-Pt nanocomplex at doses of 7,5 mg/kg (3,75 mg/kg of C₆₀ and 3,75 mg/kg of Cis-Pt) more effectively inhibited the growth of transplanted Lewis lung carcinoma and metastases formation in mice lung tissue compared to free Cis-Pt in equivalent dose. The observed antitumor and antimetastatic effects of the C₆₀-Cis-Pt nanocomplex were accompanied by prolongation of tumor-bearing mice's life, normalization of body weight and blood parameters.

The proposed technologies of C₆₀ fullerene application both in combination with cisplatin after nanostructure's photoexcitation and as a component of nanocomplex with cisplatin allowed to decrease the effective dose of cytostatic and to enhance its antitumor effect. The data obtained confirm the prospects of C₆₀ fullerene as a photosensitizer in photodynamic therapy and as a targeted nanocarrier of antitumor drugs.

Key words: C₆₀ fullerene, cisplatin, nanocomplex, thymocytes, erythrocytes, L1210 and LLC cells, drug resistance, IC₅₀, LD₅₀, apoptosis, antitumor and antimetastatic effects.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P., Prylutskiy Yu.I., Ritter U., Scharff P. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. Fuller. Nanotub. Car. Nanostruct. 2008; 16(5-6): 698–705.

2. Гарманчук Л.В., Перепелиціна О.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Матишевська О.П., Сидоренко М.В. Фулерени C₆₀ змінюють адгезивні властивості клітин раку молочної залози MCF-7. Доповіді НАНУ. 2009; 4: 164-167.

3. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Grebinyk S.M., Matyshevskaya O.P., Prylutskiy Yu.I., Siegmund C., Ritter U., Scharff P. Comparative study of biological action of fullerenes C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells. Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2009; 40(4): 238-241.

4. Матишевська О.П., **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І. Фулерени C₆₀ – біологічно активні молекули. I. Фізико-хімічні властивості та біодоступність. Біотехнологія. 2010; 3(1): 18-26.

5. Гринюк І.І., Перепелиціна О.М., **Прилуцька С.В.**, Гарманчук Л.В., Храновська Н.М., Матишевська О.П., Сидоренко М.В. Вплив фулеренів C₆₀ на виживаність клітин MCF-7 раку молочної залози за тривалої інкубації. Біотехнологія. 2010; 3(4): 75-79.

6. Schuetze C., Ritter U., Scharff P., Bychko A.V., **Prylutska S.**, Rybalchenko V.K., Prylutskiy Yu.I. Interaction of N-fluorescein-5-isothiocyanate pyrrolidine-C₆₀ compound with a model bimolecular lipid membrane. Mat. Sci. Eng. C. 2011; 31(5): 1148-1150.

7. **Prylutska S.V.**, Burlaka A.P., Yu.I. Prylutskiy, U. Ritter, P. Scharff. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. Exp. Oncol. 2011; 33(3): 162-164.

8. **Prylutska S.V.**, Burlaka A.P., Klymenko P.P., Grynyuk I.I., Prylutskiy Yu.I., Schuetze C., Ritter U. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. Cancer Nanotech. 2011; 2: 105-110.

9. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Гребіник С.М., Михайлова А.Г., Франскевич Д.В., Матишевська О.П. Показники активності антиоксидантної системи у нормальних та трансформованих клітинах. Досягн. Біол. Медиц. 2011; 2: 31-35.

10. Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Матишевська О.П. Генерація активних форм кисню в тимоцитах щурів за дії пероксиду водню та фулерену C₆₀. Укр. біохім. журн. 2012; 84(2): 48-52.

11. **Prylutska S.V.**, Bilyu R.O., Overchuk M.M., Bychko A.V., Andreichenko K.O., Stoika R.S., Rybalchenko V.K., Prylutskyu Yu.I., Tsierkezos N., Ritter U. 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(3): 522-527.

12. **Прилуцька С.В.**, Кічмаренко Ю.М., Богуцька К.І., Прилуцький Ю.І. Фулерен C₆₀ та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи. Біотехнологія. 2012; 5(3): 9-17.

13. **Прилуцька С.В.**, Ротко Д.М., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Токсичність вуглецевих наноструктур у системах *in vitro* та *in vivo*. Суч. Пробл. токсикол. 2012; 3-4: 49-57.

14. Didenko G.V., **Prylutska S.V.**, Kichmarenko Yu.M., Potebnya G.P., Prylutskyu Yu.I., Slobodyanik N.S., Ritter U., Scharff P. Evaluation of the antitumor immune response to C₆₀ fullerene. Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2013; 44(2-3):, 124-128.

15. Grynyuk I.I., Grebinyk S.M., **Prylutska S.V.**, Mykhailova A.G., Franskevich D.V., Matyshevska O.P., Schütze C., Ritter U. Photoexcited fullerene C₆₀ disturbs prooxidant-antioxidant balance in leukemic L1210 cells. Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2013; 44(2-3): 139-143.

16. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Слободяник Н.С., Чунихин А.Ю., Матишевська О.П. Агрегатное состояние пристинного C₆₀ фуллерена в различных средах. Biotechnol. Acta. 2013; 6(6): 68-74.

17. **Прилуцька С.В.** Застосування комплексів фулерену C₆₀ із протипухлинними препаратами у хіміотерапії. Biotechnol. Acta. 2014; 7(3): 9-20.

18. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P., Prylutskiy Yu.I., Evstigneev M.P., Scharff P., Ritter U. C₆₀ Fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs RD*. 2014; 14: 333-340.

19. **Prylutska S.V.**, Didenko G.V., Potebnya G.P., Bogutska K.I., Prylutskiy Yu.I., Ritter U., Scharff P. Toxic effect of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex towards normal and tumor cells *in vitro*. *Biopolym. Cell*. 2014; 30(5): 372-376.

20. Franskevych D.V., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Grebinyk D.M., Matyshevskaya O.P. Enhanced cytotoxicity of photoexcited fullerene C₆₀ and cisplatin combination against drug-resistant leukemic cells. *Exp. Oncol*. 2015; 37(3): 187-191.

21. **Prylutska S.V.**, Skivka L.M., Didenko G.V., Prylutskiy Yu.I., Evstigneev M.P., Potebnya G.P., Panchuk R.R., Stoika R.S., Ritter U., Scharff P. Complex of C₆₀ Fullerene with Doxorubicin as a Promising Agent in Antitumor Therapy. *Nanoscale Res. Lett*. 2015; 10: 499-506.

22. Bychko A.V., Sokolova V.V., **Prylutska S.V.**, Bogutska K.I., Rybalchenko V.K., Evstigneev M.P., Prylutskiy Y.I., Epple M., Ritter U., Scharff P. Interaction of C₆₀ fullerene complexed to cisplatin with model bilipid membranes and its uptake by HeLa cells. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*. 2016; 47(2-3): 105-111.

23. Franskevych D.V., Grynyuk I.I., **Prylutska S.V.**, Matyshevskaya O.P. Modulation of cisplatin-induced reactive oxygen species production by fullerene C₆₀ in normal and transformed lymphoid cells. *Ukr. Biochem. J*. 2016; 88(1): 44-50.

24. Franskevych D.V., Palyvoda K.O., Petukhov D.M., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Schuetze C., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Ritter U. Fullerene C₆₀ penetration into leukemic cells and its photoinduced cytotoxic effects. *Nanoscale Res. Lett*. 2017; 12: 40-49.

25. **Prylutska S.V.**, Panchuk R.R., Gołuński G., Skivka L.M., Prylutskiy Yu.I., Hurmach V.V., Skorokhyd N.N., Borowik A., Woziwodzka A., Piosik J., Kyzyma O.A., Garamus V.V., Bulavin L.A., Evstigneev M.P., Buchelnikov A.P., Stoika R.S., Berger W., Ritter U., Scharff P. C₆₀ fullerene enhances cisplatin anticancer activity and overcomes tumor cells drug resistance. *Nano Research*. 2017; 10(2): 652-671.

26. **Prylutska S.V.**, Politenkova S.V., Afanasieva K.S., Korolovych V.F., Bogutska K.I., Sivolob A.V., Skivka L.M., Evstigneev M.P., Kostjukov V.V., Prylutsky Yu.I., Ritter U. A nanocomplex of C₆₀ fullerene with cisplatin: design, characterization and toxicity. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2017; 8: 1494-1501.

27. Grebinyk A.G., Grebinyk S.M., **Prylutska S.V.**, Ritter U., Matyshevskaya O.P., Dandekar T., Frohme M. C₆₀ fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 2018; 124: 319-327.

28. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Skaterna T.D., Horak I.R., Grebinyk A.G., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Senenko A.I., Prylutsky Yu.I., Naumovets A.G., Ritter U., Frohme M. Toxicity of C₆₀ fullerene-cisplatin nanocomplex against Lewis lung carcinoma cells. *Arch. Toxicol.* 2019; 93(5): 1213-1226.

29. **Prylutska S.V.**, Lynchak O.V., Kostjukov V.V., Evstigneev M.P., Remeniak O.V., Rybalchenko V.K., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. Antitumor effects and hematotoxicity of C₆₀-Cis-Pt nanocomplex in mice with Lewis lung carcinoma. *Exp. Oncol.* 2019; 41(2): 106-111.

30. **Prylutska S.V.**, Grebinyk A.G., Lynchak O.V., Byelinska I.V., Cherepanov V.V., Tauscher E., Matyshevskaya O.P., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Ritter U., Frohme M. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fuller. Nanotub. Car. Nanostruct.* 2019; 27(9): 715-728.

31. Franskevych D.V., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Pasichnyk G.V., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Ritter U. Mode of photoexcited C₆₀ fullerene involvement in potentiating of cisplatin toxicity against drug resistance L1210 cells. *Bioimpacts.* 2019; 9(4): 211-217.

32. Матишевська О.П., Паливода К.О., **Прилуцкая С.В.**, Гринюк І.І., Пасечник А.В., Петухов Д.Н., Дробот Л.Б. Индукция апоптической гибели лейкемических клеток с использованием фуллерена C₆₀ //Монография под ред. Наумовца А.Г. Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине. Академперіодика. - Киев. - 2014. С. 524-529.

33. Матишевська О.П., Дробот Л.Б., **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Паливода К.О., Петухов Д.М. Фулерен C₆₀ – модулятор апоптозу попередників

Т-лімфоцитів та лейкомічних клітин //Монографія під ред. Стойки Р.С., Прилуцького Ю.І., Наумовця А.Г., та ін. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування. НВП Видавництво «Наукова думка» НАН України. - Київ. - 2017. С. 114-126.

34. Патент України на винахід “Застосування немодифікованих фулеренів C_{60} як протипухлинних агентів у терапії злоякісних новоутворень”, №98076 від 10.04.2012. / **Прилуцька С.В.**, Бурлака А.П., Прилуцький Ю.І., патентовласник КНУ ім. Тараса Шевченка.

35. Патент України на винахід “Спосіб лікування злоякісних пухлин комбінацією немодифікованих фулеренів C_{60} і доксорубіцину”, №102139 від 10.06.2013. / **Прилуцька С.В.**, патентовласник КНУ ім. Тараса Шевченка.

Апробація матеріалів дисертації:

36. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Grebinyk S.M., Mykhailova A.G., Garmanchuk L.V., Matyshevskaya O.P. Study of fullerenes C_{60} effects on ecto-ATPase activity and calcium homeostasis in T-cells //Book of Abstracts of 1st Ukrainian-French School “Carbon Nanomaterials: Structure and Properties”.- P. 82 (Beregove, Crimea, Ukraine, 14-18 September, 2009).

37. Palyvoda K., Samoilenko A., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Drobot L., Matyshevskaya O.; Comparison of protective and cytotoxic effects of C_{60} fullerenes on normal and transformed T-lymphocytes //Ukr. Biochem. J. 2009; 81(4):110 (VII Parnas Conference, Yalta, Crimea, Ukraine, 3-7 October, 2009).

38. Garmanchuk L., Perepelytsina O., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Khranovska N., Sydorenko M., Matyshevskaya O. Effect of fullerenes C_{60} on adhesion and growth of breast adenocarcinoma MCF-7 cells //Ukr. Biochem. J. 2009; 81(4):296 (VII Parnas Conference, Yalta, Crimea, Ukraine, 3-7 October, 2009).

39. Паливода К.О., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Марченко С.М., Самойленко А.А., Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Селективний цитотоксичний вплив фотозбуджених фулеренів C_{60} на трансформовані і на нормальні Т-лімфоцити //Мед. Хім. - 2009. - Т. 11, №3. - С. 154-155. (Всеукраїнська науково-практична конференція «Досягнення і перспективи клінічної біохімії», Тернопіль, Україна, 8-9 жовтня, 2009).

40. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Garmanchuk L., Perepelytsina O., Sydorenko M., Matyshevskya O., Prylutskyu Yu., Ritter U., Scharff P. Influence of C₆₀ fullerenes on the adhesiveness of MCF-7 cells (breast cancer) //Book of Abstracts of 216th Meeting of the Electrochemical Society. - P. 351 (Vienna, Austria, 4-9 October, 2009).

41. Паливода К.О., Самойленко А.А., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Механізми впливу фотозбуджених фулеренів C₆₀ на нормальні і трансформовані Т-клітини //Тезиси Х Юбилейной научной конференции молодых ученых «Современные проблемы экспериментальной и клинической онкологии». - С. 33-34 (Київ, Україна, 22-24 квітня, 2010).

42. Grebinyk S., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Mykhailova A., Matyshevskya O., Yu.I. Prylutskyu, Ritter U., Scharff P. The comparative study of carbon nanotubes and fullerenes C₆₀ influence on free cytosolic Ca²⁺ and ecto-ATPase activity in thymocytes and L1210 cells //Book of Abstracts of Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. - P. 248 (Beregove, Crimea, Ukraine, 6-10 September, 2010).

43. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Palyvoda K., Franskevich D., Matyshevskya O., Ritter U., Scharff P. The effect of photoexcited fullerenes C₆₀ on activity of antioxidative enzymes in Jurkat cells //Book of Abstracts of Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. - P. 250 (Beregove, Crimea, Ukraine, 6-10 September, 2010).

44. Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Матишевська О.П. Рівень цитозольного Ca²⁺ у нормальних та трансформованих Т-клітинах за дії позаклітинного АТР та фулеренів C₆₀ //Укр. біохім. журн. 2010; 82(4):169-170 (Матеріали Х Українського біохімічного з'їзду, Одеса, Україна, 13-17 вересня 2010).

45. Паливода К.О., Самойленко А.А., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Активация каспази-3 у трансформованих Т-лімфоцитах за фотодинамічної терапії фулеренами C₆₀ //Укр. біохім. журн. 2010; 82(4):223 (Матеріали Х Українського біохімічного з'їзду, Одеса, Україна, 13-17 вересня, 2010).

46. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Паливода К.О., Гребіник С.М., Михайлова А.Г., Франкевич Д.В., Матишевська О.П. Продукування активних форм кисню та активність антиоксидантних ферментів у нормальних та трансформованих Т-клітинах за дії фотозбуджених фулеренів C_{60} //Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства. - С. 223 (Луцьк, Україна, 22-25 червня, 2011).

47. **Прилуцька С.В.**, Бурлака А.П., Прилуцький Ю.І. Ангіогенна дія фулеренів C_{60} //Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства. - С. 112-113 (Луцьк, Україна, 22-25 червня, 2011).

48. **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Матишевська О.П. Біологічні ефекти вуглецевих наноструктур у клітинах різних типів //Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства. - С. 113-114 (Луцьк, Україна, 22-25 червня, 2011).

49. Grebinyk S., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Palyvoda K., Mykhailova A., Matyshevska O. Modulation of ROS production and cytosolic Ca^{2+} homeostasis by fullerenes C_{60} in oncotrasformed T-cells //FEBS J. 2011; 278(1):157 (Materials of 36th FEBS congress "Biochemistry for Tomorrow's Medicine", Torino, Italy, 25-30 June, 2011).

50. Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Михайлова А.Г., Франкевич Д.В. Продукування активних форм кисню та активність антиоксидантних ферментів у нормальних та трансформованих Т-клітинах за дії фотозбуджених фулеренів C_{60} //Матеріали VI Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери». - С. 68 (Харків, Україна, 22-25 листопада, 2011).

51. Михайлова А.Г., Франкевич Д.В., Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.** Порівняльна характеристика продукування активних форм кисню й активності антиоксидантних ензимів у нормальних і трансформованих Т-клітинах за дії фотозбуджених фулеренів C_{60} //Збірник тез VII міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» . - С. 64 (Львів, Україна, 3-6 квітня, 2012).

52. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Гребіник С.М., Михайлова А.Г., Франскевич Д.В. Ефекти фулерена C₆₀ на стан антиоксидантної системи нормальних і трансформованих клітин //Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття». - С. 38 (Київ, Україна, 5 квітня, 2012).

53. Grebinyk S., Palyvoda K., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Samoylenko A., Drobot L., Matyshevskaya O. Induction of human leukemic cells apoptosis by photoexcited fullerenes C₆₀ is followed by remodeling of intracellular Ca²⁺ fluxes //FEBS J. 2012; 279(1):52 (Materials of 37th FEBS congress «From Single Molecules to Systems Biology». Sevilla, Spain, 4-9 September, 2012).

54. Didenko G., Kichmarenko Yu., **Prylutska S.**, Potebnya G., Prylutskyi Yu., Ritter U., Scharff P. Evaluation of antitumor immune response of C₆₀ fullerenes and xenogeneic vaccine //Materials of 4th German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 162 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

55. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Klymenko P., Ritter U., Scharff P. Antitumor action of fullerenes C₆₀ and doxorubicin *in vitro* //Materials of 4th German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 167 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

56. Grebinyk S., Palyvoda K., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Mykhailova A., Franskevich D., Drobot L., Matyshevskaya O., Scharff P. Photoexcited fullerene C₆₀ induced endoplasmic reticulum-mitochondria Ca²⁺ fluxes and apoptosis in leukemic cells //Materials of 4th German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 193 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

57. Mykhailova A., Grebinyk S., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Franskevich D., Matyshevskaya O., Ritter U. Reactive oxygen species production and antioxidant system status in transformed cells treated with fullerenes C₆₀ //Materials of 4th German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 92 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

58. **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Франскевич Д.В., Михайлова А.Г., Матишевська О.П. Вплив фулерену C_{60} і доксорубіцину на активність антиоксидантних ензимів у тканинах тварин-пухлиноносіїв з карциномою Льюїса //Матеріали XII Міжнародної конференції з біоніки і прикладної біофізики. - С. 66 (Київ, Україна, 28-29 березня, 2013).

59. Franskevych D., Grebinyk S., **Prylutska S.**, Grynyuk I. Photoexcited Fullerene C_{60} intensifies endoplasmic reticulum-mitochondria Ca^{2+} fluxes in leukemic cells // Materials of Cell Technology Week. - P.37 (Kyiv, Ukraine, 14-17 May, 2013).

60. Mykhailova A., **Prylutska S.**, Grynyuk I. Reactive oxygen species production in leukemic cells under action of photoexcited fullerene C_{60} . // Materials of Cell Technology Week. - P.56. (Kyiv, Ukraine, 14-17 May, 2013).

61. **Prylutska S.**, Pasichnyk G., Grynyuk I., Matyshevskaya O., Drobot L. Modulation of L1210 cells sensitivity to cisplatin by treatment with fullerene C_{60} // FEBS J. 2013;280(1):323-324 (Materials of 38th FEBS congress, S.-Petersburg, Russia, 4-8 July, 2013).

62. Mykhailova A., Franskevych D., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Matyshevskaya O. Prooxidant effect of photoexcited fullerene C_{60} in leukemic cells // Abstract book of Summer school Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013). - P.406 (Bukovel, Ukraine, 25 August-1 September, 2013).

63. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Klymenko P., Mykhailova A., Franskevych D., Matyshevskaya O., Prylutskiy Yu., Ritter U., Sharff P. Antioxidant and antitumor effect of C_{60} fullerene on Lewis lung carcinoma model // Abstract book of 2nd Ukrainian-French school-seminar «Carbon Nanomaterials: Structure and Properties» - P. 84-85 (Beregove, Crimea, Ukraine, 16-20 September, 2013).

64. **Prylutska S.**, Kichmarenko Yu., Didenko G., Skivka L., Prylutskiy Yu., Ritter U., Scharff P. C_{60} fullerene in combination with doxorubicin as a perspective agent in antitumor therapy // Тезиси IV Международной научной конференции «Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии» - P. 474 (Київ, Україна, 19-22 листопада, 2013).

65. **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Франкевич Д.В., Гребіник Д.М., Пасічник Г.В., Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Позаядерні ефекти ДНК-ушкоджувальних препаратів у лейкемічних клітинах //Ukr. Biochem. J. 2014;86(5):129 (Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, Київ, Україна, 6-10 жовтня, 2014).

66. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Франкевич Д.В., Гребіник А.Г., Матишевська О.П. Продукування активних форм кисню та азоту в трансформованих клітинах за дії фулерену C₆₀ //Ukr. Biochem. J. 2014;86(5):181 (Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, Київ, Україна, 6-10 жовтня, 2014).

67. Гринюк І., **Прилуцька С.**, Франкевич Д., Петухов Д., Шютце К., Дробот Л., Матишевська О. Агрегатний стан фулерену C₆₀ у фізіологічному середовищі та проникнення наноструктури у трансформовані клітини // Збірник тез 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. - С. 103 (Ужгород, Україна, 17-20 вересня, 2014).

68. Franskevich D.V., Grynyuk I.I., **Prylutska S.V.**, Matyshevskaya O.P. Photoexcited fullerene C₆₀ enhances cisplatin antineoplastic action in drug – resistant leukemic cells // Book of abstracts 22nd International Student Congress of (Bio)Medical sciences. - P. 577 (Groningen, Netherlands, 2-5 June, 2015).

69. Franskevich D., Grebinyk A., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Matyshevskaya O. Intensification of extranuclear effects of cisplatin promotes cytotoxicity towards drugresistant leukemic cells // FEBS J. 2015;282(1):458 (Abstracts of 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life, Berlin, Germany, 4-9 July, 2015).

70. Franskevich D., Grebinyk A., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Matyshevskaya O. Cytotoxic effect of photoexcited fullerene C₆₀ nanostructure in leukemic cells // Book of abstracts Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research. - P. 48 (Budva, Montenegro, 8-12 June, 2015).

71. Pasichnyk G., Drobot L., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Franskevich D., Matyshevskaya O., Ritter U. Fullerene C₆₀ modulates proliferative activity of leukemic L1210 cells resistant to cisplatin // Book of abstracts V Ukrainian-Germany

Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology.
- P. 279 (Kyiv, Ukraine, 21-25 September, 2015).

72. Franskevich D.V., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P., Ritter U., Sharff P. Combined treatment with cisplatin and photoexcited fullerene C₆₀ potentiates cytotoxicity against drug – resistant leukemic cells // Book of abstracts V Ukrainian-Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. - P. 282 (Kyiv, Ukraine, 21-25 September, 2015).

73. Grebinyk A., **Prylutska S.**, Matyshevskaya O., Dandekar T., Frohme M. Fullerene C₆₀-Doxorubicin Conjugate for Effective Drug Delivery *in vitro* // Abstracts of 9th Meeting of Engineering of Functional Interfaces at the Technical University of Applied Sciences. - P. 36 (Wildau, Germany, 3-5 July, 2016).

74. Grynyuk I.I., Hurmach V.V., **Prylutska S.V.**, Matyshevskaya O.P., Slobodyanik M.S., Prylutskiy Yu.I. C₆₀ fullerene interacts with human serum // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2016) . - P. 465 (Lviv, Ukraine, 24-27 August, 2016).

75. Franskevich D., Grynyuk I.I., **Prylutska S.V.**, Pasichnyk G.V., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Ritter U. Photoexcited fullerene C₆₀ overcomes resistance of leukemic cells to cisplatin by activation of proapoptotic pathways // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017). - P. 27 (Chernivtsi, Ukraine, 23-26 August, 2017).

76. Grebinyk A., **Prylutska S.**, Prylutskiy Yu., Ritter U., Matyshevskaya O., Dandekar T., Frohme M. Apoptosis induction in human leukemic cells with photoexcited C₆₀ fullerene-doxorubicin conjugate // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). - P. 14 (Kyiv, Ukraine, 27-30 August, 2018).

77. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Skaterna T.D., Horak I.R., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Prylutskiy Yu.I., Slobodyanik M.S., Ritter U. Antitumor activity of C₆₀ fullerene-cisplatin nanocomplex against Lewis lung carcinoma cells // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). - P. 77-78 (Kyiv, Ukraine, 27-30 August, 2018).

78. Grebinyk A., **Prylutska S.**, Frohme M., Matyshevskya O. Apoptosis induction in human leukemic cells with C₆₀ fullerene LED-mediated photodynamic therapy // Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (Special Issue): P. 42. (Materials of FEBS+Meeting – XI Parnas Conference, Kyiv, Ukraine, 3-5 September, 2018).

79. **Прилуцька С.**, Гребіник А., Гринюк І., Линчак О., Дробот Л., Матишевська О. C₆₀ фулерен та його комплекс з цисплатином для застосування у протипухлинній терапії // Мед. Клін. Хімія. 2019; 21.(3): 281-282. (Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, Тернопіль, Україна, 30 вересня - 4 жовтня, 2019).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	25
ВСТУП	26
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	35
1.1. Злоякісна трансформація клітин та розвиток резистентності до хіміопрепаратів	35
1.2. Характеристика цисплатину та його протипухлинна дія	39
1.2.1. Структура та властивості цисплатину	39
1.2.2. Застосування цисплатину в хіміотерапії та його побічні ефекти	40
1.2.3. Шляхи надходження цисплатину у клітину та механізми його дії	41
1.2.4. Механізми розвитку резистентності злоякісних клітин до цисплатину	44
1.2.5. Використання біосумісних нанорозмірних носіїв для спрямованої доставки протипухлинних препаратів	47
1.3. C ₆₀ фулерени як новий клас біологічно-активних карбонових наноструктур	48
1.3.1. Структура, властивості та біодоступність C ₆₀ фулерену	48
1.3.2. Біорозподіл C ₆₀ фулерену в організмі тварин	54
1.3.3. Внутрішньоклітинна локалізація C ₆₀ фулерену	57
1.3.4. Біологічна активність C ₆₀ фулерену	59
1.3.5. Протипухлинна активність C ₆₀ фулерену за комбінованої дії з хіміопрепаратами	62
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	64
2.1. Реактиви	64
2.2. Приготування водного колоїдного розчину C ₆₀ фулерену	65
2.3. Умови фотозбудження C ₆₀ фулерену	65
2.4. Оцінка агрегатного стану C ₆₀ фулерену у водному середовищі з використанням методу фотонної кореляційної спектроскопії	66
2.5. Синтез флуоресцентно-мічених похідних C ₆₀ фулерену	67
2.6. Приготування водного розчину C ₆₀ -Cis-Pt наноконкомплексу	69
2.7. Характеризування структури C ₆₀ -Cis-Pt наноконкомплексу у водному середовищі з використанням фізичних методів	70
2.7.1. Динамічне розсіювання світла	70
2.7.2. Атомно-силова мікроскопія	70
2.7.3. Сканувальна тунельна мікроскопія	71
2.7.4. Мало-кутове рентгенівське розсіювання	71
2.8. Методи комп'ютерного моделювання	72
2.8.1. Взаємодія C ₆₀ фулерену з АВС-транспортерами	72
2.8.2. Просторова структура C ₆₀ -Cis-Pt наноконкомплексу у водному середовищі	73
2.9. Формування біліпідних плівок Ленгмюра-Блоджетт	74
2.10. Клітинні лінії та умови культивування клітин	76
2.11. Ізолювання тимоцитів з тимуса щура	77

2.12.	Оцінка виживаності клітин з використанням барвника трипанового синього	77
2.13.	Оцінка життєздатності клітин з використанням МТТ	77
2.14.	Цитоморфологія клітин	78
2.15.	Оцінка адгезивних властивостей клітин	78
2.16.	Оцінка міграційної активності клітин	79
2.17.	Визначення активності ензимів антиоксидантної системи у клітинних лізатах	79
2.17.1.	Отримання клітинних лізатів	79
2.17.2.	Визначення активності супероксиддисмутази	80
2.17.3.	Визначення глутатіонпероксидазної активності	80
2.17.4.	Визначення глутатіонтрансферазної активності	81
2.18.	Оцінка кінетики гемолізу еритроцитів щура	81
2.19.	Оцінка продукування АФК у клітинах	81
2.20.	Визначення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} у клітинах	82
2.21.	Реєстрація мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах	82
2.22.	Аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу	83
2.23.	Дослідження клітин у стані апоптозу	83
2.23.1.	Подвійне фарбування клітин FITC-міченим анексином-V і пропідій йодидом для протокової цитофлуориметрії	83
2.23.2.	Визначення активності каспази 3/7	84
2.23.3.	Фарбування ядерного хроматину барвником DAPI (4',6-діаміно-2-феніліндол)	84
2.24.	Оцінка проникнення C_{60} фулерену у клітини	85
2.24.1.	Флуоресцентна мікроскопія	85
2.24.2.	Конфокальна мікроскопія	85
2.24.3.	Імунофлуоресцентне фарбування клітин	86
2.25.	Умови утримання лабораторних тварин	87
2.26.	Схема експерименту дослідження гострої токсичності сполук	88
2.27.	Визначення напівлетальної дози (LD_{50}) сполук	88
2.28.	Гематологічні дослідження	89
2.29.	Дослідження морфофункціонального стану клітин кісткового мозку	89
2.30.	Цитоморфологічне дослідження внутрішніх органів	90
2.31.	Експериментальна модель пухлинного росту та схема введення досліджуваних сполук	90
2.32.	Оцінка виживаності мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс	92
2.33.	Оцінка протипухлинного ефекту у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс	92
2.33.1.	Розмір і маса пухлинного вузла	92
2.33.2.	Індекс гальмування пухлинного росту	93
2.33.3.	Цитоморфологічні особливості карциноми легені Льюїс	93
2.34.	Оцінка антиметастатичного ефекту	93

2.35.	Ваговий індекс лімфоїдних органів	94
2.36.	Статистична обробка результатів дослідження	94
РОЗДІЛ 3. МЕМБРАНОТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ C ₆₀ ФУЛЕРЕНУ		95
3.1.	Взаємодія C ₆₀ фулерену зі штучними біліпідними мембранами	95
3.2.	Проникнення C ₆₀ фулерену у клітини	98
РОЗДІЛ 4. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ C ₆₀ ФУЛЕРЕНУ НА КЛІТИННОМУ РІВНІ		105
4.1.	Оцінка впливу C ₆₀ фулерену на нормальні клітини	105
4.1.1.	Життєздатність та активність антиоксидантних ензимів тимоцитів за дії C ₆₀ фулерену	105
4.1.2.	Захисні ефекти C ₆₀ фулерену від дії пероксиду водню та цисплатину на тимоцити та еритроцити	108
4.2.	Оцінка впливу C ₆₀ фулерену на злоякісно трансформовані клітини	117
4.2.1.	Вплив C ₆₀ фулерену на життєздатність злоякісно-трансформованих та активність АО ензимів клітин лейкемії	117
4.2.2.	Вплив C ₆₀ фулерену на адгезивні властивості клітин карциноми молочної залози людини лінії MCF-7	123
РОЗДІЛ 5. ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ ЦИСПЛАТИНУ ЩОДО ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИН РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ ТА ЧУТЛИВОСТІ ДО ЦИТОСТАТИКІВ		129
РОЗДІЛ 6. ВЗАЄМОДІЯ C ₆₀ ФУЛЕРЕНУ З АВС-ТРАНСПОРТЕРАМИ <i>IN SILICO</i>		136
РОЗДІЛ 7. КОМБІНОВАНА ДІЯ ФОТОЗБУДЖЕНОГО C ₆₀ ФУЛЕРЕНУ ТА ЦИСПЛАТИНУ НА ЧУТЛИВІ ТА РЕЗИСТЕНТНІ КЛІТИНИ L1210 ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ МИШІ		142
7.1.	Життєздатність чутливих і резистентних до цитостатику клітин L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C ₆₀ фулерену та цисплатину	143
7.2.	Продукування АФК у чутливих і резистентних до цитостатику клітинах L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C ₆₀ фулерену та цисплатину	146
7.3.	Концентрація вільного цитозольного Ca ²⁺ у чутливих і резистентних до цитостатику клітинах L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C ₆₀ фулерену та цисплатину	149
7.4.	Величина мембранного потенціалу мітохондрій у чутливих і резистентних до цитостатику клітинах L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C ₆₀ фулерену та цисплатину	152
7.5.	Розподіл чутливих і резистентних до цитостатику клітин L1210 за фазами клітинного циклу за комбінованої дії фотозбудженого C ₆₀ фулерену та цисплатину	155
РОЗДІЛ 8. ХАРАКТЕРИСТИКА C ₆₀ ФУЛЕРЕНУ ТА НАНОКОМПЛЕКСУ C ₆₀ ФУЛЕРЕНУ З ЦИСПЛАТИНОМ		159

8.1.	Агрегатний стан C ₆₀ фулерену у водному середовищі	159
8.2.	Характеристика просторової структури наноконплексу C ₆₀ фулерену з цисплатином (C ₆₀ -Cis-Pt) <i>in silico</i>	164
8.3.	Характеристика структури C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу з використанням фізичних методів	166
РОЗДІЛ 9. БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ C ₆₀ -Cis-Pt НАНОКОМПЛЕКСУ У СИСТЕМІ <i>IN VITRO</i>		173
9.1.	Життєздатність та цитоморфологічні особливості клітин НЕК293 ембріональної нирки людини за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	173
9.2.	Токсичність C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу щодо клітин LLC карциноми легені Льюїс	176
9.2.1.	Життєздатність клітин LLC та їх цитоморфологічні особливості за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	176
9.2.2.	Міграційна активність клітин LLC за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	179
9.2.3.	Розподіл клітин LLC за фазами клітинного циклу за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	181
9.2.4.	Індукція апоптозу C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексом у клітинах LLC	183
9.3.	Токсичність C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу щодо клітин HL-60 промієлоцитарної лейкемії людини різних за чутливістю до цитостатиків	186
9.3.1.	Виживаність клітин HL-60 за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	186
9.3.2.	Розподіл клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	189
9.3.3.	Індукція апоптозу C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексом у клітинах HL-60/adr	191
9.4.	Токсичність C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу щодо клітин карциноми шийки матки людини	193
9.4.1.	Проникнення C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу у клітини HeLa	193
9.4.2.	Виживаність клітин HeLa та KB-3-1 за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	195
9.4.3.	Стан структури хроматину клітин KB-3-1 за дії наноконплексу C ₆₀ -Cis-Pt	197
РОЗДІЛ 10. БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ C ₆₀ -Cis-Pt НАНОКОМПЛЕКСУ У СИСТЕМІ <i>IN VIVO</i>		202
10.1.	Дослідження гострої токсичності C ₆₀ фулерену та C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	202
10.1.1.	Визначення показника LD ₅₀ , гематотоксичності та впливу на морфологічний стан органів C ₆₀ фулерену	202
10.1.2.	Визначення показника LD ₅₀ , гемато- та органоспецифічна токсичність C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	212
10.2.	Протипухлинний ефект C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс	221
10.2.1.	Виживаність мишей з перещепленою карциномою легені	

Льюїс за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	222
10.2.2. Вплив C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу на ріст перещепленої карциноми легені Льюїс у мишей	225
10.2.3. Цитоморфологічні зміни у тканині карциноми легені Льюїс за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	230
10.3. Вплив C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу на метастазування карциноми легені Льюїс у мишей	233
10.4. Вплив C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу на фізіологічний стан мишей з карциномою легені Льюїс	237
10.4.1. Маса тіла мишей з карциномою легені Льюїс за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	237
10.4.2. Показники крові мишей з карциномою легені Льюїс за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	239
10.4.3. Вагові індекси тимусу і селезінки мишей з карциномою легені Льюїс за дії C ₆₀ -Cis-Pt наноконплексу	243
РОЗДІЛ 11. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	247
ВИСНОВКИ	267
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	269
ДОДАТКИ	
Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації	325
Експертний висновок щодо ефективності впровадження результатів дисертаційної роботи	337

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АОЕ – антиоксидантні ензими
АОС – антиоксидантна система
АСМ – атомно-силова мікроскопія
АФК – активні форми кисню
БЛМ – біліпідні мембрани
ГП – глутатіопероксидаза
ГТ – глутатіон-S-трансфераза
ДРС – динамічне розсіювання світла
ПМ – плазматична мембрана
СОД – супероксиддисмутаза
СТМ – сканувальна тунельна мікроскопія
МД – молекулярний докінг
МККР – мало-кутове рентгенівське розсіювання
УФ-Вид – ультрафіолетовий видимий діапазон
[Ca²⁺]_i – концентрація вільного цитозольного Ca²⁺ в клітинах
Cis-Pt – цисплатин
DCFH-DA – 2,7-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетат
FITC – флуоресцеїн-5-ізотіоціанат
IC₅₀ – індекс цитотоксичності, концентрація речовини, яка спричиняє загибель 50% клітин
LD₅₀ – напівлетальна доза, яка спричиняє загибель 50% тварин
MDR – множинна стійкість до лікарських препаратів (multiple drug resistance)
MRP – протеїни асоційовані з множинною стійкістю до лікарських препаратів (multidrug resistance protein)
PBS – фосфатно сольовий буфер
PI – пропідій йодид
RITC – родамін В-ізотіоціанат
TMRE – тетраметилродаміну етил естеру перхлориду

ВСТУП

Актуальність теми. Цілеспрямований синтез наночастинок, здатних впливати на біологічні процеси, стимулював їх широке використання у біотехнологіях. Наразі вивчено біологічну активність наночастинок різної природи, утворених як неорганічними сполуками - сульфідами металів (PbS, CdS, ZnS) [1], оксидами заліза [143, 246, 415], срібла, золота, міді, кобальта [43, 75], так і органічними біополімерами [77].

Особливий інтерес викликають біологічно активні нетоксичні наноматеріали, які можуть бути використані для таргентної доставки лікарських препаратів та підвищення ефективності протипухлинної терапії. Перспективним у цьому напрямку є представник наноструктур карбону C₆₀ фулерен. Нанорозмірність (0,72 нм), сферичність, гідрофобність, біосумісність та біодоступність C₆₀ фулерену забезпечують взаємодію наноструктури з біологічними молекулами, вбудовування у ліпідний бішар мембрани та проникнення всередину клітин. Виявлено накопичення C₆₀ фулерену у пухлинах печінки, шлунку, кишківника, легень, кісток та його вибірково ушкоджувальну дію щодо злякано трансформованих клітин [244, 472, 541]. Унікальною є будова поверхні молекули C₆₀ із системою π-кон'югованих електрондефіцитних зв'язків, що зумовлює такі властивості наноструктури, як антиоксидантні (вловлювання вільних радикалів) [426, 527], здатність до фотозбудження після опромінення в УФ-видимому діапазоні з подальшим продукуванням АФК [231, 339, 518], що може бути використано для фотодинамічної терапії (ФДТ) ракових захворювань, а також здатність утворювати комплекси з хіміопрепаратами [117, 310, 533], що може бути використано для оптимізації їх дії.

Традиційним протипухлинним препаратом широкої дії є цисплатин (цис-діамінодихлорплатина, cis-[Pt(II)(NH₃)₂Cl₂], Cis-Pt), цитотоксичний ефект якого зумовлений ушкодженням ДНК і позаядерних мішеней та індукцією окисного стресу [94, 115]. Незважаючи на високу ефективність цисплатину, його клінічне застосування є обмеженим через низьку селективність, розвиток

медикаментозної резистентності та токсичний вплив на нормальні клітини [172, 185, 384].

Розробка нових підходів до застосування традиційних хіміопрепаратів у комбінації з наноматеріалами є важливою комплексною проблемою сучасної біотехнології. На сьогодні накопичено значну кількість даних, які свідчать, що у разі комбінованої дії або кон'югації наночастинок (розміром 1-100 нм) з протипухлинними препаратами спостерігаються позитивні терапевтичні ефекти - подовження періоду напіввиведення хіміопрепаратів, вибіркоче накопичення у злоякісних пухлинах внаслідок ефекту посилення проникності та утримання (EPR ефект), покращення фармакокінетики цитостатиків, зниження їх побічних ефектів [201, 315]. Продемонстровано оптимізацію біологічної дії платиновмісних протипухлинних препаратів за використання наноносіїв органічної (полімерні кон'югати, міцели, ліпосоми) та неорганічної (карбоніві нанотрубки, оксиди заліза, золото та кремнезем) природи [75, 143, 152]. Біосумісність та унікальні фізико-хімічні властивості C_{60} фулерену вказують на можливість використання цієї наноструктури як модифікатора дії традиційних протипухлинних препаратів.

У зв'язку з вище викладеним актуальним є розробка технологічних підходів для підвищення ефективності протипухлинної дії цисплатину за використання C_{60} фулерену. Такі підходи потребують з'ясування механізмів цитотоксичної дії цисплатину у комбінації із C_{60} фулереном та спрямовані на посилення протипухлинного ефекту цисплатину за низької дози, подолання медикаментозної резистентності злоякісних клітин, забезпечення таргентної доставки цитостатика і зниження його токсичної дії на організм.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Робота виконана в рамках науково-дослідних тем Київського національного університету імені Тараса Шевченка: “Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій” (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.), “Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів” (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.), “Кристалохімічний дизайн і функціональні властивості нових

складнооксидних сполук та гібридних наноструктур на їх основі” (№ д/р 0119U100316, 2019-2021 рр.), а також частково підтримана українсько-німецьким білатеральним грантом ВМВФ (ФРН) (№ Ukr 10-012, 2010-2012 рр.), персональними грантами DFG (ФРН) (2010 р.) та МОН України (2012 р.) для молодих вчених, DAAD стипендіями (ФРН) (2010, 2014, 2019 рр.), вітчизняним грантом НАН України “Нові нановуглецеві матеріали для спрямованої дії на онкотрансформовані клітини” (№ д/р 0110U005962, 2010-2014 рр.), в рамках програми “Нанотехнології та наноматеріали” та міжнародним дослідницьким проектом УНТЦ «Нові функціональні наноматеріали для підвищення ефективності хіміотерапії» (№ 6256, 2017-2019 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у розробці технології застосування C_{60} фулерену для підвищення протипухлинної ефективності цисплатину у системах *in vitro* та *in vivo* і з’ясуванні механізмів дії цисплатину у комбінації з фотозбудженим C_{60} фулереном та у складі нековалентного наноконкомплексу C_{60} -Cis-Pt.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі завдання:

1. Оцінити захисні властивості C_{60} фулерену від ушкоджувальної дії пероксиду водню та цисплатину на нормальні клітини (тимоцити та еритроцити).

2. Дослідити проникнення C_{60} фулерену у лейкомічні клітини та його внутрішньоклітинну локалізацію.

3. Оцінити вплив фотозбудженого C_{60} фулерену у комбінації з цисплатином за низької концентрації на життєздатність чутливих і резистентних до цисплатину клітин L1210 лімфоцитарної лейкемії миші та з’ясувати механізми комбінованої дії досліджуваних чинників.

4. Створити наноконкомплекс C_{60} фулерену з цисплатином (C_{60} -Cis-Pt) та охарактеризувати його структуру за допомогою фізико-хімічних методів.

5. Оцінити протипухлинну дію наноконкомплексу C_{60} -Cis-Pt *in vitro* порівняно з окремою дією цитостатика в еквівалентній концентрації та з’ясувати механізми дії наноконкомплексу на злоякісні клітини.

6. Оцінити гостру токсичність C₆₀ фулерену, цисплатину та наноконплексу C₆₀-Cis-Pt за умови внутрішньочеревного введення мишам.

7. Оцінити показники крові та морфологію тканин органів (нирка, печінка, селезінка, серце) мишей, які внутрішньочеревно отримували C₆₀ фулерен, цисплатин та наноконплекс C₆₀-Cis-Pt.

8. Оцінити протипухлинну та антиметастатичну дію наноконплексу C₆₀-Cis-Pt *in vivo* на моделі трансплантованої карциноми легені Льюїс миші порівняно з окремою дією цисплатину в еквівалентній дозі.

9. Оцінити фізіологічний стан мишей з карциномою легені Льюїс за дії наноконплексу C₆₀-Cis-Pt за такими показниками як виживаність мишей-пухлиноносіїв, їх маса тіла і показники крові.

Об'єкт дослідження – фототоксична дія C₆₀ фулерену у комбінації з цисплатином на клітини лейкемії, протипухлинна дія нековалентного наноконплексу C₆₀ фулерену з цисплатином Cis-Pt (C₆₀-Cis-Pt) щодо карциноми легені Льюїс *in vitro* та *in vivo*.

Предмет дослідження – внутрішньоклітинна локалізація наноструктури, життєздатність клітин, гемоліз еритроцитів, продукування АФК, концентрація цитозольного Ca²⁺, мембранний потенціал мітохондрій, міграційна активність клітин, структура нековалентного наноконплексу C₆₀-Cis-Pt, клітинний цикл, активність каспази 3/7, транслокація фосфатидилсерину, напівлетальна доза, показники крові, морфологія тканин органів, виживаність мишей-пухлиноносіїв, розмір і маса пухлини, цитоморфологія пухлини, розмір і кількість метастазів у легенях.

Методи дослідження – методи клітинної біології (культивування, фарбування клітин, протокова цитофлуориметрія, світлова, фазово-контрастна, конфокальна і флуоресцентна мікроскопія) та гістології (морфологія тканин і органів); спектрофотометричний (МТТ-тест, гемоліз еритроцитів, активність ензимів і каспази 3/7) та спектрофлуориметричний (з використанням зондів DCFH-DA, індо-1AM, TMRE) методи; методи токсикології (визначення напівлетальної дози LD₅₀, морфофункціональний стан клітин кровотворної системи); методи експериментальної онкології (показники пухлинного росту,

метастазування, виживаності мишей-пухлиноносіїв); динамічне розсіювання світла (ДРС); сканувальна тунельна мікроскопія (СТМ); методи комп'ютерного моделювання; статистична обробка результатів дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше застосовано технології використання немодифікованого C_{60} фулерену як у комбінації з цисплатином після фотоактивації наноструктури, так і у складі нековалентного наноконкомплексу з цисплатином (C_{60} -Cis-Pt) для підвищення ефективності дії традиційного протипухлинного препарату за низьких доз та доведено їх ефективність.

Встановлено, що C_{60} фулерен запобігає спричиненому як пероксидом водню, так і цисплатином продукуванню АФК тимоцитами, H_2O_2 -індукованому зниженню життєздатності тимоцитів та Cis-Pt-індукованому гемолізу еритроцитів.

Доведено, що C_{60} фулерен поглинається лейкемічними клітинами та локалізується переважно у мітохондріях. Встановлено, що за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та Cis-Pt у низькій концентрації токсичний ефект цитостатика у чутливих до цисплатину клітинах L1210 посилюється, а у резистентних L1210/Cis-Pt – відновлюється. Продемонстровано, що механізмами синергічного посилення токсичної дії цисплатину у комбінації з фотозбудженим C_{60} фулереном у лейкемічних клітинах є більш значна порівняно з окремою дією фотозбудженого C_{60} фулерену або цисплатину інтенсифікація продукування АФК, підвищення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} , падіння мітохондрійного потенціалу, накопичення клітин у SubG1 фазі клітинного циклу та загибель шляхом апоптозу.

Вперше створено нековалентний, стабільний у водному середовищі наноконкомплекс C_{60} фулерену із Cis-Pt (C_{60} -Cis-Pt) та охарактеризовано його структуру. Комплексоутворення між молекулами C_{60} та Cis-Pt підтверджено методами комп'ютерного моделювання, сканувально тунельної мікроскопії та динамічного розсіювання світла.

Доведено ефективнішу протипухлинну дію C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу щодо карциноми легені Льюїс порівняно з дією вільного Cis-Pt за еквівалентної

доз. В експериментах *in vitro* встановлено, що токсичність C_{60} -Cis-Pt наноконплексу ($IC_{50}=17\pm 2$ мкМ) є вищою порівняно з окремою дією цисплатину ($IC_{50}=50\pm 4$ мкМ) і реалізується через індукцію апоптозу, що підтверджено активацією каспази 3/7 та транслокацією фосфатидилсерину на поверхню клітин LLC.

Вперше оцінено гостру токсичність немодифікованого C_{60} фулерену та C_{60} -Cis-Pt наноконплексу за внутрішньочеревного введення мишам. Показано, що LD_{50} для C_{60} фулерену становить 721 ± 48 мг/кг, що підтверджує низьку токсичність наноструктури в організмі тварин за низьких доз. Вперше в експериментах *in vivo* встановлено, що токсичність Cis-Pt ($LD_{50}=15,6\pm 1,3$ мг/кг) за конплексоутворення із C_{60} фулереном ($LD_{50}=36,1\pm 2,8$ мг/кг) знижується удвічі.

Показано, що C_{60} -Cis-Pt наноконплекс ефективніше пригнічував ріст перещепленої карциноми легені Льюїс та утворення метастазів у легенях мишей порівняно з дією Cis-Pt за еквівалентної дози, що супроводжувалось подовженням тривалості життя мишей-пухлиноносіїв, нормалізацією їх маси тіла та показників крові.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані фундаментальні результати розширюють сучасні уявлення про взаємодію карбонової наноструктури з клітинами, механізми цитотоксичної дії цисплатину у конбінації з C_{60} фулереном та шляхи реалізації їх біологічних ефектів *in vitro* та *in vivo*. Запропоновано технологічні підходи для підвищення протипухлинної ефективності цисплатину шляхом як його конбінованого використання з фотозбудженим C_{60} фулереном, так і нековалентного конплексоутворення із C_{60} фулереном (C_{60} -Cis-Pt). Відновлення токсичного впливу цисплатину за низької концентрації на резистентні до цитостатику зляокісні клітини у разі конбінації із фототоксичною дією C_{60} фулерену доводить перспективність використання фотосенсибілізувального потенціалу C_{60} фулерену у фотодинамічній терапії пухлин та для подолання медикаментозної резистентності зляокісних клітин. Виявлене пришвидшення дії цисплатину та підвищення чутливості зляокісних клітин до дії цитостатика у

разі комплексоутворення із C_{60} фулереном вказують на ефективність застосування C_{60} фулерену як таргентного наноносія протипухлинних препаратів. Відсутність токсичного впливу вільного C_{60} фулерену на нормальні клітини та його здатність попереджувати ушкоджувальну дію цисплатину і пероксиду водню на них свідчать про можливість використання цієї наноструктури як ефективного цитопротектора.

Запропоновані інноваційні технології підвищення ефективності протипухлинної дії традиційних хіміопрепаратів за комбінації із C_{60} фулереном можуть бути використані для розробки і впровадження нових форм протипухлинних агентів у клінічну практику.

Результати наукових досліджень рекомендуються для використання у навчальному процесі при викладанні дисциплін «Біотехнологія» та «Основи нанобіотехнологій», а також при проведенні лабораторних робіт та навчальних практик для студентів зі спеціальностей «біохімія», «біофізика», «медична хімія», «молекулярна біологія» та «біотехнологія».

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою особисто сформульовано завдання досліджень, здійснено пошук та аналіз наукової літератури за темою дисертації, вибір об'єктів та методів дослідження, постановка експериментів. Авторка розробила методики фотозбудження C_{60} фулерену та створення наноконкомплексів C_{60} фулерену з протипухлинними препаратами у водному середовищі та їх технології застосування у біологічних системах *in vitro* та *in vivo*. Авторка брала участь у комп'ютерному моделюванні спільно з к.б.н. Гурмачем В.В. і д.ф-м.н. Євстігнєєвим М.П. та характеризуванні структури наноконкомплексу спільно з к.ф-м.н. Черепановим В.В. і к.ф-м.н. Сененком А.І. За безпосередньої участі авторки біологічні дослідження *in vitro* виконано у відділі сигнальних механізмів клітини за сприяння д.б.н., проф. Дробот Л.Б. (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України), відділі молекулярної біотехнології та функціональної геноміки за сприяння проф. Фрохме М. (Технічний університет прикладних наук Вільдау, ФРН), лабораторії біоматеріалів за сприяння проф. Еппле М. (Університет Дуйсбург-Ессен, ФРН); токсикологічні, гематологічні та гістологічні дослідження - за сприяння д.б.н., проф. Рибальченка В.К.

(Київський національний університет імені Тараса Шевченка), протипухлинну дію сполук *in vivo* - за сприяння к.б.н. Діденка Г.В. (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України). Одержані оригінальні результати представлено у спільних публікаціях у фахових вітчизняних і міжнародних виданнях, більшість з яких входить до наукометричної бази Scopus. Спільно з науковим консультантом д.б.н., проф. Матишевською О.П. сформульовано основні наукові напрямки дисертаційної роботи та її мету, проаналізовано одержані результати та обговорено підготовку до друку статей за результатами проведених досліджень.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, отримані в рамках виконання дисертаційної роботи, були представлені на: 1st Ukrainian-French School “Carbon Nanomaterials: Structure and Properties” (Берегове, Україна, 2009), VII Parnas Conference (Ялта, Україна, 2009), X Ювілейній науковій конференції молодих онкологів “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології” (Київ, Україна, 2010), Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Берегове, Україна, 2010), X Українському біохімічному з’їзді (Одеса, Україна, 2010), V з’їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк, Україна, 2011), 36th FEBS congress “Biochemistry for Tomorrow’s Medicine” (Турин, Італія, 2011), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції “Біотехнологія XXI століття” (Київ, Україна, 2012), 37th FEBS congress “From Single Molecules to Systems Biology” (Севілья, Іспанія, 2012), 4th German-Ukrainian symposium “Physics and Chemistry of Nanostructures and nanobiotechnology” (Ільменау, ФРН, 2012), XII Міжнародній конференції з біоніки і прикладної біофізики (Київ, Україна, 2013), 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Росія, 2013), Summer school Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013) (Буковель, Україна, 2013), 2nd Ukrainian-French school-seminar “Carbon Nanomaterials: Structure and Properties” (Берегове, Україна, 2013), IV Міжнародній науковій конференції “Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології” (Київ, Україна, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), IV з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом

(Ужгород, Україна, 2014), V Ukrainian-Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Київ, Україна, 2015), International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2016) (Львів, Україна, 2016), International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017) (Чернівці, Україна, 2017), XI Parnas Conference (Kyiv, Ukraine, 2018), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019). Результати дисертаційної роботи доповідалися на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та кафедри неорганічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 79 наукових робіт, зокрема 31 стаття у фахових виданнях, з них 23 включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, 2 розділи у монографіях, 2 патенти України на винахід, а також 44 тези доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів і з'їздів.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення отриманих результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел літератури (545 посилань). Роботу викладено на 340 сторінках та проілюстровано 65 рисунками та 20 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Злоякісна трансформація клітин та розвиток резистентності до хіміопрепаратів

Онкогенез (злоякісна трансформація клітин) - це тривалий багатостадійний процес накопичення мутацій та інших змін, які призводять до порушення регуляції клітинного циклу, процесів проліферації, диференціювання апоптозу, а також до зниження ефективності функціонування факторів специфічного та неспецифічного імунітету [21]. Внаслідок трансформації диференціювання клітин припиняється і клітини переходять від регульованої до автономної проліферації.

Процес онкогенезу складається із наступних послідовних етапів: ініціації, промоції та прогресії. На етапі ініціації під дією певних хімічних, фізичних або біологічних агентів (канцерогенів) у геномі клітини відбуваються мутації та структурні зміни, які зачіпають протоонкогени та гени-супресори пухлинного росту, для закріплення яких необхідна реплікація ДНК [40, 44]. Однак, не всі ініційовані до проліферації клітини дають початок пухлинним клітинам.

На стадії промоції відбувається збільшення популяції ініційованих клітин та подальші зміни у їх геномі, що контролюються факторами, які не є канцерогенами і носять назву промотори (наприклад, форболові ефіри, гормони). Завдяки дії промоторів блокується міжклітинна взаємодія, пухлинний клон позбавляється контролю мікрооточення. Прогресія – активна стадія пухлинного процесу, коли внаслідок проліферації клон трансформованих і максимально агресивних (здатних до інвазії і метастазування) клітин перетворюється на пухлину [21, 57].

Трансформовані клітини мають фенотипові особливості, які виявляються на рівні клітинної мембрани (змінюються склад і структура олігосахаридних

ланцюгів глікопротеїнів і глікофінголідів, що призводить до зміни проникності і заряду мембрани, модифікується спектр адгезивних молекул та рецепторів, втрачаються міжклітинні контакти, підвищується швидкість транспортування поживних речовин, інтенсивно секретуються протеїнази та їх активатори). Певні особливості відмічаються також на рівні внутрішньоклітинного середовища (активація протоонкогенів і експресія онкогенів, мутаційні зміни антионкогенів, посилення секреції поліпептидних факторів росту та зміна експресії рецепторів до факторів росту (зокрема, β -TNF), зміна механізмів передачі регуляторних сигналів та нечутливість до дії апоптогенних факторів) [28, 48, 53, 57].

Важливою ознакою неопластичної клітини є порушення механізмів індукції апоптозу внаслідок змін щодо експресії рівня протоонкогенів (активація *Myc*, *Ras*) та/або пухлинних супресорів (інактивація *p53*, *pRb*), що призводить до порушення клітинного циклу та спричиняє генетичну нестабільність [40, 45]. Саме завдяки підвищеній нестабільності геному у клітині виникає достатня кількість мутацій, яка визначає їх злоякісний ріст.

У пухлинних клітинах виявлено мутації гену *p53*, частота яких перевищує 50%. Відомо, що у нормальних клітинах білок *p53* є регулятором таких клітинних функцій, як клітинний цикл, репарація пошкодженої ДНК, диференціювання клітин та їх загибель шляхом апоптозу [57, 60, 219]. При пошкодженні структури ДНК білок *p53* активує експресію апоптозіндукуючих генів, у тому числі *bax*, *Fas*, *Dk 5*, *PIG1-14*, *IGF-BP3*, *p58* і *PAG 608* [381]. Зокрема, дію білків *PIG1-14* пов'язують з утворенням у клітині активних форм кисню, а переміщення білка *Bax* у мітохондрійну мембрану сприяє виходу проапоптичних факторів з міжмембранного простору мітохондрій у цитоплазму. Білок *p53* також здатний пригнічувати експресію антиапоптичних генів *bcl-2* і рецептора *IGF-1* [209, 359].

Відомо, що білки *Bcl-2*, регулюють вихід апоптогенних факторів з мітохондрій у цитоплазму, впливаючи на мембранні пори [350, 434, 451]. Мутації гену *bax*, що ведуть до інактивації цього проапоптичного білка, виявлені в більшій частині пухлинних клітин товстої кишки (лінія HCT116),

резистентних до препарату оксаліплатин [197]. Клітини лімфоми з гіперекспресією білка *bcl-2*, чи клітини раку молочної залози з високим рівнем експресії білка *bcl-x_L*, характеризуються підвищеною стійкістю до дії хіміопрепаратів *in vivo* [30]. Отже, мутації чи зміни рівня експресії генів, що кодують *bcl-2*-подібні білки, ведуть до розвитку в пухлинних клітинах резистентності до медикаментозної терапії.

Для пухлинних клітин характерні специфічні порушення у функціонуванні системи Fas/FasL та рецепторів факторів некрозу пухлин (TNF), які безпосередньо задіяні в реалізації клітинного протипухлинного імунітету. У злоякісно трансформованих клітинах відзначається зниження експресії рецептора Fas, а також одного з його лігандів (FasL) [181, 319]. Порушення функціональної активності системи Fas/FasL може призводити до мутації гену *Fas* і генів, що кодують структуру сигнальних про- і антиапоптичних білків. На експериментальній моделі гепатокарциноми показано [69], що трансформовані гепатоцити можуть проявляти стійкість до апоптозу, індукованого β -TNF, навіть за присутності його рецепторів. У клітинах гепатоцелюлярного раку було знайдено мутації генів *Smad 2* та *4*, що приймають участь у передачі проапоптичних регуляторних сигналів від рецептору β -TNF [516]. Мутантні форми чи зміна експресії, порушення функціональної активності системи Fas/FasL та рецепторів факторів некрозу пухлин призводять до розвитку резистентності пухлинних клітин до дії цитостатиків.

Згідно літературних даних, причинами неконтрольованої проліферації є не тільки активація протоонкогенів і зниження чутливості клітин до дії факторів, які пригнічують ріст або викликають пошкодження пухлинних клітин, а також активація сигнальних каскадів, які забезпечують виживання клітин за умови дії протипухлинних препаратів. Так, у процесі прогресії пухлин в експериментах *in vivo* утворюються та відбираються клітини з високим рівнем H_2O_2 – нейтралізуючої (антиоксидантної) дії, тобто стійкі клітини до “окисного вибуху”, що виникає при контакті з природніми кілерами, макрофагами та нейтрофілами. Внаслідок цього цитолітична дія на пухлинні клітини таких

складових імунного захисту послаблюється у 10-100 разів. Підвищена антиоксидантна активність злоякісних клонів, яку оцінювали як сумарну активність каталази, Cu-Zn-супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази виявляється у прискореному катаболізмі H_2O_2 , що продукується при контакті клітини з натуральними кілерами (від 15-20 хв у випадку батьківських клонів до 20-180 с у випадку злоякісних клонів). Окрім того, контакт пухлинної клітини з ендогеними кілерами супроводжується підвищенням продукції простагландину E_2 , який триває 3-4 год і повністю інактивує цитотоксичну дію ендогених кілерів. Механізми генетичної регуляції, які визначаються коекспресією цих двох ознак (підвищена антиоксидантна активність і викид простагландину E_2) остаточно невідомі [34].

Хіміотерапія є як основним, так і додатковим методом лікування злоякісних новоутворень. Фармацевтичний ринок насичений великою кількістю протипухлинних препаратів, застосування яких є малоефективним із-за побічної дії та обмеженим із-за розвитку стійкості пухлинних клітин до дії цитостатиків. Резистентність пухлинних клітин одночасно до цілої низки хіміотерапевтичних препаратів з різними механізмами дії на клітину має назву множинної медикаментозної стійкості (ММС). Припускається, що у розвитку ММС може брати участь велика кількість генів, що кодують білки з різними механізмами дії. Вважається, що головну роль у розвитку ММС відіграє ген *MDR1*. Продуктом цього гену є так званий Р-глікопротеїн - мембранний АТФ-залежний білок, здатний активно видаляти з клітини протипухлинні препарати. Оскільки для функціонування Р-глікопротеїна необхідний відновлений глутатіон, цей білок, скоріш за все, є одним з транспортерів кон'югатів глутатіона (так званих GS-X насосів) [55, 61].

Отримані на сьогодні експериментальні дані дозволяють вважати неперспективною розробку терапії злоякісних пухлин шляхом впливу на генетичний апарат клітини. Підвищена генетична мінливість пухлинних клітин дозволяє уникати дії протипухлинних засобів. При цьому стає можливою поява невеликої кількості клітин з новими активованими онкогенами і, як наслідок, набутою резистентністю до дії проапоптичних чинників. Нові молекулярні

підходи втручання в механізми регуляції біологічної активності клітин і, зокрема, пошуку засобів пригнічення пухлинного росту мають ґрунтуватися на вивченні функціонування сигнальних шляхів, залучених до координованого контролю проліферації.

Одним із ефективних підходів для долання стійкості пухлин до цитостатиків, є пошук і створення нових препаратів, або їх комбінація з низькомолекулярними білками (цитокінами) [67, 224], хімічними сполуками небілкової природи (інгібіторами тирозинкіназ) [130], моноклональними антитілами [523] тощо.

Наразі широко використовуються хіміотерапевтичні препарати алкілюючої дії, які безпосередньо діють на ДНК, порушуючи поділ клітин. Вони є одними з перших протипухлинних препаратів, і які активно на сьогодні застосовуються для лікування більшості видів раку.

1.2. Характеристика цисплатину та його протипухлинна дія

1.2.1. Структура та властивості цисплатину

Цисплатин (*цис*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], *цис*-діаміндихлороплатина (II), CDDP, Cis-Pt) - це металовмісне водорозчинне неорганічне похідне двовалентної платини. У центрі молекули цисплатину міститься атом платини, що з'єднаний у *цис* конфігурації з двома відносно інертними аміногрупами та двома лабільними хлорними групами (Рис. 1.1).

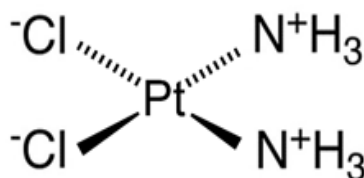


Рис. 1.1. Структура молекули цисплатину

Цисплатин є інертною молекулою, розчиняється у фізіологічному середовищі та може накопичуватися у клітині [314]. Всередині клітини цисплатин гідролізується, головним фактором цього процесу є концентрація хлору. У позаклітинному просторі за високої концентрації іонів хлору (~ 100 мМ) молекули цисплатину не гідролізуються, однак після надходження препарату всередину клітини, де концентрація хлору є значно нижчою (~ 2-20 мМ), відбувається гідроліз однієї чи обох хлорних груп з утворенням $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ або $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Гідратований цисплатин є високоефективним електрофілом, що легко взаємодіє з різноманітними нуклеофільними групами нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) та молекулами мембранних фосfolіпідів, а також з усіма цистеїн-вмісними пептидами, зокрема, відновленим глутатіоном (GSH) та металотіонінами [115, 185].

1.2.2. Застосування цисплатину у хіміотерапії і розвиток побічних ефектів

Цисплатин вперше був синтезований та охарактеризований у 1845 році італійським хіміком М. Пейроне, однак його клінічне застосування у протипухлинній терапії почалось лише у кінці 1970-х років. Наразі цисплатин використовується у клінічній практиці для лікування пухлин багатьох локалізацій, а саме раку легень, молочної залози, шлунка, стравоходу, шийки матки, яєчників, сечового міхура, передміхурової залози, меланому, ходжкінської та неходжкінської лімфом, нейробластоми тощо [534, 442].

Незважаючи на високу ефективність платинових препаратів щодо злоякісно трансформованих клітин, цисплатин є токсичним препаратом, який спричиняє побічні ефекти на організм хворих, що обмежує його застосування у протираковій хіміотерапії. Виявлено цисплатин-індуковану нефротоксичність [337], нейротоксичність [207], кардіотоксичність [257], гепатотоксичність [384], пульмотоксичність [258], гематотоксичність [29, 36, 305, 317, 322, 361, 488, 508] і ототоксичність з втратою слуху [409], що зумовлено безпосереднім ушкодженням нейронів, міоцитів, гепатоцитів, епітеліальних клітин тощо. Посилення запальних процесів у нирках, печінці та серці призводить до

ушкодження судин та структури органів, що, у свою чергу, супроводжується розвитком хронічних захворювань органів і порушенням нормального функціонування організму загалом. Окрім того, побічні ефекти платиновмісних сполук супроводжуються зниженням вироблення кістковим мозком клітин крові (мієлосупресія) та ослабленням імунітету організму (імуносупресія) [172, 248, 314].

Для підвищення терапевтичного індексу цисплатину та зниження токсичності, на сьогодні синтезовано більше 3000 платинових похідних (карбоплатин, оксалиплатин та ін.), однак такі похідні, хоча і характеризуються більш тривалим терміном виведення з організму, мають знижений біологічний потенціал у лікуванні пухлинних захворювань [66].

Значний інтерес у дослідників викликають молекулярні механізми цитотоксичної дії цисплатину, шляхи проникнення сполуки в клітину та виведення у позаклітинний простір.

1.2.3. Шляхи надходження цисплатину у клітину та механізми дії

Відомо, що цисплатин проникає у клітину шляхом пасивної дифузії, шляхом безрецепторного ендоцитозу та активного транспорту [88, 115]. Пасивна дифузія цисплатину є одним з основних шляхів потрапляння цитостатика в клітину, особливо за високої концентрації цисплатину у позаклітинному просторі [102, 115].

Активний транспорт цисплатину до цитозолу може відбуватись за участі транспортерів міді CTR1. Припускається, що метіонін- та гістидин-збагачені домени транспортеру, що зв'язують Cu^+ , є і сайтами зв'язування Pt. Також показано, що утримання на плазматичній мембрані клітини градієнта натрію є необхідною умовою ефективної акумуляції цисплатину, тому припускається, що проникнення цисплатину залежить і від роботи Na^+/K^+ -АТФази. Існують дані про те, що до транспорту цисплатину залучені також SLC (solute carrier importers) транспортери, функціонування яких залежить від градієнта натрію та активності Na^+/K^+ -АТФази, а також OCT1–3 транспортери (organic cation transporters) [88, 102].

Одними зі шляхів виведення цисплатину у позаклітинний простір є виведення за участі АТФ – залежного транспортера міді АТР7А/В та представників родини АВС транспортерів - АВСС1 (MRP1) та АВСС2 (MRP2) [102, 321]. Крім того, цисплатин зв'язуючись з глутатіоном також може виводиться з клітини через MRP1/GS-X помпу, або MRP2/GS-X помпу (помпи виведення глутатіону) [120, 321].

Основною внутрішньоклітинною мішенню цисплатину є ДНК. Гідратоване похідне цисплатину утворює ковалентні зв'язки з гуаніном та аденіном у N⁷ позиції, що знаходяться у великій борозенці і є найбільш реакційними нуклеофільними сайтами ДНК [66, 414] (Рис. 1.2).

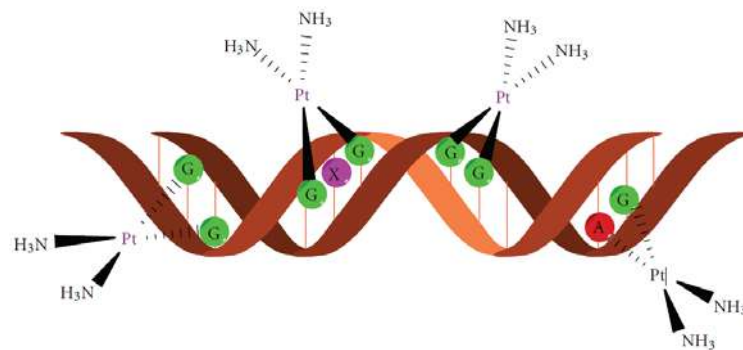


Рис. 1.2. Схема утворення ДНК-платинових аддуктів між гуаніном та аденіном

За механізмом дії цисплатин подібний до алкілюючих агентів, його цитотоксичний ефект пов'язують з утворенням переважно 1,2-d(GpG) внутрішньоланцюгових поперечних зшивок в ДНК [414]. Саме такі зшивки не піддаються дії репаруючих систем, перешкоджають транскрипції та блокують реплікацію [66].

У злоякісно трансформованих клітинах цисплатин спричиняє вибіркове і стійке гальмування синтезу ДНК і, відповідно, поділу та розмноження. Встановлено, що злоякісно трансформовані клітини є чутливішими до дії препарату, ніж нормальні. Цитокінетичні характеристики свідчать, що найчутливішими до дії цисплатину є клітини у S-фазі, а за високих доз препарату - у G2-фазі клітинного циклу [115].

Цисплатин може спричиняти клітинну загибель шляхом апоптозу та некрозу. Його застосування у високих концентраціях (> 100 мкМ) найчастіше призводить до некрозу через надлишкове ушкодження ДНК, що індукує гіперактивацію полімерази полі(АДФ-рибози), розщеплення NAD^+ , спустошення пулу $\text{NAD}^+ / \text{АТФ}$ клітини та зниження рівня АТФ [66, 314]. Тоді як у низьких концентраціях (≤ 100 мкМ) цитостатик індукує загибель клітин шляхом апоптозу. У роботі [338] показано, що за інкубації клітин раку яєчників з цисплатином у концентраціях від 0,5 до 10 мкМ, найбільший відсоток апоптичних клітин у популяції спостерігається за концентрації цитостатика 10 мкМ.

Раніше вважалось, що антипроліферативний ефект цисплатину залежить від кількості ушкодженої ДНК у S фазі клітинного циклу, але сьогодні показано, що інгібуючий вплив цитостатика на синтез ДНК не є вирішальним фактором у прояві цитотоксичної дії препарату. Згідно літературних даних [94, 138, 531], приблизно 5% від акумульованого цисплатину зв'язуються з ядерною ДНК, тоді як решта взаємодіє з позаядерними мішенями.

Оскільки мітохондрійна ДНК не захищена гістонами, вона також може утворювати аддукти з гідратованим похідним цисплатину. Внаслідок утворення аддуктів цисплатину з мітохондрійною ДНК у положеннях 8-ОН dG чи 8-охо dG порушується функціонування дихального ланцюга мітохондрій та енергетичний обмін, активуються механізми клітинної загибелі [106].

Розглядаючи позамітохондрійні шляхи цитотоксичного впливу цисплатину, варто зазначити, що у цитоплазмі є багато клітинних компонентів, що мають потенціальні нуклеофільні сайти зв'язування з цисплатином. Це насамперед трипептид глутатіон, що присутній у клітині у значній концентрації (0,5-10 мМ) та металотіоніни – цистеїн-збагачені протеїни, що складаються з 61 – 68 амінокислотних залишків, з яких 20 це цистеїн [88]. Цисплатин може зв'язуватись також із SH-групами цистеїнових і метіонінових залишків та з атомами нітрогену залишків гістидину у складі ензимів та рецепторів і у такий спосіб змінювати їх активність [106, 115, 172].

Варто відмітити вплив цитостатика на активність НАДФН-оксидаз [313]. У роботі [237] продемонстровано, що цисплатин спричиняє зростання рівня АФК у клітинах раку передміхурової залози, що призводить до мутації генів таких ізоформ NOX як *NOX1*, *NOX2* та *NOX3*. Цисплатин може активувати NOX і опосередковано, через залучення фактора некрозу пухлин - TNF- α та ERK-залежні сигнальні шляхи. У роботі [259] на клітинах нейробластоми людини було показано, що цисплатин-індукована активація TNF- α та ERK спричиняє підвищення експресії мРНК NOX1 та NOX4, а також активацію субодиниць p47^{phox} та p67^{phox} NOX1 та їх транслокацію до плазматичної мембрани.

Показано, що цитостатик може впливати на активність потенціал-залежних Ca²⁺ каналів ПМ або IP3-рецепторів ЕПР, спричиняючи підвищення концентрації цитозольного Ca²⁺ [171] та стрес ендоплазматичного ретикулу (ЕПР) [168, 318, 515].

Однак, незважаючи на хіміотерапевтичний ефект цисплатину, його використання у лікуванні пухлинних захворювань обмежується розвитком резистентності пухлинних клітин до препарату.

1.2.4. Механізми розвитку резистентності до цисплатину

Розвиток резистентності пухлинних клітин до цисплатину відбувається за декількома механізмами: зменшення акумуляції препарату шляхом інгібування проникнення та активації виведення цисплатину; зниження токсичності препарату внаслідок дії внутрішньоклітинних тіолів; посилення роботи систем репарації ДНК; мутації сигнальних протеїнів [102, 185, 238, 263].

Зменшення внутрішньоклітинної акумуляції препарату. ABC - транспортери (ATP-binding cassette) є суперродиною протеїнів, що мають АТФ-зв'язувальний домен та функціонують як помпа, що викачує з клітини різноманітні за будовою субстрати - амінокислоти, антибіотики, ліпіди, солі жовчних кислот, нуклеотиди [250, 336]. За нормальних умов ці транспортери захищають клітину від токсичних ксенобіотиків та ендогенних метаболітів, однак, у пухлинних клітинах їх активність підвищена [443]. Показано, що

розвиток резистентності пухлинних клітин до дії цитостатиків обумовлений насамперед посиленою активністю транспортерів родини ABC [321, 511]. Найбільш важливими представниками цих транспортерів є ABCB1 та ABCC1 протеїни, інша назва Р-глікопротеїни та MRP-1 (multidrug resistant protein – 1) відповідно [129, 286].

Ефективність виведення цисплатину з пухлинних клітин значною мірою залежить від функціонування транспортерів таких підродин ABCC як ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2) та ABCC4 (MRP4), а також ABCC7 (CFTR), який на відміну від інших ABC транспортерів, функціонує як канал, що регулює потік йонів хлору у клітини. Зниження вмісту цитостатику у цитозолі пухлинних клітин забезпечується також іншими транспортерами - АТР7А/В (транспортер міді), АQP2 та АQP9 (представники аквапоринів) [262, 321, 511].

Показано, що розвиток резистентності клітин раку шийки матки до оксаліплатину та цисплатину супроводжується підвищенням експресії та зниженням рівня N-глікозилювання білків MRP1 та MRP4, які знижують акумулювання платинових препаратів [446].

На лініях клітин гепатоми 7404, що відрізняються за чутливістю до цисплатину, показано, що акумуляція міченого радіоактивним ізотопом цисплатину є часо-, температуро- і енергетично-залежною, але у резистентних клітин 7404-CP20 є послабленою порівняно з чутливими клітинами 7404 [446]. Таке зниження проникнення пояснюється, по-перше, пригніченням експресії гена транспортера міді - *CTR1*, відповідального за входження препарату в клітину [446], по-друге, надекспресією ізоформ АТФ-залежного транспортера міді – АТР7А та АТР7В, відповідальних за виведення Cu^{2+} [455].

Порушення ендоцитозу є ще одним механізмом обмеження надходження цисплатину до клітини. Показано, що процес ендоцитозу (піноцитозу) у резистентних до цисплатину клітинах КВ раку передміхурової залози є дефектним. У роботі [446] виявлено порушення ендоцитозу у резистентних до дії цисплатину клітинах КВ-CP.5, які пов'язують зі змінами у кількості та розміщенні мікротрубочок у плазматичній мембрані.

Участь глутатіону у розвитку стійкості до цисплатину. Завдяки наявності SH- груп цисплатин може зв'язуватись з глутатіоном, внаслідок чого попереджається зв'язування препарату з іншими нуклеофілами клітини та з ДНК. У пухлинних клітинах відмічено підвищений рівень GSH, що зумовлено посиленою експресією GCS – γ -глутамілцистеїн синтетази [455]. На клітинах карциноми сечового міхура KU7 та карциноми гортані Her2 показано, що зв'язування цисплатину з глутатіоном спричиняє детоксикацію цитостатика [106]. У клітинах HeLa раку шийки матки та клітинах Me665/1 меланоми виявлено підвищення експресії глутатіон трансферази, що пояснюють зниженням чутливості цих клітин до дії цисплатину [106]. Утворений комплекс цисплатин - GSH може виводитись з клітини за допомогою двох представників родини MRP - MRP2/cMOAT та MRP1/GS-X [106, 120, 455].

Репарація цисплатин–ДНК аддуктів. Ексіцизійна репарація нуклеотидів (NER - nucleotide excision repair) в ушкоджених ділянках ДНК є одним з основних механізмів захисту пухлинних клітин від дії цисплатину. NER є АТФ-залежним мультипротеїновим комплексом, що впізнає утворені цисплатином 1,2 – внутрішньоланцюгові поперечні зшивки та вирізає ушкоджену ділянку ДНК у розмірі від 27 до 29 пар олігонуклеотидів [115]. Утворена прогалина у структурі ДНК заповнюється за допомогою ДНК полімерази. Показано, що у резистентних до цисплатину пухлинних клітинах активність системи NER є підвищеною [66, 185, 263].

Отже, цисплатин характеризується широким спектром протипухлинної дії та високим терапевтичним індексом, однак його ефективність для лікування злоякісних новоутворень є обмеженою внаслідок прояву побічної дії (нефро-, гепато-, кардіотоксичності тощо) та розвитку стійкості пухлинних клітин до препарату. Цисплатин є цитостатиком, що володіє антипроліферативною дією шляхом пошкодження ДНК та утворення ДНК-платинових аддуктів. Проте, більша частина акумульованого пухлинними клітинами цисплатину діє на позаядерні мішені.

Припускають, що одним з підходів до підвищення терапевтичної дії цисплатину, зниження його побічних ефектів та подолання резистентності до

цитостатика є їх комбінація з наночастинками різної хімічної природи та різними механізмами дії [201, 315]. Комбіноване застосування хіміопрепаратів із наночастинки дозволить також використовувати їх як носії для доставки ліків з метою посилення ефекту проникнення і накопичення хіміопрепарату у пухлинній тканині.

1.2.5. Використання та застосування нанорозмірних носіїв для спрямованої доставки протипухлинних препаратів

Широкого вивчення та застосування у медико-біологічних дослідженнях набули наночастинки металів, наприклад, оксиду заліза як феромагнетик [246], срібла, золота, міді, кобальта [1, 43, 75, 282, 415]; біополімерні наночастинки - хітозан, алгінат, целюлоза, ліпосоми, міцели [77]; природні алкалоїди – вінкрисин, берберин, кверцетин, куркумін, таксани [377, 418]. Розробка нових підходів медикаментозної терапії з використанням наночастинок, зокрема, у створенні систем спрямованої доставки протипухлинних препаратів у клітини-мішені, є перспективним напрямком нанобіотехнології.

Платино-вмісні препарати було модифіковано різними наночастинками, зокрема, органічними (біополімери, полімерні кон'югати, міцели, ліпосоми) та неорганічними (вуглецеві нанотрубки, оксид заліза, золота та кремнезему) [152].

Цисплатин є гідрофільною молекулою, з двома додатковими координаційними ділянками, що сприяє його хімічній модифікації. Цисплатин може утворювати комплекси із наночастинками шляхом заміщення через атоми хлору. Так, наночастинки було приєднано до цисплатину за допомогою карбоксильної групи [526, 495].

Кон'югати наночастинка-цисплатин виявляли вищу протипухлинну активність і зменшували побічні ефекти у порівнянні з окремою дією цисплатину, сприяли проникненню препарату в цисплатин-резистентних клітинах шляхом ендоцитозу [169, 204, 299, 333, 340, 351, 495].

Цисплатин широко використовується у комбінованій терапії з іншими хіміопрепаратами. Так, міцели, завантажені паклітакселем та цисплатином,

виявляли протипухлинну активність щодо клітин A549 раку легенів людини *in vitro* та *in vivo* [461.].

Однак, функціоналізація цисплатину призводить до змін властивостей, розчинності, стабільності та біологічної активності молекули. Існує складність підтримання балансу стабільності і стійкості комплексу наночастинка-цисплатин позаклітинною та застосуванням *in vivo*.

Терапевтична ефективність препарату Cis-Pt є суттєво обмежена високою токсичністю, розвитком резистентності у пухлинних клітин до дії цитостатика та неселективним розподілом препарату між нормальною та пухлинною тканинами. З метою подолання цих обмежень, а також спрямованої доставки та дії хіміопрепарату саме на пухлинні клітини може бути використана наноструктура карбону, зокрема, C₆₀ фулерен.

1.3. C₆₀ фулерени як новий клас біологічно-активних карбонових наноструктур

1.3.1. Структура, властивості та біодоступність C₆₀ фулерену

Пошук нових нанорозмірних хімічно-інертних сполук, здатних впливати на процеси у клітині, є актуальним завданням розвитку сучасних нанобіотехнологій. Значний науковий інтерес викликають карбонові наноструктури, зокрема C₆₀ фулерен та його похідні, для практичного використання у біології і медицині з метою спрямованої доставки медикаментозних засобів та тераностики [195, 342].

Структура молекули. Фулерени є третьою алотропною формою карбону, яку було відкрито у 1985 році [272]. Форма молекули фулерену є абсолютно унікальною для природніх молекул, являючи собою симетричну сферу, що складається із парної кількості атомів вуглецю – 60, 70, 76, 78, 82 і т.д. [35]. Особливе місце серед фулеренів посідає молекула C₆₀, що має найвищий ступінь симетрії, легко синтезується, характеризується високою хімічною стабільністю та унікальними фізико-хімічними властивостями.

C_{60} фулерен - це замкнена молекула сферичної форми, поверхня якої складається з 20 правильних гексагональних і 12 пентагональних структур, що об'єднані кон'югованою π -електронною системою (Рис. 1.3).



Рис. 1.3. Структура молекули C_{60}

Зв'язки між сусідніми гексагонами (завдовжки 1,35 Å) є подвійними, а зв'язки між гексагонами та пентагонами (завдовжки 1,47 Å) – одинарними, що і пояснює компактне укладання атомів вуглецю, малі розміри молекули та її властивості [272, 503]. Так, площа поверхні молекули C_{60} утричі менша, ніж очікувана для біологічної молекули такої самої молекулярної маси (720 Да), а її діаметр становить лише 0,714 нм, тобто за величиною є близьким до діаметра α -спіралі поліпептидів або молекули стероїдів. Це дає підстави припустити, що стерично молекула C_{60} є цілком сумісною з біологічними структурами, наприклад, упізнавальними сайтами рецепторів або активними центрами ензимів.

У зв'язку з цим на особливу увагу заслуговують дані щодо пригнічення C_{60} фулереном протеази ВІЛ. Просторова організація активного центру цього ензиму відома – це гідрофобна западина з розміщеними на відстані 0,5 нм залишками Асп-25 та Асп-125, які беруть участь у гідролітичному розщепленні пептидного зв'язку субстрату [456]. Діаметр каталітичної западини дорівнює 1 нм, тобто відповідає діаметру молекули C_{60} . Дані молекулярного моделювання передбачали, що в разі Ван-дер-Ваальсової взаємодії між ними доступ до активного центру ензиму буде блоковано. Дійсно, було синтезовано похідні C_{60} , які пригнічували активність протеази ВІЛ в інфікованих моноцитах та лімфоцитах крові [435].

Хімічні властивості. Немодифіковані C_{60} фулерени є ліпофільними молекулами, вони нерозчинні у полярних розчинниках, зокрема у воді чи метанолі, краще розчиняються в аліфатичних і є максимально розчинними в ароматичних вуглеводнях, таких як толуол та бензол [150]. Завдяки гідрофобним властивостям молекула C_{60} може вбудовуватись у біологічні мембрани та локалізуватись у неполярних ділянках мембранних структур [174]. Фулереновий каркас є жорстким, і циклогексатрієнові одиниці у його структурі залишаються пласкими, незважаючи на істотне відхилення геометрії спряжених подвійних зв'язків від нормальної планарної. Напруга, що виникає внаслідок такого відхилення, є причиною високої реакційної здатності C_{60} фулеренів. Молекула C_{60} є досить сильний електронний акцептор, здатний приєднувати 1–6 електронів з утворенням відповідних аніонів $C_{60}n$ (де n - кількість приєднаних електронів) [513]. Висока спорідненість до електронів пояснюється тим, що після приєднання двох електронів нестійка $4n$ π -електронна система циклогексатрієнових одиниць на поверхні молекули C_{60} переходить у стабільну ароматичну $(4n+2)$ систему [503]. Отже, подвійні зв'язки в каркасі молекули C_{60} є електронодефіцитними, що й зумовлює електронакцепторні властивості молекули та її здатність легко приєднувати реагенти, що містять неспарений електрон (вільні радикали). C_{60} фулерен інколи називають «губкою для радикалів». Так, у роботі [273] показано, що одна молекула може приєднати 34 метильні радикали. Завдяки такій здатності фулерени діють у біологічних системах як уловлювачі вільних радикалів, зокрема гідроксильного та супероксид-аніону.

Оскільки гіперпродукція кисневмісних радикалів є причиною виникнення багатьох клінічних патологій, антирадикальна активність C_{60} фулеренів та їхніх похідних відкриває перспективи застосування цих сполук як антиоксидантів.

Фізичні властивості. C_{60} фулерену притаманне інтенсивне оптичне поглинання світла в діапазоні дальнього (220 нм) та ближнього (265 та 345 нм) ультрафіолету та менш інтенсивне у видимому (450 та 600 нм) діапазоні (Рис. 1.4) [431].

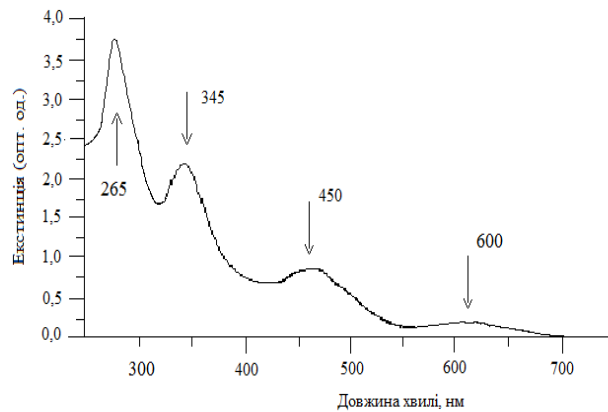
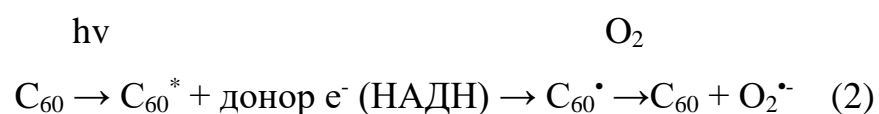
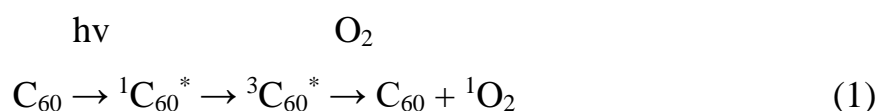


Рис. 1.4. Спектр оптичного поглинання C_{60} фулерену у водному колоїдному розчині

Унікальною властивістю молекули C_{60} є здатність переходити під дією випромінювання світла у збуджений стан та майже зі 100%-ю ефективністю продукувати активні форми кисню (АФК) - синглетний 1O_2 та супероксиданіон O_2^- [12, 110, 339, 363]. Після поглинання світла молекула C_{60} переходить у синглетний стан ($^1C_{60}^*$), час існування якого у водних розчинах становить близько 1,3 нс [78]. Основним механізмом розпаду синглетів фулерену є перехід у збуджений триплетний стан ($^3C_{60}^*$), час існування якого в розчинах є більш тривалим - 50-130 мкс. Для виявлення фотоактивності C_{60} молекули у клітинах визначальним є час існування триплету $^3C_{60}^*$. Оскільки в'язкість цитоплазми є набагато вищою, ніж в'язкість водних розчинів, припускають, що ефективними продуцентами АФК у клітині можуть бути лише триплету з періодом існування ≥ 100 мкс [137]. На сьогодні виділяють два шляхи продукування АФК C_{60} фулеренами після фотозбудження - за механізмом передачі енергії (1) або ж за механізмом передачі електронів (2) від фотозбудженої молекули C_{60} на молекулу O_2 [344, 518]:



Згідно першого механізму у разі зворотнього переходу молекули фулерена зі збудженого триплетного стану у вихідний вивільнена енергія передається на молекулярний кисень з утворенням синглетного кисню. Згідно другого механізму за наявності у середовищі донорів електронів (наприклад, НАДН або амінних груп) збуджена молекула фулерену, яка є сильнішим акцептором електронів, аніж незбуджена, взаємодіє з донорами електронів і перетворюється на аніон-радикал, який передає електрон на молекулярний кисень з утворенням супероксидного аніон-радикалу. Припускається, що у полярних біологічних системах механізм перенесення електронів є більш імовірним, ніж перенесення енергії, тому домінуючим буде процес утворення супероксиданіону, який є ініціатором реакцій утворення H_2O_2 та гідроксилрадикала $\cdot\text{OH}$.

У літературі існує низка даних щодо фототоксичної дії C_{60} фулерену та його похідних на пухлинні клітини в системах *in vitro* та *in vivo*. Так, за умови фотоактивації C_{60} фулерени спричиняли цитотоксичний ефект щодо клітин АКЕ (асцитної карциноми Ерліха) [110], HeLa [228], Hep-2 (раку гортані людини) [332], фібросаркоми ліній HT1080 [81] та RIF-1 [331].

Кон'югат C_{60} -поліетиленгліколь [472] та похідне C_{60} – TPP/PVP/ C_{60} (5,10,15,20-тетра-(4-феніл)-порфірополівінілпіролідин- C_{60}) у щурів-пухлиноносіїв з карциномою Walker 256 [234] після опромінення у видимому діапазоні світла пригнічували ріст пухлин внаслідок окисного стресу.

Таким чином, притаманні C_{60} фулеренам нанорозмірність, просторова тривимірність структури, хімічна стабільність, гідрофобність, унікальні фотофізичні властивості свідчать про перспективність застосування їх у біології та медицині. Проте основною перешкодою на цьому шляху є нерозчинність C_{60} у воді, що обмежує їх біодоступність. Внаслідок агрегації молекул C_{60} у водному розчині значно знижується їхня реакційна здатність. Актуальним є пошук оптимальних шляхів введення фулеренів C_{60} у біологічні системи.

Способи підвищення біодоступності C_{60} фулеренів. Для підвищення розчинності фулеренів у водному середовищі застосовують декілька методичних підходів. По-перше, це солюбілізація молекул C_{60} з використанням

полівінілпіролідолу [519], тетрагідрофурану [140], диметилсульфоксиду [423] чи ліпосом [292]. По-друге, отримання гідрофільних комплексів C_{60} фулеренів з такими компонентами, як циклодекстрини [73, 529], цикловератрилени [416] або каліксарени [235]. Молекули таких комплексів мають форму „корзини”, у якій знаходиться молекула фулерену.

Досить ефективним методом підвищення гідрофільності молекули C_{60} є модифікація гідрофобного кору поверхні фулерену шляхом ковалентного приєднання полярних груп до поєднаних подвійними зв'язками атомів вуглецю. На даний момент синтезовано широкий спектр таких моно- і поліфункціональних похідних як карбоксифулерени [154] та полігідроксифулерени [480], сполуки C_{60} з поліетиленгліколем [472], сульфатною кислотою $C_{60}[(CH_2)_4SO_3H]_6$ [125], моносукцинідамідом, D,L – аланіном [95] тощо.

Водорозчинні полімери утворюють донорно-акцепторні комплекси з фулеренами, що дозволяє підвищити біодоступність молекул C_{60} , однак будова комплексів C_{60} -детергент часто є невизначеною, а розчини нестабільними внаслідок формування надмолекулярних структур під час зберігання [519, 378]. Введення замісників у фулереновий кор частково вирішує проблему біодоступності, однак наявність великих функціональних груп, які захищають сфероїд фулерену від води, так само, як і численних замісників на його поверхні, впливають на властивості молекули і можуть знижувати як її антиоксидантний потенціал, так і ступінь взаємодії з біологічними молекулами [137, 205, 206, 211, 309]. Крім того, біологічні властивості немодифікованих фулеренів відрізняються від властивостей їх похідних. Тому було запропоновано метод отримання стабільного водного колоїдного розчину C_{60} фулеренів, який базується на випаровуванні органічного розчинника (толуолу) у вакуумі, після чого суміш чистих C_{60} фулеренів у дистильованій воді обробляли ультразвуком (8 Гц, 8 год) [417, 431]. Такий розчин є молекулярно-колоїдною системою, яка стабільна упродовж 12 місяців, у якому переважно містяться поодинокі молекули, а також їх агломерати діаметром від 12 до 110 нм.

Отже, C₆₀ фулерен та його водорозчинні похідні є біологічно активними наноструктурами, які у незбудженому стані виявляють антиоксидантну активність, а за умови фотозбудження - прооксидантні та цитотоксичні ефекти. Унікальні властивості C₆₀ фулерену і перелічені способи підвищення їх біодоступності відкривають перспективи використання фулеренів C₆₀ у біологічних дослідженнях та медицині.

1.3.2. Біорозподіл C₆₀ фулерену в організмі тварин

Біорозподіл і накопичення C₆₀ фулерену та його похідних в організмі тварин вивчено за введенням через дихальну систему (інгаляційно через носову порожнину або трахею), шкіру (трансдермально), ШКТ (перорально з їжею, водою, ліками, за допомогою зондів у шлунок), внутрішньовенно, внутрішньочеревно та інтраокулярно [84, 109, 121, 156, 182, 187, 191, 222, 244, 253, 254, 277, 341, 349, 352, 353, 452, 454, 468, 481, 512].

C₆₀ фулерен після інгаляційного введення в організм виявлявся в органах дихальної системи, переважно в легенях, а саме в просвіті альвеол і капілярів, в легеневих лімфатичних вузлах [84, 349, 430]. Виведення C₆₀ фулерену з дихальних шляхів відбувалося через 15-18 днів за допомогою так званого мукоциліарного ескалатора миготливих епітеліальних клітин і фагоцитозу альвеолярними макрофагами [182]. C₆₀ фулерен не транспортувався з легень до інших органів і тканин [84, 187, 452].

Ушкодження органів дихальної системи та запальні ефекти у тканині легень спостерігалися після інтратрахеального введення C₆₀ фулерену за високих концентрацій від 2 мг/кг тварини і вище та супроводжувалося підвищеними рівнем нейтрофілів у бронхоальвеолярній рідині (БАР) і експресії цитокін-індукованих хемоаттрактантів нейтрофілів (CINC) [239, 358], активацією імунних процесів, збільшенням кількості клітин з ознаками апоптозу у БАР, посиленням вивільненням протизапальних цитокінів (фактор некрозу пухлини, інтерлейкіни IL-1 та IL-6, Th1-цитокіни, IL-12, і γ -інтерферон) у БАР та кров [372]. Слід відмітити, що через три місяці після внутрішньотрахеального введення карбонової наносполуки не виявлялося

істотних патологічних змін у легенях - ні утворення пухлинних, ні гранульомних форм.

C₆₀ фулерен розчинений у сквалені легко проникав у роговий шар шкіри (епідерміс) людини, але не проходив крізь базальну мембрану і, відповідно, не потрапляв в дермальний шар навіть через 24 годин після введення [253]. Крім того, молекули C₆₀ не проникали в кров через кровоносні судини шкіри. Токсичний ефект фулеренів на шкіру та слизові оболонки очей є малоімовірним.

Існує низка робіт присвячених дерматологічним властивостям фулерену. Так, фулерен не викликав подразнень шкіри (еритеми, кірок, струпів набряків, припухлості) та алергічних реакцій у кроликів, мурчаків та людей після застосуванням у вигляді патчів змочених розчином C₆₀ на шкірі або після закапування слизової оболонки очей [76, 232]. C₆₀ фулерен диспергований у оливковій олії у дозі 40-100 мг не подразнював шкіру кроликів та морських свинок, лише через 1 год після внесення спостерігалось почервоніння кон'юнктиви та гіперемії судин ока, виявлені симптоми зникали через 24 год [159].

Після перорального (внутрішньошлункового) введення C₆₀ фулерени переважно накопичувалися у органах і тканинах шлунково-кишкового тракту (ШКТ), зокрема, у шлунку та тонкому кишечнику, печінці, а також у нирках та селезінці тварин і через 14 днів повністю виводилися з фекаліями [221, 517]. При дослідженні гострої та хронічної токсичності C₆₀ фулерену (2 г/кг) за умови перорального введення не виявлено змін гематологічних та біохімічних показників крові мишей [520], а також патоморфологічних змін в органах та тканинах [156].

Радіоактивно-мічені карбонові наноструктури [¹⁴C]C₆₀, ¹²⁵I-C₆₀ та ¹²⁵I-C₆₀(OH)_x після внутрішньовенного введення тваринам накопичувалися переважно в печінці, селезінці, кістковій тканині, а також у шлунку та крові [109, 244, 353, 517]. Через 72 год після внутрішньовенного введення карбонові наночастинки виводилися із організму тварин із фекаліями (8%) та сечею (82%) [244, 353].

Виявлено вибіркковість накопичення C_{60} фулерену у пухлині за умови внутрішньовенного введення тваринам-пухлиноносіям. Так, $^{125}\text{I}-C_{60}(\text{OH})_x$ (10 мкг) не виявляв спорідненості до нормальних тканин, однак більшою мірою накопичувався та довше утримувався у пухлині, ніж у нормальній тканині (T/N - співвідношення накопичення у пухлинній та нормальній тканинах), зокрема при гепатокарциномі мишей H22 (3,41 T/N), остеосаркомі людини OS732 (1,21 T/N), карциномі легень людини PD (2,46 T/N), раку ободової кишки людини HCT-8 (3,41 T/N) і раку шлунка людини MGC803 (6,26 T/N) [244].

Після внутрішньочеревного введення мікронізований C_{60} та поліалкілсульфонатне похідне $C_{60}((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})_{4-6}$ потрапляли у кровотік і транспортувалися до різних органів і тканин, переважно локалізувалися в печінці, у куперівських клітинах, меншою мірою у гепатоцитах і зірчастих клітинах печінки [191], нирках і селезінці щурів [121]. При накопиченні C_{60} фулерену у печінці структура паренхіми органу була нормальною без ознак запалення або фіброзу, рівень аланінамінотрансферази у сироватці крові тварин відповідав контрольним значенням [191]. Більша частина карбонових наночастинок виводилася з організму тварин із фекаліями через 7 днів після внутрішньочеревного введення.

Похідне C_{60} /ПВП (5-10 г/кг) за внутрішньочеревного введення дорослим щурам чоловічої статі лінії Вістар не спричиняло гострої і субгострої токсичності. Про це свідчить відсутність змін маси органів, гематологічних та біохімічних показників крові, змін у структурі печінки, нирки та селезінки [155, 487]. Тоді як похідне $C_{60}\text{O}_5(\text{OH})_{18}$ та фулеренол $C_{60}(\text{OH})_{22}$ за разового внутрішньочеревного введення мишам дозозалежно впливали на вагу мишей, рівень аланін- та аспартатамінотрансферази, лактатдегідрогенази та азоту сечовини у сироватці, а також вміст цитохромів P450 і b5 та активність мікросомальних ензимів печінки NADPH цитохром P450 редуктази і цитохром P450-залежної монооксигенази [98, 487], а поліалкілсульфонатне похідне $C_{60}((\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na})_{4-6}$ за дози 100 мг/кг у щурів спричиняло розвиток запального процесу у нирках, а саме фаголізосомальну нефропатію [121].

Таким чином, біорозподіл та накопичення C_{60} фулерену в організмі тварин залежить від способів введення. При інгаляційному введенні фулерен накопичується у органах дихальної системи, при внутрішньовенному – у печінці, при внутрішньошлунковому – у органах і тканинах ШКТ, при внутрішньочеревному – у печінці, селезінці, нирках, серці, через певний період фулерен виводиться з організму. C_{60} фулерен транспортується із кровотоком по організму і накопичується переважно у тканинах і органах ретикулоендотеліальної системи. Токсичні ефекти фулеренів *in vivo* є суперечливими, оскільки залежать від способів введення в організм та виявляються за досить високих концентрацій.

1.3.3. Внутрішньоклітинна локалізація C_{60} фулерену

Важливими є питання, яким чином молекули C_{60} взаємодіють із біологічними мембранами, чи проникають всередину клітин, де локалізуються і за якими механізмами транспортуються у/з клітини. Адже взаємодія молекул C_{60} із плазматичними мембранами та їх внутрішньоклітинна локалізація визначає біологічну активність сполуки.

Дослідження мембранотропних ефектів C_{60} фулеренів на модельних біліпідних мембранах (БЛМ) з використанням флуоресцентних міток 16-AP і 2-AS специфічних до гідрофобного кору і полярних ділянок бішару [493], а також мало-кутового розсіювання нейтронів і рентгено-структурного аналізу [149] показали, що молекула C_{60} локалізується у гідрофобних ділянках дипальмітоїлфосфатидилхолінового та пальмітоїлолеоїлгліцерофосфохолінового бішарів відповідно.

Згідно результатів дослідження дифузії молекул C_{60} *in silico* через диміристоїлфосфатидилхоліновий бішар розраховані показники вільної енергії знижувалися, що свідчить про перехід молекули C_{60} з водної фази у гідрофобне середовище бішару та безбар'єрне проникнення в бішар [91].

Молекулярна динаміка транслокації фулерену C_{60} підтвердила його проникнення через диолеїлфосфатидилхоліновий бішар упродовж мікросекунди [507] та дипальмітоїлфосфатидилхоліновий бішар через

транзієнтні мікропори упродовж декількох мілісекунд, а адсорбція молекул C_{60} у бішарі відбувається за рахунок гідрофобної взаємодії між C_{60} і хвостами жирнокислотних залишків у складі гліцерофосфоліпідів [405].

Таким чином, молекули C_{60} здатні взаємодіяти біліпідними мембранами, проникати крізь бішару та локалізуватися у його гідрофобних ділянках.

Накопичення C_{60} фулеренів та їх похідних продемонстровано у клітинах різного гістогенетичного походження, зокрема, у кератиноцитах HaCaT людини і клітинах A549 карциноми легень людини [226], фібробластах [174], макрофагах RAW 264.7 миші [382, 424], іморталізованих MCF10A та злоякісних MDA і MB231 клітинах молочної залози людини [288], клітинах Hep3B і Huh7 [413] та RH-35 [291] раку печінки, лейкозних клітинах Jurkat [411], клітинах HeLa раку шийки матки [228] тощо .

Характерних відмінностей внутрішньоклітинної локалізації C_{60} фулеренів та їх похідних у нормальних та злоякісних клітинах не виявлено. Так, локалізацію фулеренів було зафіксовано у різних компартментах клітин, зокрема немодифіковані C_{60} фулерени виявлено у цитоплазмі кератиноцитів HaCaT людини [226], карбоксифулеренів - у цитоплазмі і мітохондріях кератиноцитів людини [127], C_{60} фулеренів диспергованих у тетрагідрофурані - на плазматичній і ядерній мембранах, у цитоплазмі та внутрішньоклітинних компартментах (ядрі, лізосомах, мітохондріях, рибосомах і ендоплазматичному ретикулумі) макрофагів [383], тербій-ендоедральних C_{60} фулеренів - в ядерній мембрані макрофагів RAW 264.7 мишей [424], водорозчинного міченого похідного $[^{14}C]-C_{61}(CO_2H)_2$ - в мітохондріях фібробластів нирок мавпи [174], C_{70} фулеренів - в ЕПР, мітохондріях та лізосомах мастоцитів людини [142], кон'югату C_{60} -ПЕГ - в цитоплазмі та перенуклеарній ділянці фібробластів DUMS16 та клітин фібросаркоми HT1080 людини [81], кон'югату C_{60} -ser-PF - у цитозолі та ядрі клітин ліній Hep3B і Huh7 раку печінки людини [423].

Показано, що C_{60} фулерени швидше поглиналися та накопичувалися злоякісно трансформованими клітинами, зокрема кон'югат C_{60} -ПЕГ через 3 год у 2,4 рази ефективніше накопичувався у клітинах фібросаркоми HT1080 порівняно з нормальними фібробластами [81]. Виявлена відмінність може

пояснюватися тим, що пухлинні клітини характеризуються високим рівнем експресії ліпопротеїнів низької щільності, активацією рецептора епідермального фактора росту та високою фагоцитарною активністю, що сприяє кращому поглинанню і акумулюванню карбонових наночастинок [223, 460].

Припускається, що механізмами внутрішньоклітинного проникнення C_{60} фулеренів є пасивний транспорт через канали чи пори [405], активний транспорт за допомогою клатрин-залежного [174, 291], або кавеол-опосередкованого [295, 424] ендоцитозу, а також фагоцитозу [81].

Отже, C_{60} фулерени здатні не лише вбудовуватися у ліпідний матрикс штучних мембран, але й проникати крізь плазматичні мембрани та локалізуватися всередині клітин різного походження. Внутрішньоклітинна локалізація карбонових наноструктур не залежала від гістогенезу клітин, однак фулерен довше утримувався у цитоплазматичних компартментах зляккісно трансформованих клітин.

1.3.4. Біологічна активність C_{60} фулерену

Біологічну активність C_{60} фулеренів досліджено переважно на ковалентно модифікованих їх похідних та з достатньо високим ступенем розчинності у водному середовищі. Біологічні ефекти C_{60} фулеренів *in vitro* виявляються у діапазоні концентрацій нижче 100 мкМ і переважно є позитивними. Так, C_{60} фулерени та їх похідні впливали на процеси проведення регуляторних сигналів у клітинах різних типів. Так, карбоксифулерен, взаємодіючи з плазматичною мембраною (ПМ) клітин гепатоми людини, пригнічував продукцію АФК, спричинену фактором некрозу пухлини $TNF-\beta$, та запобігав апоптозу у клітинах [230]. Полігідроксифулерен $C_{60}(OH)_{7\pm 2}$ стабілізував мембранний потенціал мітохондрій та попереджав фрагментацію ДНК у макрофагах лінії RAW 264.7 мишей за окисного стресу, спричиненого дією NO або H_2O_2 [124, 356]. Фулеренол виявляв нейропротекторну дію, дозозалежно знижуючи вихід іонів Ca із клітин PC12 нейронів, індукований дією нейротоксина амілоїдного β -пептида [229].

Цитотоксичність C₆₀ фулеренів виявлялася за високих концентрацій (> 100 мкМ) та супроводжувалася продукцією АФК як у нормальних HaCaT клітинах (кератиноцитах людини), фібробластах шкіри людини, астроцитах, так і у злоякісно трансформованих клітинах, зокрема, A549 карциноми легені та печінки людини, L929 фібросаркоми, C6 та U251 гліоми, HeLa карциноми шийки матки [213, 226, 228, 236, 429], ушкодженням плазматичних мембран шляхом інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів, деполаризацією мітохондрій та підвищенням внутрішньоклітинної концентрації Ca²⁺ у кератиноцитах, фібробластах, а також клітинах фібросаркоми та меланоми B16 [190, 268, 323], індукцією апоптозу у ендотеліальних клітин пупкової вени людини (HUVECs) [190], клітинах BHR-21 нирок новонародженого хом'яка [303], клітинах лейкозу PEL [501] та HL-60 [354].

Крім того, виявлено вибірковість пошкоджувальної цитотоксичної дії C₆₀ фулеренів. Так, 140 мкМ C₆₀ фулерен через 72 год не впливав на життєздатність первинних гепатоцитів щура, тоді як життєздатність клітин гепатоми людини HepG2 та щура dRLh-84 знижувалася на 55 та 25% відповідно [450]. 72 мкМ C₆₀ фулерен через 48 год не впливав на виживаність фібробластів шкіри HDF та кератиноцитів людини NTCC 2544, тоді як життєздатність клітин фібросаркоми L929 та меланоми B16 мишей значно знижувалася [323].

Захисні ефекти C₆₀ фулерену. Значну зацікавленість дослідників привертають захисні ефекти C₆₀ фулеренів, оскільки карбонові наноструктури володіють антиоксидантними властивостями [15, 17-18, 52, 191, 497, 503]. Антиоксидантний потенціал деяких модифікованих C₆₀ фулеренів за величиною є не нижчим, ніж у хінона, аскорбінової кислоти або вітаміна E [153, 475, 483, 503]. Так, при порівняльному дослідженні антиоксидантних властивостей, показано, що фулеренол діяв у діапазоні концентрацій (10⁻⁶-10⁻⁴ М) нижчому, порівняно із відомим антиоксидантом аскорбіновою кислотою (10⁻⁴-10⁻² М), та виявляв кращі захисні ефекти щодо клітин гладеньких м'язів (A7r5 аорти щура та CASMC коронарної артерії людини) і лімфоцитів людини (SEM) [311].

C_{60} фулерен та його похідні виявляли захисні ефекти від окисного пошкодження спричиненого надмірною продукцією АФК, після дії ультрафіолетового опромінення та цитостатиків. Так, наразі існує низка даних про здатність C_{60} фулерену та його похідних виявляти захисний ефект за рахунок нейтралізації гідроксильних та супероксидних аніон-радикалів [85, 365, 395, 489]. З використанням методу ЕПР було продемонстровано здатність фулерену $C_{60}(OH)_{22}$ дозозалежно інгібувати сигнал вільнорадикальної мітки DPPH (2,2-дифеніл-1-1-пікрилгідразил) [148]. Антиоксидантний ефект немодифікованого C_{60} фулерену [5, 395] та розчиненого у полівінілпіролідоні [161] показано на попередньо оброблених пероксидом водню тимоцитах щура та клітинах MA-104 нирки мавпи відповідно.

Захисний ефект карбоксифулерену та погідроксифулерену від індукованого ультрафіолетовим опромінення продукуювання АФК та ушкодження ДНК було продемонстровано на кератиноцитах людини [127, 426].

Існують літературні дані щодо зниження C_{60} фулереном токсичної дії протипухлинних препаратів на нормальні клітини та тканини. Так, C_{60} фулерен *in vitro* знижував токсичний вплив доксорубіцину на гепатоцити [388] і клітини нирок [408]. В експериментах *in vivo* C_{60} фулерен знижував токсичні ефекти доксорубіцину у тканині легень і печінки щурів [462] та печінки і серця у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс [393].

Механізмом антиоксидантної дії C_{60} фулерену може бути взаємодія АФК із системою кон'югованих подвійних зв'язків на поверхні його молекули, що супроводжується приєднанням e^- , переходом нестійкої $4n$ π -електронної системи у стабільну $(4n+2)$ систему та утворенням стабільного радикала C_{60}^{\cdot} . Молекулярний механізм за яким молекула C_{60} вловлює $O_2^{\cdot-}$ є подібним до механізму дії СОД [71, 125, 367]. Радикал легко зв'язується з електронно-дефіцитною ділянкою поверхні молекули C_{60} , в результаті чого електрон переноситься на решітку фулерену. Після зв'язування другого супероксидного аніон-радикалу з сусідньою електронно-дефіцитною ділянкою на поверхні молекули C_{60} індукується руйнування $O_2^{\cdot-}$, продукуювання пероксиду водню і регенерація оригінальної молекули фулерену. На початковому етапі процесу

дезактивації синглетний кисень ($^1\text{O}_2$) приєднується до фулерену і формується заряд-трансферний комплекс [265]. Вловлювання більш реактивних радикалів, таких як HO^\cdot є більш простішим ніж стехіометричне приєднання радикалів до електронно-дефіцитної ділянки поверхні молекули [92, 273].

Отже, C_{60} фулерен та його похідні є біологічно активними наноструктурами, які володіють антиоксидантною активністю та вибірковістю токсичної дії щодо злякано трансформованих клітин, що відкриває перспективи його використання для розробки нових підходів медикаментозної терапії.

1.3.5. Протипухлинна активність C_{60} фулерену у комбінації з хіміопрепаратами

Незважаючи на високу терапевтичну ефективність традиційних протипухлинних препаратів, зокрема цисплатину, доксорубіцину, паклітакселу тощо, їх застосування обмежується високою токсичністю щодо нормальних тканин та розвитком стійкості в пухлинних клітин до дії цитостатиків. Припускається, що комбінація протипухлинних препаратів з C_{60} фулереном дозволить не лише знизити токсичну дію цитостатиків, але й ефективно посилити їх протипухлинну дію.

У літературі існують дані щодо посилення C_{60} фулереном цитотоксичних та протипухлинних ефектів хіміопрепаратів у експериментах *in vitro* та *in vivo*. Так, комплекс C_{60} фулерен-доксорубіцин спричиняв антипроліферативний ефект щодо клітин MCF-7 раку молочної залози людини [310], клітин V16-F10 меланоми, клітин LLC карциноми легені, клітин MDA-MB-231 раку молочної залози людини [117], а також пригнічував ріст перещепленої карциноми легені Льюїс [370], меланоми V16 [117] та карциноми молочної залози 4T1 [448], виживаність тварин-пухлиноносіїв була вищою, ніж за окремої дії препарату.

Синтезований кон'югат C_{60} фулерен-паклітаксел володів токсичною активністю як *in vitro* - знижував життєздатність клітин A549 карциноми легені людини [533], клітин MCF-7 раку молочної залози людини [375], клітин A375M меланоми, клітин T-24 раку сечового міхура та клітин Hep3B гепатоцелюлярної

карциноми [93], так і *in vivo* - пригнічував ріст гепатоцелюлярної карциноми Нер3В [93] та карциноми молочної залози MCF-7 [330].

За комбінованої дії цисплатину та фулерену знижувалася життєздатність клітин HeLa та підвищувалася цитотоксичність цитостатику за низької дози (5 мкг/мл) [355], антипроліферативний ефект комплексу фулеренол-цисплатин щодо клітин LLC був вищим, ніж за дії препарату окремо [117]. Протипухлинна активність цисплатину у комбінації з металопохідним C_{60} $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ щодо перещепленої карциноми простати PC-3-Іс людини резистентної СР-г до цисплатину [295] була вищою порівняно з окремою дією цитостатика.

Отже, враховуючи проблеми сучасної онкології, зокрема природну та набуту резистентність злоякісних новоутворень до цитостатиків, неспецифічність дії протипухлинних препаратів та їх високу токсичність щодо органів і тканин доцільним є використання у протипухлинній терапії біосумісних та біодоступних наноматеріалів, що потребує досягнень сучасних біотехнологій. Перспективними у цьому плані є низькотоксичні нанорозмірні з унікальними фізико-хімічними властивостями наноструктури карбону C_{60} фулерени. Комплекси або комбінована дія протипухлинних препаратів з C_{60} фулереном та його похідними можуть бути використанні для зниження побічних ефектів цитостатиків і посилення чутливості пухлинних клітин до їх дії, а також сприяти цілеспрямованій доставці препаратів шляхом вибіркового поглинання наноструктур злоякісно трансформованими клітинами. C_{60} фулерен сприяє утриманню кон'югованого протипухлинного препарату в організмі і, таким чином, може подовжити його терапевтичну дію. Тому актуальним є розробка нових біотехнологічних підходів використанням C_{60} фулерену для підвищення ефективності протипухлинних препаратів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви

У роботі були використані такі реагенти та матеріали: флуоресцеїн-5-ізотиоціанат, родамін В-ізотиоціанат (AppliChem, ФРН); толуол, фенол-С₆₁-масляна кислота, 4-гідрокситіазол, 4-диметиламінопіридин (VWR Corporation, США); холестерол (Calbiochem, ФРН); середовища DMEM і RPMI 1640, HEPES, трис-НСl, L-глутамін, 3-[4, 5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід (МТТ), DMSO, трипановий синій, пероксид водню, НСТ, ЕДТА, НАДН, відновлений глутатіон, мітоміцин С, цисплатин, DCFH-DA, індо-1АМ, TMRE, розчинник для зондів Pluronic F-127, пропідіум йодид, Hoechst33342, DAPI (4',6-діаміно-2-феніліндол), РНКаза (Sigma-Aldrich Co, Ltd, США); ембріональна сироватка теляти, пеніцилін, стрептоміцин (GibcoBRL, США); *D_c* Protein Assay Kit (Bio Rad, США); Apoptosis Assay Kit (eBiosciences™, Сан-Дієго, США); Promega Caspase-Glo® 3/7 Activity assay kit (Madison, США); азид натрію, ХДНБ, ФМС (Fluka, ФРН); MitoTracker Orange FM (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, США); трипсин (Biochrom, ФРН); первинні моноклональні антитіла IgG миші до С₆₀ фулерену, кон'юговані з тиреоглобуліном бика (Santa Cruz Biotechnology Inc., СА, США); FITC-мічені поліклональні анти-мишачі антитіла IgG кролика (Sigma-Aldrich Co., Сент-Луїс, США); Анексин V-FITC and PI apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Jose, СА, США); формальдегід, тритон X-100 (Ferak, ФРН); гематоксилін і еозин (Leica Biosystems, США); парафін (McCormick Scientific, США); фосфатидилхолін (БІОЛЕК, Україна); тест-набір для визначення концентрації гемоглобіну (Філісіт, Україна); оцтова кислота, оксалат амонію (ТОВ Хімлаборреактив, Україна); розчини барвників Май-Грюнвальда і Романовського (Макрохім, Україна).

Інші реактиви (глюкоза, диметилсульфоксид, трихлороцтова кислота, етиловий спирт, натрій хлорид, хлоридна кислота, фосфат калія, формалін, хлороформ та інші) вітчизняного виробництва.

2.2. Приготування водного колоїдного розчину C₆₀ фулерену

Метод отримання C₆₀ фулеренів базується на спалюванні графітового стержня у дузі постійного струму в атмосфері гелію за температури 6000 °С [271]. Подальше очищення C₆₀ фулеренів здійснювали за допомогою методу гель-хроматографії з використанням як елюента толуолу та високоефективної рідинної хроматографії (Jasco PU-2086, ФРН). Органічний розчинник видаляли шляхом випаровування у вакуумі. Після цього до суміші чистих C₆₀ фулеренів додавали дистильовану воду. Для одержання водного колоїдного розчину C₆₀ фулерену з рівномірним розподілом молекул C₆₀ його обробляли ультразвуком (8 Гц, 8 год) [417, 431]. Отриманий темно-коричневий водний розчин C₆₀ фулерену (0,15 мг/мл або 208 мкМ) є молекулярно-колоїдною системою, яка стабільна упродовж 12 місяців у діапазоні температур +4-25 °С. До складу цього розчину стабілізатори не входять. Важливо також підкреслити, що поверхнєве гідроксилювання молекул C₆₀ (поява ОН групи біля атома вуглецю, тобто формування наноструктури C₆₀(ОН)_n) є найбільш ймовірним механізмом їх стабілізації у водному розчині [403].

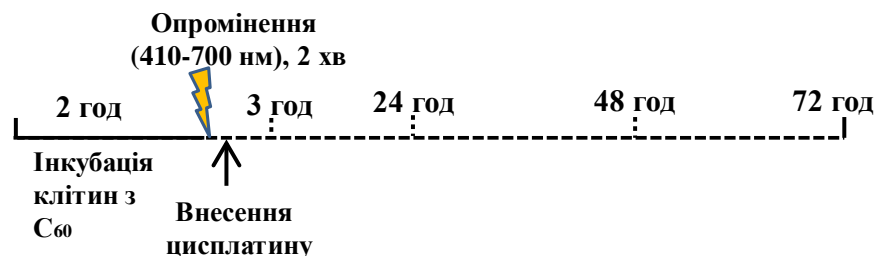
Синтез C₆₀ фулеренів, їх очищення (чистота складала >99,5 %) та приготування водного колоїдного розчину C₆₀ фулерену були проведені автором у хімічній лабораторії Інституту хімії та біотехнології Технічного університету Ільменау (ФРН) під керівництвом професора П. Шарффа.

2.3. Умови фотозбудження C₆₀ фулерену

Як джерело опромінення у видимому діапазоні спектра (410-700 нм) нами використано світлодіодну лампу потужністю 100 мВт/см² (2,45 Дж/см²) з λ_{max} у діапазонах - 450 нм та 550-600 нм.

Опромінення клітин навантажених 10 мкМ C₆₀ фулереном здійснювали світлодіодною лампою у лунках планшету упродовж 2 хв на відстані 1 см від поверхні клітинної суспензії.

Схема постановки експерименту з клітинами:



2.4. Оцінка агрегатного стану C₆₀ фулерену у водному середовищі з використанням методу фотонної кореляційної спектроскопії

Розмір частинок C₆₀ фулерену у водних розчинах визначали методом фотонної кореляційної спектроскопії (динамічного розсіяння світла) на лазерному кореляційному спектрометрі ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Великобританія), обладнаний He-Ne лазером ЛГН-111 (P=25 мВт, λ=633 нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота спектрометра базується на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище [438]. Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла та інтегральної інтенсивності розсіювання дозволяє розрахувати коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних частинок у рідинах та за рівнянням Стокса-Ейнштейна визначити розподіл частинок у рідинах за ефективним гідродинамічним діаметром. Коефіцієнт трансляційної дифузії D частинок пов'язаний з часом кореляції τ_c (характерний час релаксації флуктуацій інтенсивності розсіяного світла) співвідношенням:

$$Dq^2 = \frac{1}{\tau_c}.$$

Хвильовий вектор флуктуації концентрації частинок у середовищі q описується співвідношенням

$$q = \frac{4\pi}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right),$$

де n – показник заломлення світла у середовищі ($n=1,33$ для води); λ_0 – довжина світлової хвилі випромінювання; Θ – кут розсіювання світла.

Використовуючи формулу Стокса-Ейнштейна, яка пов’язує значення гідродинамічного діаметра частинок з коефіцієнтом трансляційної дифузії та в’язкістю рідини, можна розрахувати діаметр сферично-подібних частинок

$$d = \frac{k_B T}{3\pi\eta D},$$

де k_B – стала Больцмана; T – абсолютна температура, К; η – коефіцієнт динамічної в’язкості середовища, у якій суспендовані частинки.

Досліджувану водну суспензію в об’ємі 1 мл поміщали у циліндричну оптичну кварцову кювету діаметром 10 мм, яку потім вставляли у лунку лазерного кореляційного спектрометра. Реєстрацію лазерного випромінювання, розсіяного від водного розчину частинок, проводили багаторазово упродовж 180 с за температури $+22$ °С під кутом розсіювання 90° .

Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп’ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Агрегатний стан частинок C_{60} фулерену оцінювали у водному середовищі без добавок, з додаванням NaCl (0,9%), альбуміну сироватки (5%), а також у середовищі RPMI 1640, яке містило 5% ЕТС.

Дослідження агрегатного стану C_{60} фулерену у водних розчинах проведено спільно з к.т.н., с.н.с. Чуніхіним О.Ю. (лабораторія оптичних методів дослідження Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

2.5. Синтез флуоресцентно-мічених похідних C_{60} фулерену

Шляхом ковалентної кон’югації з флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом (FITC) або родаміном В-ізотіоціанатом (RITC) було синтезовано флуоресцентно-мічений C_{60} фулерен. Їх попередником є N-трифенілметил піролідин- C_{60} , який було синтезовано загальноприйнятим способом синтезу фулеропіролідинів [316, 436]. До суміші N-трифенілметил піролідин- C_{60} із трифлуорометансульфонової кислоти додавали піридин і флуоресцеїн-5-ізотіоціанат/або родамін В-ізотіоціанат. Внаслідок цього атом карбону функціональної групи

ізотіоціанату взаємодіяв з аміногрупою фулеропіролідину і утворювалася тіосечовина. Отриману суміш перемішували у темряві за кімнатної температури упродовж 6 днів. Коричневий осад центрифугували, промивали двічі дихлорметаном з метою видалення флуоресцентної мітки та висушували за низького тиску. У результаті утворювалися продукти N-флуоресцеїн-5-ізотіоціанат піролідін- C_{60} (C_{60} -FITC) (Рис. 2.1А) або N-родамін-В-5-ізотіоціанат піролідін- C_{60} (C_{60} -RITC) (Рис. 2.1В).

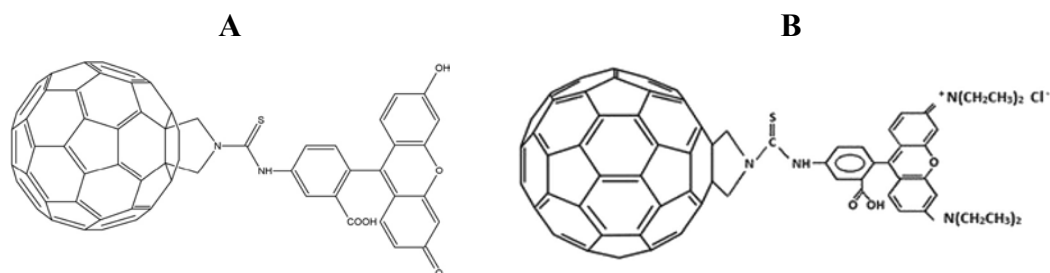


Рис. 2.1. Структура N-флуоресцеїн-5-ізотіоціанат-піролідін- C_{60} (А) та N-родамін-В-5-ізотіоціанат піролідін- C_{60} (В).

40 мг міченого продукту C_{60} фулерену ресуспендували у 100 мл етанолу та обробляли на ультразвуковій бані упродовж 2 хв. Розчини є стабільним упродовж 1 місяця за умови зберігання у темному місці.

Отримані зразки аналізували за допомогою масс-спектрометру Bruker Microflex LT (Bruker Corporation GmbH) при лазерній десорбції/іонізації світлового випромінювання (MALDI-TOF) з використанням DCTB-матриці. Спектри флуоресценції реєстрували за допомогою спектрофлуориметру Perkin-Elmer LS50B (ФРН), оснащеного аксесуаром фронтальної поверхні для вимірювання порошкових зразків. Зразки у вигляді порошоків та розчинів вимірювали при 25° С при збудженні за довжин хвиль 460 і 440 нм.

Синтез міченого C_{60} фулерену 1-[3-(5-метил-2-(піридин-2-їл)-1,3-тіазол-4-оксикарбоніл)пропіл]-1-феніл-[6.6] C_{61}) (Рис. 2.2) було здійснено шляхом реакції між хлоридом феніл- C_{61} -масляної кислоти та 4-гідрокситіазолом [464, 477], як каталізатор використано 4-диметиламінопіридин.

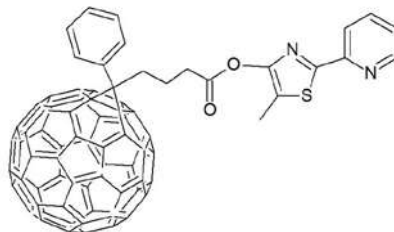


Рис. 2.2. Структура 1-[3-(5-метил-2-(піридин-2-їл)-1,3-тіазол-4-оксикарбоніл)пропіл]-1-феніл-[6.6]C₆₁).

Розчинники висушували за стандартними процедурами. Усі реакції проводили за методикою Шленка в атмосфері аргону чи азоту [233]. Спектри ЯМР (¹H, ¹³C, DEPT 135) вимірювали на приладі Bruker Spectrospin (300 МГц). MALDI-спектрометрію проводили на Bruker microflex LT. Високоєфективну рідинну хроматографію проводили на хроматографі JASCO, використовуючи COSMOSIL «резервуар» для води і розчинника.

Синтез флуоресцентно-мічених C₆₀ фулеренів та їх характеризування були проведені у хімічній лабораторії Інституту хімії та біотехнології Технічного університету Ільменау (ФРН) під керівництвом професора У. Ріттера.

2.6. Приготування водного розчину C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу

Іммобілізацію Cis-Pt на C₆₀ фулерен здійснювали шляхом змішування водних розчинів C₆₀ фулерену (0,15 мг/мл) та Cis-Pt (0,15 мг/мл) у молярному співвідношенні C₆₀ і Cis-Pt 1:2,4 (208 мкМ C₆₀ фулерену та 500 мкМ Cis-Pt). Отриману суміш спочатку обробляли на ультразвуковому диспергаторі (УЗДН-2Т, Україна) упродовж 20 хв при 22 кГц, після чого перемішували на магнітній мішалці (ПЭ-6100, Росія) упродовж 18 год при 400 об/хв за кімнатної температури.

Концентрація C₆₀ фулерену та Cis-Pt у створеному наноконкомплексі C₆₀-Cis-Pt (1:1) становила 75 мкг/мл (відповідно 104 мкМ C₆₀ та 250 мкМ Cis-Pt). У дослідженнях молярну концентрацію C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу виражали за еквівалентною Cis-Pt з метою зручності порівняння із його окремою дією за цієї

ж концентрації. Відповідно молярна концентрація C_{60} фулерену у наноконкомплексі є у 2,4 рази меншою порівняно із Cis-Pt.

2.7. Характеризування структури C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у водному середовищі з використанням фізичних методів

2.7.1. Динамічне розсіювання світла

Вимірювання розподілу частинок C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу за їх розміром проводили за допомогою динамічного розсіювання світла (ДРС) на приладі Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Ins. Ltd, Великобританія) з використанням декількох режимів високої роздільної здатності за кімнатної температури. Цей прилад обладнаний He-Ne лазером (максимальна потужність 5 мВт), який працює на довжині хвилі 633 нм. Вимірювання виконували під кутом розсіювання 173° (технологія NIBS). Автокореляційну функцію інтенсивності розсіяного світла проаналізовано з використанням програмного забезпечення Malvern Zetasizer.

Величину дзета-потенціалу (потенціал на межі фаз між твердим тілом і рідиною), як індикатор стабільності приготовленого водного колоїдного розчину, вимірювали за допомогою приладу Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Ins. Ltd, Великобританія), використовуючи універсальну одноразову кювету.

Вимірювання проведені спільно з д.ф.-м.н, пров.н.с. Давиденком М.О. (хімічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка).

2.7.2. Атомно-силова мікроскопія

Структурний (агрегатний) стан C_{60} фулерену та C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у водних розчинах досліджували з використанням атомно-силової мікроскопії (АСМ).

АСМ дослідження були виконані на зондовому мікроскопі “Solver Pro” (NT-MDT, Росія), обладнаному оптичним мікроскопом Integra Spectra (NT-MDT, Росія). АСМ візуалізація зразків відбувалась у напівконтактному режимі з використанням АСМ зондів типу NSG10 (NT-MDT). Як підкладку

використовували свіжосколоту атомно-гладку поверхню слюди (V1 grade, SPI Supplies), на обмежену ділянку якої наносили краплю розчину, що містить частинки. Вимірювання проводили на сухих шарах після повного випаровування розчину.

АСМ вимірювання проведені спільно з к.ф.-м.н, с.н.с. Черепановим В.В. (відділ фізичної електроніки Інституту фізики НАН України).

2.7.3. Сканувальна тунельна мікроскопія

Структурний (агрегатний) стан C_{60} фулерену, Cis-Pt та C_{60} -Cis-Pt наноконплексу у водних розчинах досліджували з використанням скануючої тунельної мікроскопії (СТМ).

У СТМ дослідженнях підкладкою слугувала поверхня Au(111) (SPI Supplies), відпалена у полум'ї пропану. Після відпалювання підкладка виявляла лінії реконструкції на повітрі. Режим, який забезпечує отримання реконструйованих поверхонь, підбирався експериментально. Як вістря використовували платиново-іридієвий дріт (Pt-Ir, 80%:20%, діаметр 250 мкм). Вимірювання проводили на сухих шарах після повного випаровування розчину. Типові значення тунельного струму і напруги знаходилися у межах 0,01–0,1 нА та 0,1–0,8 В, відповідно.

СТМ вимірювання проведені спільно із к.ф.-м.н, с.н.с. Сененком А.І. (відділ фізичної електроніки Інституту фізики НАН України).

2.7.4. Мало-кутове рентгенівське розсіювання

З метою підтвердження комплексоутворення у водному розчині C_{60} фулерену та Cis-Pt були проведені вимірювання з мало-кутового рентгенівського розсіювання (МКРР).

Експерименти МКРР виконували на спеціально обладнаному приладі P12 BioSAXS (EMBL/DESY, ФРН) за використання рентгенівського випромінювання з енергією 10 кеВ. Відстань від зразка до детектора (3,1 м) відповідає q -діапазону 0,07–4,6 nm^{-1} (хвильове число випромінювання). Зразок (20 мкл) вводили у капіляр за допомогою автоматичного дозатора та постійно

переміщували задля зменшення негативного впливу опромінення. Було проведено двадцять послідовних вимірювань зразка (0,05 с) та буфера за температури 20 °С. Усі криві інтенсивності розсіювання для зразка порівнювали з еталонним вимірюванням. Одержані результати обробляли за допомогою методу непрямого перетворення Фур'є, розробленого Glatter [193], використовуючи програму GNOM [470].

МКРР вимірювання проведені за сприяння академіка НАН України Булавіна Л.А. (фізичний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка).

2.8. Методи комп'ютерного моделювання

2.8.1. Взаємодія C₆₀ фулерену з ABC-транспортерами

Молекулярний докінг (МД) C₆₀ фулерену вивчали з такими білками-транспортерами як Р-глікопротеїном (Р-gp) та білками множинної стійкості до ліків (MRP-1 і MRP-2).

Дані про кристалічну структуру Р-gp отримували зі спеціалізованих баз даних PDB, PDBe та pfam. Оскільки *in vitro* дослідження були проведені на лініях пухлинних клітин людини і мишей, усі наявні структури Р-gp порівнювали між собою з використанням пакету ClustalW. Як результат, виділили найбільш репрезентативну кристалічну структуру 4M1M [289], яку у подальшому використали як шаблон для побудови моделі Р-gp людини. Цю модель будували на Swiss-Model online сервері [www.expasy.ch/swissmod].

Усі наявні кристалічні структури білка MRP-1 були проаналізовані з використанням програмного забезпечення ClustalW і у подальшому для дослідження використали репрезентативну структуру 2CBZ [410].

Кристалічну структуру білка MRP-2 отримано зі спеціалізованої бази даних PDB для *Plasmodium yoelii* (PDB ID: 2GHI кристалічна структура *Plasmodium yoelii* білка множинної стійкості до ліків-2) [490]. Також було проведено моделювання кристалічної структури білка MRP-2 людини. Амінокислотну послідовність MRP-2 отримано з UniProt ID послідовності Q92887. При порівнянні послідовностей структура 2GHI виявилася менш

подібною до людської (тотожність - 30,6%; подібність - 44,3%), аніж структура 2CBZ (тотожність - 60,6%; подібність - 70,6%). Крім того, при порівнянні кристалічних структур 2CBZ та 2GH1 виявлено перекривання їх вторинних структур. Тому, кристалічну структуру 2CBZ [410] використали як шаблон для гомологічного моделювання структури білка MRP-2 людини.

Перед проведенням МД між молекулою C_{60} та білком-транспорттером з білків (P-gr, MRP-1 і MRP-2) видалили молекули води, а амінокислоти Arg і Lys запроtonували. МД проводили з використанням гнучкого ліганду і фіксованого рецептора. Застосували алгоритм систематичного докінгу (sdock+) [500]. Максимальна кількість кроків розрахунку складала 100. 10 найкращих комплексів (виходячи з внутрішніх скоринг-функцій QXP [329] було використано у подальшому аналізі. Важливо зазначити, що у процесі розрахунку було враховано, що діапазон рухливості взаємодіючих структур може бути різним, починаючи з невеликих бічних ланцюгів і закінчуючи масштабними доменними рухами. Для одержаних комплексів молекули C_{60} з відповідним білком розраховували такі енергетичні параметри: вільна енергія комплексу (FreE), енергія взаємодії між молекулою C_{60} і білком (Cntc), енергія стеричних зіткнень між молекулою C_{60} і білком (Bump).

МД проводили спільно з к.б.н., м.н.с. Гурмачем В.В. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка).

2.8.2. Просторова структура C_{60} -Cis-Pt наноккомплексу у водному розчині

Просторову структуру C_{60} фулерену побудовано за використання бази даних [<http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/data/molecules/misc/c60.html>]. Просторову структуру Cis-Pt побудовано за допомогою програми HyperChem 8.0 [510], а потім оптимізовано у програмі Gaussian 09W [64, 217]. Такий підхід є оптимальним для проведення квантово-механічних розрахунків молекул, що містять атоми платини, зокрема Cis-Pt [510]. Просторову структуру C_{60} -Cis-Pt наноккомплексу побудовано за допомогою програмного забезпечення XPLOR

(version 3.851 [107] із силовим полем CHARMM27 [267]). Площину молекули Cis-Pt розташовували паралельно поверхні C₆₀ фулерену на відстані приблизно 3.4 Å. Геометричну оптимізацію структури наноконплексу C₆₀-Cis-Pt виконано за допомогою засобів молекулярної механіки, передбаченої у програмі XPLORE. Моделювання водного середовища було проведено з використанням 1423 молекул води, розміщених у кубі з довжиною ребра 35 Å.

Комп'ютерне моделювання просторової структури C₆₀-Cis-Pt наноконплексу у водному середовищі проведено спільно з д.ф.-м.н, проф. Євстігнєєвим М.П. (Севастопольський технічний університет, АР Крим, Україна).

2.9. Формування біліпідних плівок Ленгмюра-Блоджетт

Термін плівки Ленгмюра-Блоджетт (Langmuir-Blodgett films) означає моно- або багатошарові плівки, які переносяться з межі поділу фаз вода-повітря на тверду підкладку. Молекулярна плівка на межі поділу рідина-повітря називається Ленгмюрівською плівкою. Запропонований у минулому столітті колоїдно-хімічний метод формування цих плівок широко використовують і досі [97] (Рис. 2.3).

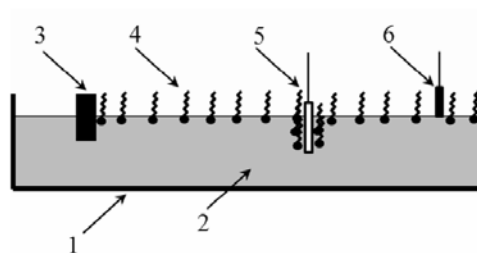


Рис. 2.3. Схема установки для нанесення плівок Ленгмюра-Блоджетт на підкладку: 1 - ванна, 2 - рідка субфаза, 3 - рухливий бар'єр, 4 - мономолекулярний шар, 5 - підкладка, 6 - ваги Вільгельма.

На поверхню деіонізованої води наносили суміш фосфатидилхоліну та холестеролу (співвідношення 1:1) у n-декані (22 мг/мл). Поверхневий тиск реєструвався вагами Вільгельма. Опускання та піднімання підкладки крізь моношар здійснювалося автоматично. При вертикальному русі підкладки у

меніску рідини моношар осаджувався на її тверду поверхню, відповідно площа, яку займав моношар на воді, зменшувалася. Перед нанесенням наступного моношару рухливий бар'єр автоматично повільно пересувався вправо ($60 \text{ см}^2/\text{хв}$) (Рис. 2.3).

При вийманні підкладинки із водної фази молекули амфіфілів орієнтуються полярними групами до підкладинки, така структура є Z-типу (Рис. 2.4а). При зануренні підкладинки утворюється структура X-типу (Рис. 2.4б), в якій молекули орієнтуються неполярними групами до підкладинки. Шляхом послідовного виймання та занурення підкладинки у водну фазу і навпаки можна сформувати бішар Y-типу (Рис. 2.4в).

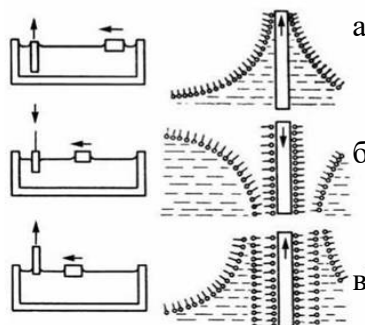


Рис. 2.4. Нанесення мономолекулярних шарів на підкладинку за методом Ленгмюра-Блоджетт: Z-типу (а), X-типу (б) та Y-типу (в).

Вертикальне перенесення моношарів (не менше 4 разів) здійснювали за температури $20\text{-}22^{\circ} \text{ C}$ та поверхневого тиску $20\text{-}35 \text{ мН/м}$. Моношар перетворювався у бішарові впорядковані структури n-порядку.

Як підкладинки, використано кварцеві пластинки, попередньо оброблені розчином хромової суміші (4 год) та знежирені розчином 96% етанолу (30 хв). Після промивання дистильованою водою пластинки висувували за температури 130° C упродовж 3 год. Фіксацію, з метою стабілізації бішарового блоку, здійснювали шляхом оприскування солями осмію. Одержаний твердий гелеподібний блок вивчали за допомогою мікроскопії.

У водну фазу було введено 10 мкМ міченого C_{60} фулерену та з використанням флуоресцентної мікроскопії досліджено його взаємодію з гідрофобними ділянками біліпідних мембран.

2.10. Клітинні лінії та умови культивування клітин

Об'єктом дослідження в експериментах *in vitro* були ізольовані тимоцити щура, лінії первинної культури клітин HEK293 ембріональної нирки людини і лінії злоякісних клітин різного гістогенетичного походження, зокрема клітини Jurkat гострої Т-лейкемії людини, клітини CCRF-CEM гострої лімфобластної лейкемії людини, клітини HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії людини та їх сублінії резистентні до вінкристину HL-60/vinc, з надекспресією P-gp, і до адриаміцину HL-60/adr, з надекспресією білка MRP-1; клітини L1210 лімфоцитарної лейкемії миші та їх резистентна лінія до цисплатину L1210/Cis-Pt; клітини HeLa і KB-3-1 карциноми шийки матки людини та їх резистентна до колхіцину сублінія KBC-1, з надекспресією P-gp; клітини HCT-116 колоректальної карциноми людини та їх сублінії HCT-116/p53KO, HCT-116/VaxKO з нокаутом генів p53 і Vax відповідно; клітини MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини; клітини LLC карциноми легені Льюїс миші; клітини асцитної карцинома Ерліха (АКЕ) раку молочної залози миші.

Клітини культивували у середовищі RPMI-1640 (суспензійні) або DMEM (моношарові) за присутності 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС), 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину в зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C. Клітини пересівали через кожні 72 год розведенням клітин у культуральному середовищі у співвідношенні 1:5 [65]. Обробку трипсином (1:10 в PBS) використовували для субстрат-залежних клітин.

Клітинні лінії були отримані з колекції клітинного банку тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня (Австрія) та німецької колекції мікроорганізмів і клітинних культур Інституту м. Лейбніца (DSMZ) (ФРН).

2.11. Ізолювання тимоцитів з тимусу щура

Тимоцити виділяли з тимусу щурів лінії Вістар вагою 130-170 г. Після декапітації з грудної порожнини тварини вилучали тимус (200-300 мг). Суспензію тимоцитів отримували перетиранням тканини тимусу через 4 шари нейлонового фільтру у буфер А такого складу (мМ): Na_2HPO_4 – 3, KCl – 5, NaCl – 120, CaCl_2 – 1, глюкоза – 10, MgSO_4 – 1, NaHCO_3 – 4, HEPES – 10, pH 7,4. Клітинну суспензію центрифугували (600 g, 5 хв), отриманий осад ресуспендували до концентрації $2\text{-}5 \times 10^8$ клітин/мл.

2.12. Оцінка виживаності клітин з використанням барвника трипанового синього

Суспензійні клітини ($0,5\text{-}1 \times 10^6$ на лунку) висівали у 24-лункові пластикові планшети (GreinerBioOne, ФРН), а субстрат-залежні клітини ($10\text{-}20 \times 10^3$ на лунку) у 96-лункові планшети (GreinerBioOne, ФРН) у середовищі RPMI 1640/DMEM за присутності 10% ЕТС, 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину та інкубували у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 при 37 °С. Досліджувані сполуки до суспензійних культур клітин вносили одразу, тоді як до моношарових культур клітин через 24 год до досягнення ними 90% конфлюєнту. Кількість живих і мертвих клітин підраховували через 24 год після дії сполук у гемоцитометричній камері Горяєва за допомогою світлового мікроскопу Olympus „СКХ 41SF” (Японія) з використанням 0,4% розчину барвника трипанового синього, який зафарбовує в синій колір мертві клітини з пошкодженою мембраною, тоді як живі клітини залишаються незабарвленими [180].

2.13. Оцінка життєздатності клітин з використанням МТТ

Життєздатність клітин оцінювали за здатністю відновлювати 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід (МТТ). Принцип методу полягає у здатності дегідрогеназ дихального ланцюга мітохондрій перетворювати МТТ на формазан, що має фіолетовий колір [114]. МТТ-тест проводили у 96-лункових планшетах (GreinerBioOne, ФРН). Концентрація

клітин у лунці була $10\text{--}500 \times 10^3$ у 100 мкл. У кожному лунку вносили по 10 мкл розчину МТТ (4 мг/мл фосфатно-буферного розчину) та інкубували упродовж 2 год при $37\text{ }^\circ\text{C}$, після чого планшети центрифугували (600 g, 7 хв) та відбирали надосад. Осад зберігали за температури $4\text{ }^\circ\text{C}$ у темряві упродовж 20 год. До отриманого осаду формазану додавали 100 мкл концентрованого розчину диметилсульфоксиду. Через 15 хв проводили вимірювання екстинції на спектрофотометрі (μ Quant, БіоТЕК, США) при $\lambda=570$ нм. Життєздатність клітин виражали у відсотках відносно контролю.

Обробка даних та розрахунок значень для показника IC_{50} проводили за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Індивідуальні криві концентраційних залежностей були побудовані шляхом визначення логарифму концентрацій досліджуваних сполук порівняно з відповідним нормалізованим відсотком значень життєздатності клітин з використанням нелінійної регресії.

2.14. Цитоморфологія клітин

Цитоморфологію клітин досліджували за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Фотографії клітин були зроблені за допомогою світлового мікроскопу (Olympus CKX41SF, Японія) та цифрової камери (Olympus SP-500UZ, Індонезія).

2.15. Оцінка адгезивних властивостей клітин

Клітини MCF-7 (150×10^3 на лунку) за умов unfed culture інкубували у 24-лункових планшетах (GreinerBioOne, ФРН) упродовж 10 діб без заміни культурального середовища. Показником адгезії вважали кількість клітин, що прикріпилась до субстрату, яку оцінювали після профарбовування кристалічним фіолетовим за оптичним поглинанням при $\lambda=535$ нм на спектрофотометрі (μ Quant, БіоТЕК, США) [26].

2.16. Оцінка міграційної активності клітин

Для вивчення міграції клітин було використано метод «закриття рани» *in vitro* або заростання подряпини у моношарі клітин, який імітує міграцію клітин під час загоєння рани *in vivo* [420].

Клітини LLC (10^6 клітин на лунку) інкубували у 6-лункових планшетах (GreinerBioOne, ФРН) у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 при 37°C до досягнення ними 90% конфлюєнту (приблизно 24 год). Рану шириною $\sim 0,2$ мм формували стерильним наконечником піпетки на 200 мкл посередині моношару клітин. Культуральне середовище замінювали на нове повного складу із додаванням 1 мкМ мітоміцину С для пригнічення клітинної проліферації, після чого додавали досліджуванні сполуки.

Метод «закриття рани» оцінювали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Місце подряпини фотографували одразу та через 24 год після обробки клітин. Ширину подряпини та ступінь заростання рани оцінювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ software версії 1.47h (<http://imagej.nih.gov/ij>). Результати міграції клітин представляли у відсотках закриття рани як коефіцієнт міграції (M) та обчислювали за формулою: $M = \frac{W_0 - W_{24}}{W_0} \times 100\%$, де W_0 та W_{24} - ширини подряпини за вказаних термінів (0 і 24 год).

2.17. Визначення активності ензимів антиоксидантної системи у клітинних лізатах

2.17.1. Отримання клітинних лізатів

Тимоцити, клітини L1210 і Jurkat (10^6 клітин/мл) осаджували (1500 g, 5 хв), переводили у 10 мМ трис-НСІ (рН 8,0) у співвідношенні 10^6 клітин у 0,1 мл буферу та заморожували у скрапленому азоті. Після розморозки суспензію клітин розтирали у гомогенізаторі Поттера. Отриманий після центрифугування клітинного лізату супернатант (1500 g, 10 хв) використовували для спектрофотометричного визначення ферментативної активності.

Концентрацію білка визначали за допомогою *D_c Protein Assay Kit*, в основу якого покладено метод визначення білка за Лоурі [308] з деякими модифікаціями.

2.17.2. Визначення активності супероксиддисмутази

Активність супероксиддисмутази (СОД) у клітинах визначали за Чеварі і співав. [59]. Метод базується на здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАД·Н) та феназинметасульфату (ФМС). У результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. За присутності СОД відсоток відновлення НСТ зменшується.

У пробу, що містила 0,15 М фосфатний буфер, додавали аліквоту клітинного лізату (0,2 мг білка). Загальний об'єм проби становив 0,25 мл. До проби додавали 0,5 мл реагенту 1 (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буфері з ЕДТА, рН=7,8). Одразу вимірювали поглинання проб при $\lambda=540$ нм на спектрофотометрі Scinco SUV-2120 (ФРН). Потім до кожної проби додавали 0,025 мл реагенту 2 (98,5 мкМ НАД·Н на Трис-ЕДТА буфері, рН=8,0), проби витримували при 30 °С та повторно визначали екстинкцію через 10 хв за тих же умов. Відсоток пригнічення ступеню відновлення НСТ у пробі розраховували за формулою:

$$\frac{E_2 - E_1}{E_2} \times 100 \%,$$

де E_1 – екстинкція до додавання реагенту 2, E_2 – екстинкція після додавання реагенту 2.

Активність ферменту визначали за калібрувальною кривою та виражали в умовних одиницях на хв на 1 мг білка.

2.17.3. Визначення глутатіонпероксидазної активності

Глутатіонпероксидазну активність у клітинах визначали за накопиченням окисненого глутатіону (GSSG) у середовищі, що містило 1 мл фосфатного

буфера (0,3 М рН 7,4, 12 мМ азид натрію, 6 мМ ЕДТА, 0,6 мМ), 0,5 мл 2,5 мМ відновленого глутатіона (GSH), 0,5 мл 1,8 мМ H_2O_2 та 30 мкг білка в об'ємі проби [27]. Реакцію запускали додаванням пероксиду водню, зупиняли через 2 хв додаванням 1 мл 10% трихлороцтової кислоти. Після центрифугування при 3000 об/хв упродовж 15 хв визначали екстинцію GSSG при довжині хвилі 260 нм на спектрофотометрі Scinco SUV-2120 (ФРН). Активність ферменту виражали у мікромолях GSSG на 1 мкг білка за хв.

2.17.4. Визначення глутатіонтрансферазної активності

Глутатіонтрансферазну активність у клітинах визначали за швидкістю ензиматичного утворення глутатіон-S-2,4-динітробензолу у реакції відновлення глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ) [27]. Інкубаційна суміш містила: 1,5 мл фосфатного буфера (0,1 М рН 6,5), 0,2 мл 10 мМ відновленого глутатіону, 30 мкг білка в об'ємі проби. Реакцію починають додаванням субстрату – 0,02 мл 0,1 М ХДНБ. Приріст оптичної густини реєстрували реєстрували упродовж 3 хв при довжині хвилі 346 нм на спектрофотометрі Scinco SUV-2120 (ФРН). Активність фермента виражали у мікромолях кон'югата на 1 мкг білка за 1 хв.

2.18. Оцінка кінетики гемолізу еритроцитів щура

Отримані з гепаринізованої крові щура лінії Вістар еритроцити розводили у 0,85% NaCl до екстинції 0,700 оп. од. при 630 нм на спектрофотометрі Scinco (ФРН). Гемоліз еритроцитів спричиняли внесенням у пробу HCl у кінцевій концентрації 0,001 н. Кінетику гемолізу вимірювали спектрофотометрично ($\lambda=630$ нм) упродовж 2 хв через кожні 10 с. Відсоток гемолізованих еритроцитів з отриманого ряду екстинцій розраховували за відповідними формулами, представленими у роботі [56].

2.19. Оцінка продукування АФК у клітинах

Продукування АФК оцінювали за допомогою зонда 2,7-дихлордигідрофлуоресцеїну діацетату (DCFH-DA), який вносили до

середовища інкубації клітин (2×10^6 /мл) до кінцевої 5 мкМ концентрації у пробі. Інтенсивність флуоресценції зонда оцінювали на спектрофлуориметрі Shimadzu 150 RF (Японія), довжина хвилі збудження ($\lambda_{\text{збудж}}$) – 480 нм, довжини хвилі випромінювання ($\lambda_{\text{випр}}$) – 520 нм [281].

2.20. Визначення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} у клітинах

Рівень вільного цитозольного Ca^{2+} визначали з використанням флуоресцентного зонду індо-1АМ. Клітини (3×10^7 /мл) навантажували індо-1 у буфері А протягом 40 хв при 25°C , додаючи Pluronic F-127 (0,05%) для полегшення розчинення зонду у гідрофільному середовищі. Від надлишку зонду клітини відмивали двократним центрифугуванням (600g, 10хв) та ресуспендували у буфері А. Навантажені зондом клітини ($2,5 \times 10^6$ клітин/мл) інкубували упродовж 3 год при 25°C . Інтенсивність флуоресценції індо-1 (F) реєстрували на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-1501 (Японія), довжина хвилі збудження ($\lambda_{\text{збудж}}$) – 350 нм, довжини хвиль випромінювання ($\lambda_{\text{випр}}$) – 410 та 495 нм.

Флуоресценцію зонду в умовах його максимального насичення кальцієм ($F_{\text{макс}}$) визначали за присутності дигітоніну (індукує руйнування клітин) у концентрації 10 мкмоль/л у пробі. Флуоресценцію зонду в умовах мінімальної насиченості зонду кальцієм ($F_{\text{мін}}$) визначали за присутності ЕГТА у концентрації 10 ммоль/л у пробі.

Концентрацію вільного цитозольного Ca^{2+} розраховували як описано в [202], за формулою:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i, (\text{нМ}) = 210 \left(\frac{R - R_{\text{мін}}}{R_{\text{макс}} - R} \right) \frac{F_{\text{мін}(495)}}{F_{\text{макс}(495)}},$$

$$\text{де } R = F_{410}/F_{495}, R_{\text{макс}} = F_{\text{макс}(410)}/F_{\text{макс}(495)}, R_{\text{мін}} = F_{\text{мін}(410)}/F_{\text{мін}(495)}.$$

2.21. Реєстрація мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах

Величину мембранного потенціалу мітохондрій визначали за допомогою флуоресцентного потенціал-чутливого зонду тетраметилродаміну етил естеру перхлориду (TMRE, Sigma, США). Клітини (10^7 кл/мл) у буфері А інкубували

40 хв за присутності 100 нМ TMRE при 25⁰С, додаючи Pluronic F-127 (0,05%) для полегшення розчинення зонду у гідрофільному середовищі. Від надлишку зонду клітини відмивали двократним центрифугуванням (600g, 10хв), ресуспендували у буфері А. Відносну величину мітохондріального потенціалу ($\Delta\psi$) оцінювали як різницю між флуоресценцією TMRE до та після його виходу з деполаризованих протонифором FCCP (1мкМ) мітохондрій. Флуоресценцію TMRE реєстрували на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-1501 (Японія), $\lambda_{збудж.}=540$ нм, $\lambda_{випр}=595$ нм.

2.22. Аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу

Клітини ($0,5-1 \times 10^6$) після інкубації з досліджуваними сполуками двічі відмивали розчином PBS (рН 7,4), фіксували додаванням до клітин 0,9 мл 90% охолодженого етанолу (-20 ⁰С). Отримані проби зберігали у фіксуючому середовищі при -20 ⁰С не більше двох тижнів. Після цього фіксовані клітини осаджували центрифугуванням при 13000 об/хв упродовж 1 хв та промивали двічі розчином PBS. До осаду додавали РНКазу А у кінцевій концентрації 100 мкг/мл та інкубували упродовж 30 хв за кімнатної температури. Далі клітини осаджували центрифугуванням (13000 об/хв, 1хв), до осаду додавали пропідіум йодид у кінцевій концентрації 10 мкг/мл та інкубували 30 хв у темряві за температури 25 ⁰С. Вміст флуоресцентного барвника у клітинах оцінювали на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, USA), аналіз результатів здійснювали з використанням програми FCS Express 3 Flow Cytometry Software (DeNovo Software, USA) [241].

2.23. Дослідження клітин у стані апоптозу

2.23.1. Подвійне фарбування клітин FITC-міченим анексином V та пропідій йодидом для протокової цитофлуориметрії

Комбіноване фарбування клітин FITC-міченим анексином V та пропідій йодидом визначали за допомогою Apoptosis Assay Kit (eBiosciencesTM, Сан-Дієго, США) згідно інструкцій виробника. Клітини (10^5) після 24 год інкубації з досліджуваними сполуками центрифугували при 600 g упродовж 5 хв, двічі

промивали у PBS (pH 7.4) та інкубували упродовж 15 хв у буфері зв'язування, який містив 1/50 об'єму анексину V, кон'югованого з FITC, та пропідій йодид (50 мкг/мл). Після цього досліджувані зразки розводили удвічі відповідним об'ємом буферу зв'язування та досліджували на протоковому цитофлуориметрі FACSCan (Becton Dickinson, PaloAlto, США).

2.23.2. Визначення активності каспази 3/7

Активність каспази 3/7 визначали за допомогою Promega Caspase-Glo® 3/7 Activity assay kit (Madison, США) згідно інструкцій виробника. Клітини ($0,3 \times 10^4$) після 24 год інкубації з досліджуваними сполуками витримували упродовж 10 хв за кімнатної температури. Додавали однаковий об'єм реагенту Caspase-Glo 3/7 і суміш обережно перемішували на шейкері для плашок (300 об/хв) упродовж 1 хв. Зразки інкубували за кімнатної температури упродовж 1 год. Люмінесценцію зразків реєстрували на мікропланшетному рідері Tecan Infinite M200 Pro (Männedorf, Швейцарія).

2.23.3. Фарбування ядерного хроматину барвником DAPI

Клітини (100×10^3 на лунку) висівали у 6-ти лунковий планшет (GreinerBioOne, ФРН) на скельця у культуральному середовищі, яке містило 10% ЕТС. Через 24 год додавали досліджувані сполуки (C_{60} фулерен, або Cis-Pt, або нанокмплекс C_{60} -Cis-Pt) та інкубували клітини з добавками упродовж 24 год. Після цього клітини двічі промивали у PBS (pH 7.4), фіксували (100 мкл формаліну, 10 мкл Triton X-100 на пробу) упродовж 15 хв за кімнатної температури, фарбували барвником DAPI (4',6-діаміно-2-феніліндол) у кінцевій концентрації 1% упродовж 5 хв та знову двічі промивали у PBS (pH 7.4). На предметне скло з клітинами та покривне скло наносили спеціальне середовище GelMount (Sigma, США) для тривалого збереження флуоресценції. Цитоморфологічне дослідження проводили з використанням флуоресцентного мікроскопу Carl Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, Gottingen, ФРН) та зразки фотографували цифровою фотокамерою (Canon, Японія).

2.24. Оцінка проникнення C₆₀ фулерену у клітини

Для визначення часової динаміки проникнення C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу у клітини було використано методи конфокальної і флуоресцентної мікроскопії, імуноцитохімічне фарбування клітин з використанням FITC-мічених антитіл проти молекул C₆₀ та барвників – DAPI, як маркер ядра клітини, і MitoTracker Orange, як мітохондріальний маркер, а для кількісного аналізу C₆₀ фулерену - рідинну хроматографію та мас-спектрометрію (HPLC-ESI-MS).

2.24.1. Флуоресцентна мікроскопія

Клітини HEK293 (3×10⁵ на лунку) або клітини HeLa (25×10³ на лунку) висівали у 6-лунковий планшет (GreinerBioOne, ФРН) та інкубували упродовж 24 год у культуральному середовищі DMEM, яке містило 10% ETC. Після цього до інкубаційного середовища додавали C₆₀ фулерен або C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс та інкубували відповідно досліджуваних термінів. Клітини фарбували 8 мкМ Hoechst33342 у розчині PBS упродовж 10 хв. Візуалізацію зразків проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа Keyence BZ-9000 BIOREVO (Осака, Японія), обладнаного зеленим фільтром (збудження і поглинання при довжинах хвиль 472 і 520 нм/ 360 і 460 нм). Зразки фотографували цифровою фотокамерою (Canon, Японія). Обробку зображень флуоресценції здійснювали за допомогою програмного забезпечення Keyence BZ-II Analyzer Software (Osaka, Japan).

Інтенсивність сигналу флуоресценції для міченого C₆₀ фулерену у клітинах HEK293 (мінімум 2×10⁴ на пробу) оцінювали за допомогою протокового цитометра BD FACSJazz™ (Singapore) при λ_{ex}=488 нм і λ_{em}=520 нм та програмного забезпечення BD FACST™ software (Singapore).

2.24.2. Конфокальна мікроскопія

Лейкозні клітини (10⁶/пробу) інкубували із комплексом C₆₀-RITC упродовж 30 хв, 2 та 18 год, після чого двічі відмивали розчином PBS (pH 7.4). Внутрішньоклітинну локалізацію комплексу C₆₀-RITC визначали за допомогою

конфокального мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 (ФРН). Для збудження FITC застосовували аргонний лазер ($\lambda=543$ нм). Інтенсивність флуоресценції оцінювали за допомогою програми Zeiss LSM Image Browser.

2.24.3. Імунофлуоресцентне фарбування клітин

Клітини CCRF-CEM (2×10^5 на пробу) висівали у 6-лункові планшети (Sarstedt, Nümbrecht, ФРН) на покривні скельця (Carl Roth, Karlsruhe, ФРН), попередньо покриті полі-D-лізином, та інкубували упродовж 24 год. До середовища інкубації вносили 20 мкМ C_{60} фулерену та інкубували 24 год. Далі клітини промивали розчином PBS, фарбували MitoTracker Orange FM (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, США) упродовж 30 хв при 37 °С, фіксували (4% параформальдегід, 0,2% Triton X-100 на пробу) упродовж 15 хв за кімнатної температури у темряві і знову промивали розчином PBS. Центри зв'язування блокували 10% БСА упродовж 20 хв та промивали розчином PBS. Первинні моноклональні антитіла IgG миші до C_{60} фулерену, кон'юговані з тиреоглобуліном бика (розведення 1:30 у PBS/1,5% БСА, 1-10F-A8 Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, США), додавали до клітин CCRF-CEM та інкубували упродовж ночі при 4 °С у зволоженій камері [382]. Потім клітини CCRF-CEM інкубували з FITC-міченими поліклональними анти-мишачими антитілами IgG кролика (розведення 1:200 в PBS/1,5% БСА, F7506 Sigma-Aldrich Co., Сент-Луїс, США) упродовж 3 год за кімнатної температури. Скельця між кожним етапом промивали тричі розчином PBS. Проби, промиті дистильованою водою, інкубували у розчині барвника ядра (0,6 мкМ DAPI, 90 мМ р-фенілендіамін у гліцерин/PBS) упродовж 2 год у темряві та запечатували скельцем. Клітини CCRF-CEM вивчали за допомогою флуоресцентного мікроскопу Keyence BZ-9000 BIOREVO (Осака, Японія), обладнаного синім ($\lambda_{ex}=377$ нм, $\lambda_{em}=447$ нм), зеленим ($\lambda_{ex}=472$ нм, $\lambda_{em}=520$ нм) та червоним ($\lambda_{ex}=543$ нм, $\lambda_{em}=593$ нм) фільтрами, та програмного забезпечення Keyence BZ-II Viewer software (Осака, Японія). Об'єднані зображення та інтенсивності сигналу флуоресценції окремої клітини обробляли за допомогою програмного забезпечення Keyence BZ-II Analyzer software (Осака, Японія).

2.25. Умови утримання лабораторних тварин

Об'єктом дослідження в експериментах *in vivo* були дорослі миші інбредної лінії обох статей та миші-самці лінії C57Bl/6 вагою 20-22 г розведення віваріїв ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького, НАН України м. Київ, відповідно.

Мишей утримували у стандартних лабораторних умовах за 12 годинного режиму день/ніч на раціоні віварію з вільним доступом до їжі і води. У вентиляваному приміщенні температура повітря становила 20-22 °С, вологість – 50-60%. Тварини утримували у пластикових клітках з ґратчастими сітками з нержавіючої сталі. Такі клітки легко мити та дезінфікувати, а тварини не можуть їх пошкодити. Розмір клітки: довжина – 60 см, ширина – 40 см, висота – 20 см. У кожній клітці знаходилося по 6-12 мишей.

Підстилку і воду тваринам міняли щоденно. Як підстилку використовували тирсу деревини осики, яку перед використанням автоклаували (тиск – 1,5 атм). Тварини отримували кип'ячену фільтровану воду кімнатної температури. Харчувалися тварини *ad libitum* комбінованим гранульованим кормом складу (%): кукурудзяне борошно – 5,0; пшеничне борошно – 30,0; ячмінне борошно – 17,0; вівсяне борошно – 5,0; рибне борошно – 6,0; просяне борошно – 5,0; висівки – 6,0; шрот соєвий – 5,0; м'ясо-кішкове борошно – 5,0; дріжджі сухі – 1,5; риб'ячий жир – 2,0; крейда – 1,0; сіль – 0,5; коров'яче сухе молоко – 6,0; шрот соняшниковий – 5,0.

Експериментальні дослідження (маніпуляції з тваринами) проводили відповідно норм, встановлених законом України №3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», і міжнародних положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 (www.coe.int/en/web/conventions/) під контролем Біоетичного комітету НАН України [19, 50, 163, 478].

2.26. Схема експерименту дослідження гострої токсичності сполук

Гостру токсичність Cis-Pt, C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу вивчали на мишах інбредної лінії за умови внутрішньочеревного введення згідно методичних рекомендацій [20]. Миші рандомно за вагою розділяли на 3 групи: Cis-Pt, C₆₀ фулерен та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс. Кожну групу мишей розділяли на підгрупи залежно від введеної дози сполуки:

- «C₆₀ фулерен» групу мишей розділяли на 6 підгруп, яким внутрішньочеревно вводили водний колоїдний розчин C₆₀ фулерену у дозах: 75, 150, 300, 600, 1200 і 1800 мг/кг маси тіла;
- «Cis-Pt» групу мишей розділяли на 3 підгрупи, яким внутрішньочеревно вводили розчин Cis-Pt у дозах: 7,5, 15 та 22,5 мг/кг маси тіла;
- «C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс» групу розділяли на 6 підгруп, яким внутрішньочеревно вводили водний розчин C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу у дозах: 15, 30, 45, 60, 75, 90 мг/кг маси тіла;
- у «Контрольній» групі мишам внутрішньочеревно вводили розчин 0,9% NaCl.

У кожній підгрупі було по 6 мишей. За поведінковою реакцією експериментальних тварин спостерігали щоденно, а у перший день через одну, три, шість та дванадцять годин після введення сполук. Тварин зважували на 0, 7 та 14 день експерименту. У тварин робили забір крові, проводили евтаназію із CO₂ і лапаротомію. Видалені органи (серце, печінка, нирки, селезінка, легені, яєчка, яєчники) зважували і оцінювали макроскопічно.

Токсикологічні дослідження C₆₀ фулерену, Cis-Pt та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу проведені за сприяння д.б.н., проф. Рибальченка В.К. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка).

2.27. Визначення напівлетальної дози (LD₅₀) сполук

Критерієм токсичності досліджуваних сполук був показник LD₅₀, який визначався за допомогою пробіт-аналізу [68]. Упродовж експерименту фіксували кількість загиблих мишей у кожній експериментальній групі. Загибель мишей у групах з 0% і 100% після введення сполуки за відповідних

доз було скореговано за формулою [192]: $100 \times (0,25/n)$ для 0% і $100 \times (n-0,25/n)$ для 100% померлих. Відсоток загиблих тварин для усіх досліджуваних груп розраховували за допомогою пробіт аналізу і програми StatPlus. Одержані значення пробіту будували залежно від логарифмічних значень доз (LgC) і, таким чином, було отримано значення LD₅₀.

2.28. Гематологічні дослідження

Кров для цитологічного аналізу відбирали зі стегнової вени мишей у пробірку з антикоагулянтом K₃EDTA (C-Sanguis Counting Kotrollblutherstellungs-und Vertriebs GmbH, ФРН). Визначали такі показники крові як кількість еритроцитів, концентрація гемоглобіну, гематокрит, середній об'єм еритроцита (MCV), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH), середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC), кількість лейкоцитів, тромбоцитів та ретикулоцитів з використанням загальноприйнятих методів [37].

Диференціальний аналіз лейкограм здійснювали на мазках крові, забарвлених за Паппенгеймом, підраховуючи 100 лейкоцитів, серед яких були базофільні, еозинофільні і нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити і моноцити. Мазки крові виготовляли за допомогою традиційного методу [37].

Гематологічні дослідження проведено за сприяння д.б.н., проф. Рибальченка В.К. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка)..

2.29. Дослідження морфофункціонального стану клітин кісткового мозку

Кількість мієлокаріоцитів у кістковому мозку досліджували за допомогою загальноприйнятого методу [22]. Для цього у мишей виділяли стегнову кістку, відсікали епіфізи і вимивали вміст діафізів 3% оцтовою кислотою в об'ємі 4 мл. Кількість мієлокаріоцитів і мегакаріоцитів підраховували з використанням камери Горяєва.

2.30. Цитоморфологічне дослідження внутрішніх органів

Шматочки печінки, нирки, серця, селезінки, мозку та пухлини експериментальних мишей товщиною 5-7 мм фіксували у 10% нейтрально-забуферному формаліні. Після промивання протоковою водою органи та пухлини зневоднювали в етиловому спирті за зростаючою концентрацією і парафінізували у блоки. Виготовлені гістологічні зрізи завтовшки 5 мкм фарбували гематоксиліном та еозином. Морфологічні особливості органів і тканин аналізували за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія) та камери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія).

Гістологічні дослідження проведено за сприяння д.б.н., проф. Рибальченка В.К. (Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка)..

2.31. Експериментальна модель пухлинного росту та схема введення досліджуваних сполук

Як модель пухлинного росту *in vivo* було використано перещеплювану солідну карциному легені Льюїс миші. Для цього клітини LLC (5×10^5 на тварину) імпантували внутрішньом'язево у задню праву кінцівку/бедро мишей-самців лінії C57Bl/6.

Експериментальні тварини (миші-пухлиноносії) на 2 добу після перещеплення пухлинних клітин рандомно за вагою розділяли на 4 групи:

- 1) у «Контрольній» групі мишам-пухлиноносіям внутрішньочеревно вводили фізіологічний розчин (0,9% NaCl);
- 2) у «C₆₀ фулерен» групі тваринам внутрішньочеревно вводили водний колоїдний розчин C₆₀ фулерену (у загальній дозі 3,75 мг/кг);
- 3) у «Cis-Pt» групі тваринам внутрішньочеревно вводили розчин Cis-Pt у 0,9% NaCl (у загальній дозі 3,75 мг/кг);
- 4) у «C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс» групі тваринам внутрішньочеревно вводили водний розчин C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу (у загальній дозі 7,5 мг/кг (C₆₀:Cis-Pt як 3,75:3,75 мг/кг)).

У кожній групі тварин-пухлиноносіїв знаходилося по 20 тварин, з них 12 тварин для дослідження виживаності та 8 тварин для вивчення протипухлинних ефектів досліджуваних сполук. Сполуки вводили внутрішньочеревно, починаючи з 2-ї доби після перещеплення пухлини, в об'ємі по 0,2 мл за такою схемою: 5 разів з інтервалом через 1 день (Рис. 2.5).

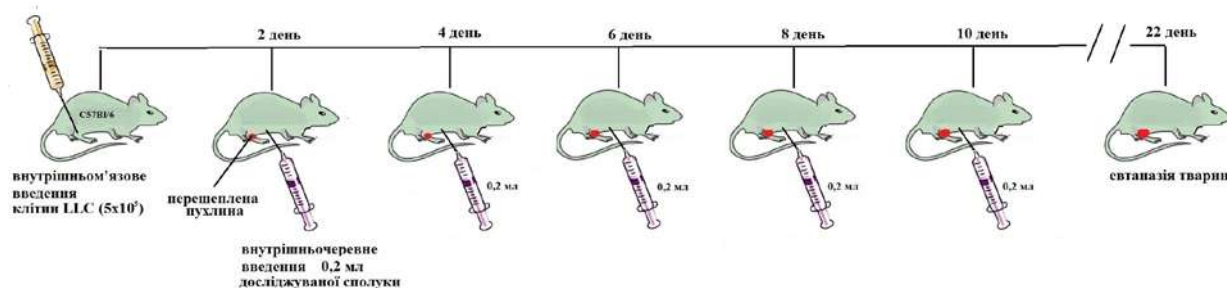


Рис. 2.5. Схема введення досліджуваних сполук експериментальним тваринам.

Для здійснення внутрішньочеревних ін'єкцій зафіксовану тварину тримали горизонтально, абдомінальною поверхнею до експериментатора. Препарати вводили у нижню ділянку живота. Місце введення дезінфікували 70% спиртовим розчином. Досліджувані сполуки вводили в об'ємі 200 мкл [51].

Забір крові у експериментальних тварин здійснювали із стегнової вени у пробірку з антикоагулянтном K₃EDTA (C-Sanguis Counting Kotrollblutherstellungs-und Vertriebs GmbH, ФРН). Аналіз показників крові здійснювали упродовж 2 год після забору крові за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора «Particle counter PCE-210 (ERMA Inc., Японія).

Евтаназію з використанням CO₂ експериментальних тварин проводили на 22-гу добу після перещеплення пухлини. Проводили лапаротомію експериментальних мишей, видаляли пухлину та легені і зважували.

Експерименти з мишами-пухлиноносіями проведено спільно з к.б.н., с.н.с. Діденком Г.В. (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького, НАН України м. Київ).

2.32. Оцінка виживаності мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс

Виживаність мишей-пухлиноносіїв (%) оцінювали у кожній групі щоденно з моменту перещеплення карциноми легені Льюїс до загибелі останньої експериментальної тварини [63]. У кожній експериментальній групі знаходилося по 12 тварин. Було оцінено такі показники тривалості життя експериментальних мишей-пухлиноносіїв:

1) середня тривалість життя (*СТЖ*) тварин (дні):

$$СТЖ = \frac{n_1 + n_2 + n_3 \dots + n_{12}}{N},$$

де n – кількість днів, які прожила кожна миша, N – загальна кількість мишей у групі;

2) подовження тривалості життя (*ПТЖ*) тварин (%):

$$ПТЖ = \frac{СТЖ_e - СТЖ_k}{СТЖ_k} \times 100\%,$$

де *СТЖ* - середня тривалість життя мишей-пухлиноносіїв у контрольній (k) та експериментальній (e) групах.

2.33. Оцінка протипухлинного ефекту у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс

2.33.1. Розмір і маса пухлинного вузла

Розмір перещепленої пухлини оцінювали щоденно у контрольній та експериментальних групах до моменту загибелі останньої тварини у контрольній групі. За допомогою штангенциркуля вимірювали більший (a , мм³) і менший (b , мм³) діаметри пухлини і розраховували об'єм пухлини (V , мм³) за формулою: $V = \frac{1}{2} \left(\frac{a+b}{2} \right)^3$ [415].

Розраховували середній об'єм пухлини у кожній експериментальній групі тварин.

Експериментальну тварину зважували, після евтаназії видаляли пухлину та зважували її. Масу тіла миші-пухлиноносія (Γ) виражали різницею між загальною масою тварини (Γ) і масою видаленої пухлини (Γ). Розраховували

середню масу тіла та пухлини у кожній експериментальній групі мишей-пухлиноносів.

2.33.2. Індекс гальмування пухлинного росту

Індекс гальмування пухлинного росту (ІГПР) (%) розраховували за формулою: $ІГПР = \frac{V_k - V_e}{V_k} \times 100\%$ [63], де V_k – середній об'єм пухлини у контрольній групі мишей-пухлиноносіїв у певній часовій точці (мм^3), а V_e – середній об'єм пухлини у експериментальній групі мишей-пухлиноносіїв у тій же часовій точці, що у контрольній групі (мм^3).

2.33.3. Цитоморфологічні особливості карциноми легені Льюїс

Пофарбовані гематоксилін-еозином гістологічні зрізи пухлини аналізували за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія) і камери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія). У пухлинній тканині також оцінювали наявність клітин з ознаками апоптозу і мітозу. Апоптичний індекс (АІ) розраховували за кількістю клітин з ознаками апоптозу і наявністю апоптичних тіл. Мітотичний індекс (МІ) розраховували шляхом підрахунку клітин з ознаками мітозу серед 1000 клітин. АІ та МІ виражали у відсотках від загальної кількості клітин.

2.34. Оцінка антиметастатичного ефекту

Метастази (кількість, розмір) у легенях оцінювали на 22-гу добу після перещеплення карциноми легені Льюїс мишам. Визначали середню вагу легень (g) у контрольній та експериментальній групах мишей-пухлиноносіїв. Лінійний розмір метастазних вузлів та їх кількість визначали на двох долях легені кожної миші під бінокуляр.

Об'єм метастазів у легенях (V_m , мм^3) визначали за формулою: $V_m = \frac{\pi d^3}{6}$ [415], де d – лінійний розмір метастазного вузла.

2.35. Ваговий індекс лімфоїдних органів

Ваговий індекс (Bi) лімфоїдних органів - селезінок та тимусів - розраховували у кожній експериментальній групі мишей-пухлиноносів за формулою: $Bi = \frac{m_o}{m} \times 1000$ [269], де m_o - маса органу (г), m - загальна маса тварини (г).

2.36. Статистична обробка отриманих результатів дослідження

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, зокрема за допомогою t-тесту, одно- та двофакторного дисперсійного аналізу (one-/two-way ANOVA). Відмінність показників при значеннях $p \leq 0,05$ вважалась статистично значущою [49]. Досліди проводили мінімум у трьох паралелях у кожному з варіантів. Побудову графіків та обробку даних здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2010 та GraphPad Prism 7. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного значення та середньоквадратичного відхилення ($M \pm SD$).

РОЗДІЛ 3

МЕМБРАНОТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ

Мембрани першими контактують з чужерідними молекулами і є універсальним бар'єром та мішенню для ліпофільних молекул, які вбудовуються у ліпідний бішар. Молекула C₆₀ фулерену характеризується гідрофобними властивостями, завдяки чому виявляє спорідненість до ліпідних компонентів мембран, взаємодія з якими може зумовлювати біологічну дію карбонової наноструктури. Однак, механізми взаємодії молекули C₆₀ з мембранами та проникнення всередину клітин є недостатньо вивченими. Для з'ясування цих питань було проведено модельні експерименти на штучних мембранах та на рівні клітин з використанням флуоресцентно міченого C₆₀ фулерену.

3.1. Взаємодія C₆₀ фулерену з штучними біліпідними мембранами

Взаємодію C₆₀ фулерену з біологічними мембранами досліджували з використанням штучних ліпідних мембран, які є зручною моделлю для вивчення механізмів проникнення сполук у клітини. Як модель було використано плівки Ленгмюра-Блоджетт, які формувалися при перенесенні моношарів фосфатидилхоліну:холестеролу з поверхні води на поверхню підкладинки шляхом її занурення у воду та виймання [97]. Даний метод дозволяє отримувати багатошарові молекулярні структури, які є подібними за структурною організацією з клітинними мембранами, а також варіювати молекулярний склад моношару та вбудовувати у нього різні молекули [62].

З метою візуалізації взаємодії карбонової наноструктури з штучними ліпідними мембранами молекулу C₆₀ було функціоналізовано міткою флуоресцеїн-5-ізотіоціанату (FITC) (Рис. 2.1а). Флуоресцентно мічене похідне C₆₀ фулерену N-флуоресцеїн-5-ізотіоціанат-піролідин-C₆₀ (C₆₀-FITC) вводили у ліпідний бішар за допомогою технології Ленгмюра-Блоджетт та досліджували

їх розподіл у мембранній структурі з використанням мікроскопії. Флуоресцентно мічену наноструктуру 10 мкМ C_{60} -FITC вносили у субфазу, на поверхню деіонізованої води, наносили суміш фосфатидилхолін:холестерол та створювали вертикальні ліпідні плівки на поверхні підкладки.

Взаємодію молекул C_{60} із штучними біліпідними мембранами (БЛМ) оцінювали за допомогою просвічуючої та флуоресцентної мікроскопії (Рис. 3.1) [436]. На мікрофотографії з просвічуючої мікроскопії (Рис. 3.1a) показано, що карбонова наноструктура щільно розташовувалася на поверхні бішару. При флуоресцентній мікроскопії (при $\lambda_{ex}=460$ нм для збудження FITC) спостерігалася інтенсивна флуоресценція C_{60} -FITC як на поверхні ліпідних плівок, так і у їх гідрофобних ділянках (Рис. 3.1b). При мікроскопії візуалізувалися окремі наноструктури без їх агрегації у кластери. Інтенсивність флуоресценції міченого фулерену знижувалася при його проникненні у більш глибокі ділянки БЛМ, про що свідчило зниження інтенсивності флуоресцентного сигналу.

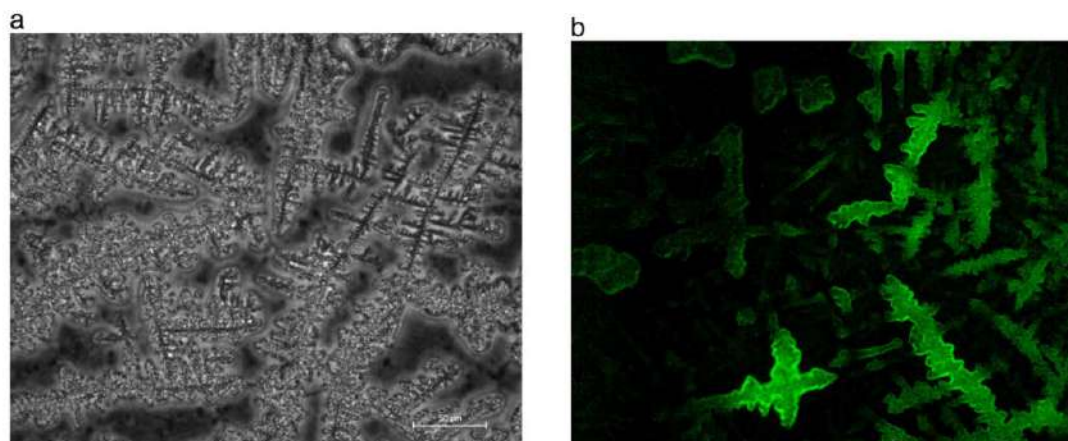


Рис. 3.1. Мікрофотографії ліпідних мембран (фосфатидилхолін:холестерол) з вбудованим флуоресцентно міченим похідним C_{60} фулерену N-флуоресцеїн-5-ізотіоціанат-піролідин- C_{60} (C_{60} -FITC) (10 мкМ) отримані за допомогою мікроскопії просвічуючої (a) та флуоресцентної (b). (Флуоресцентний мікроскоп Nikon Eclipse TS100, $\lambda_{ex}=460$ нм). Шкала 50 мкм.

Таким чином, з використанням модельних біологічних мембран показано здатність C_{60} фулерену взаємодіяти з ліпідним бішаром та локалізуватися у гідрофобних ділянках його матриксу.

Існує низка літературних даних, які підтверджують взаємодію C_{60} фулерену з модельними біологічними мембранами. Так, молекулярний докінг показав здатність поодиноких молекул C_{60} та їх кластерів дифундувати через бішар різного складу, зокрема диміристоїлфосфатидилхоліновий [290], дипальмітоїлфосфатидилхоліновий [335], пальмітоолеоїлгліцерофосфохоліновий [424] та локалізуватися у гідрофобних ділянках [151]. Фулерени змінювали структурні та еластичні властивості БЛМ, але цього було недостатньо для механічного пошкодження мембрани [149, 405, 507].

У наших дослідженнях виявлено концентраційно-залежний вплив C_{60} фулерену на електричні властивості ліпідного бішару у гідрофобній ділянці, зокрема за дії >100 мкМ C_{60} зростали показники питомої провідності та ємності БЛМ [385], тоді як за дії <100 мкМ C_{60} таких ефектів не спостерігалось. У роботі [290] показано, що агрегати C_{60} фулеренів, які утворюються за високих концентрацій молекул C_{60} , спричиняли деформацію БЛМ (диміристоїлфосфатидилхолін).

Припускалося, що зміна електричних властивостей БЛМ за високих концентрацій C_{60} фулерену може бути спричинена порушенням структури мембрани за рахунок неспецифічної взаємодії кластерів C_{60} із залишками жирних кислот у гідрофобній ділянці бішару та дефектами молекул мембранних фосfolіпідів, зокрема фосфатидилхоліну.

Авторами [545] виявлено стабілізуючу дію молекул C_{60} на одно- та багатошарові ліпідні структури (80% пальмітоїлолеоїлгліцерофосфохолін: 20% холестерол), що дозволяє використовувати фулерени C_{60} з метою ціленаправленої доставки лікарських препаратів у складі міцел або ліпосом.

Отже, результати модельних експериментів свідчать про здатність C_{60} фулерену взаємодіяти з мембранним ліпідним бішаром. Припускається декілька механізмів проникнення молекул C_{60} всередину бішару:

- через транзійтні мікропори або шляхом адсорбції за рахунок гідрофобної взаємодії між молекулами C_{60} і хвостами жирнокислотних залишків у складі гліцерофосфоліпідів [405];
- шляхом адсорбції за рахунок дисперсійних взаємодій [290];
- шляхом дифузії за рахунок зниження вільної енергії при переході молекул C_{60} з водної фази у гідрофобне середовище бішару [91].

Наступним етапом було оцінити проникнення C_{60} фулерену через плазматичну мембрану (ПМ) у клітину та його внутрішньоклітинну локалізацію.

3.2. Проникнення C_{60} фулерену у клітини

Нами було досліджено проникнення немодифікованого C_{60} фулерену у клітини HEK293 (ембріональної нирки людини) та клітини лейкемії ліній CCRF-CEM та L1210. Оскільки інтенсивність флуоресценції молекули C_{60} є дуже низькою, тому внутрішньоклітинне накопичення карбонової наноструктури оцінювали з використанням флуоресцентних міток.

У необроблених клітин HEK293 була відсутньою неспецифічна зелена флуоресценція (Рис. 3.2А), тоді як після інкубації з флуоресцентно міченим C_{60} фулереном 1-[3-(5-метил-2-(піридин-2-іл)-1,3-тіазол-4-оксикарбоніл)пропіл]-1-фенил-[6.6] C_{61} (20 мкМ) через 6 годин, спостерігався зелений флуоресцентний сигнал ($\lambda_{ex}=488$ нм). Інтенсивність флуоресценції оцінювали за допомогою програмного забезпечення BD FACS™ software. Зображення фазово-контрастної і флуоресцентної мікроскопії підтвердило внутрішньоклітинне накопичення міченого C_{60} фулерену в клітинах HEK293. Додаткове фарбування клітин ДНК-зв'язувальним барвником Hoechst33342 підтвердило позаядерну локалізацію міченого C_{60} фулерену в клітинах HEK293 (Рис. 3.3).

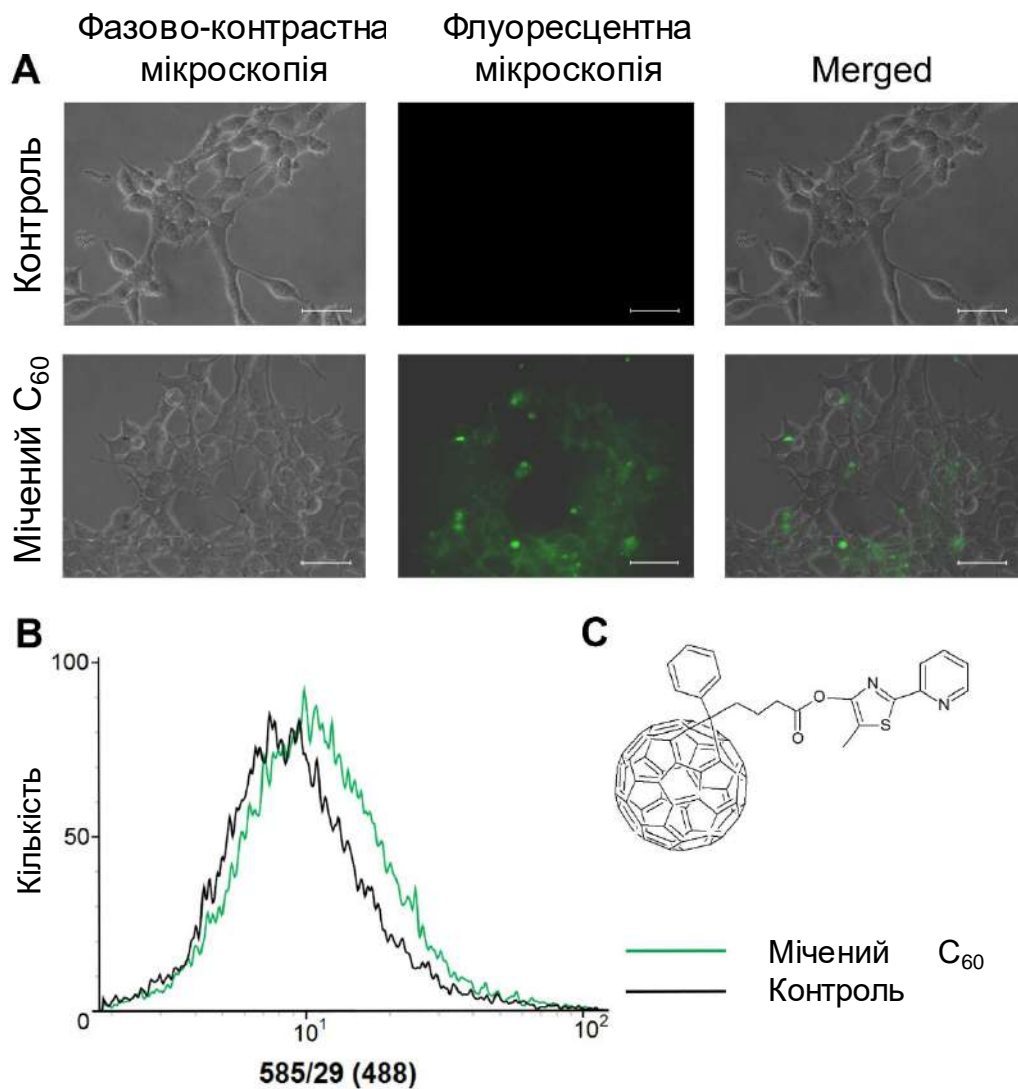


Рис. 3.2. Внутрішньоклітинне накопичення міченого C₆₀ фулерену (20 мкМ) у клітинах HEK293 через 6 год інкубації: **А** – фазово-контрастна і флуоресцентна мікроскопія (шкала 20 мкм); **В** - протокова цитофлуориметрія; **С** - хімічна структура міченого C₆₀ фулерену

За допомогою протокової цитофлуориметрії було оцінено інтенсивність сигналу флуоресценції у клітинах HEK293 (Рис. 3.2В). Автофлуоресценцію клітин без добавок використовували як негативний контроль. Флуоресцентний розподіл у клітинах HEK293 інкубованих з міченим C₆₀ фулереном на гістограмі FACS зміщувався вправо, виявлено відносно незначне накопичення карбонових наночастинок у нормальних клітинах.

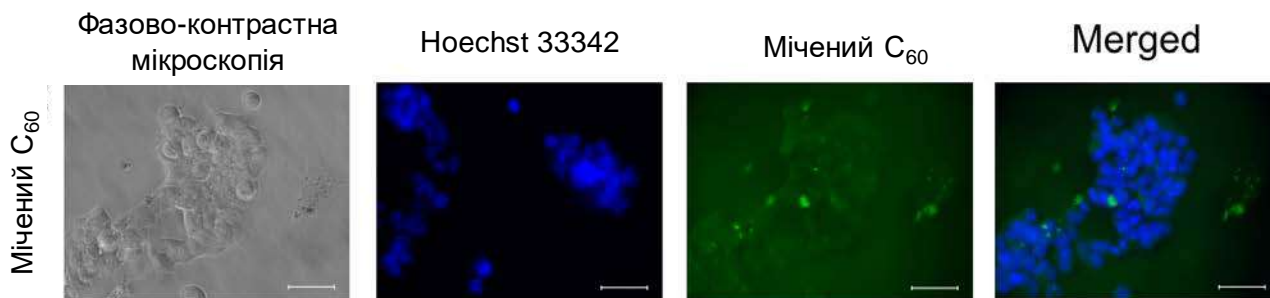


Рис. 3.3. Фазово-контрастна і флуоресцентна мікроскопії (блакитний для Hoechst33342 і зелений для міченого C_{60} фулерену) клітин HEK293 інкубованих з міченим C_{60} фулереном (20 мкМ); шкала 20 мкм.

Отже, за допомогою флуоресцентного аналізу показано проникнення міченого C_{60} фулерену через плазматичну мембрану та його локалізацію у цитоплазмі клітин HEK293.

Локалізацію фулеренів було зафіксовано у різних компартментах нормальних клітин, зокрема, немодифікованих C_{60} фулеренів у цитоплазмі кератиноцитів HaCaT людини [226], C_{60} фулеренів диспергованих у тетрагідрофурані на плазматичній і ядерній мембранах, у цитоплазмі та внутрішньоклітинних компартментах – ядрі, лізосомах, мітохондріях, рибосомах і ендоплазматичному ретикулумі макрофагів [383], тербій-ендодральних C_{60} фулеренів - в мембранах ядра макрофагів RAW 264.7 мишей [424], водорозчинного похідного $[^{14}C]-C_{61}(CO_2H)_2$ - в мітохондріях фібробластів нирок мавпи [174].

Наступним етапом роботи було дослідити проникнення C_{60} фулерену у клітини лейкемії. Проникнення C_{60} фулерену всередину клітин L1210 оцінювали з використанням флуоресцентно міченого C_{60} , який був отриманий шляхом ковалентної кон'югації молекули C_{60} з родаміном В-ізотіоціанатом (C_{60} -RITC) (Рис. 2.1В).

Клітини лейкемії інкубували з C_{60} -RITC упродовж різних часових проміжків, зображення клітин аналізували методом конфокальної мікроскопії з використанням аргонного лазера ($\lambda=543$ нм) для збудження RITC (Рис. 3.4).

Інтенсивність флуоресценції оцінювали за допомогою програми Zeiss LSM Image Browser.

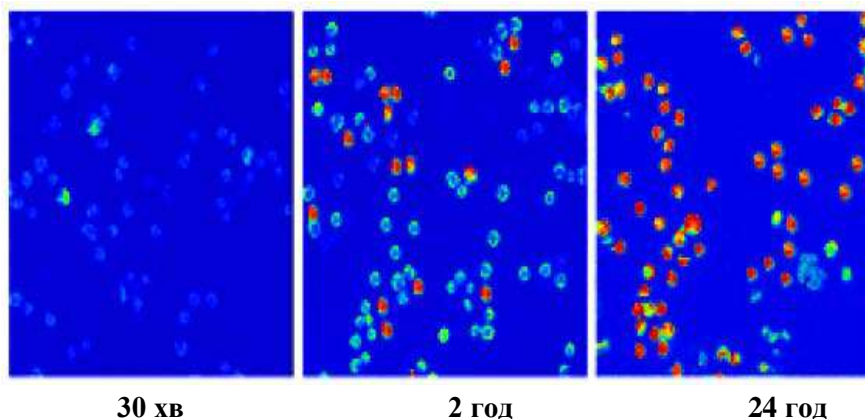


Рис. 3.4. Конфокальні знімки клітин L1210 після інкубації із C₆₀ фулереном – RITC (20 мкМ).

Показано, що через 30 хв інкубації з C₆₀-RITC зафарбованою була лише частина клітин L1210 (Рис. 3.4). Через 2 год рівномірно профарбованою була плазматична мембрана клітин та спостерігалась внутрішньоклітинна флуоресценція міченого фулерену. Після 24 год інкубації клітин з C₆₀-RITC було зафіксовано інтенсивну внутрішньоклітинну флуоресценцію більшості клітин. Слід зазначити, що продемонстрована нами значна флуоресценція клітин через 24 год після інкубації з міченим C₆₀ фулереном свідчить не лише про накопичення, але й про тривале утримання фулерену C₆₀ у внутрішньоклітинному середовищі клітин лімфоцитарного лейкозу.

Отже, показано поглинання та внутрішньоклітинне накопичення карбонової наноструктури, однак недостатньо вивченими є її субклітинна локалізація, а також реалізація ефектів C₆₀ фулерену на рівні внутрішньоклітинних компартментів.

Внутрішньоклітинний розподіл C₆₀ фулерену вивчали за допомогою флуоресцентного імуноцитохімічного фарбування клітин CCRF-CEM (гостра лімфобластна лейкемія) з використанням FITC-мічених антитіл до молекул C₆₀, мітохондрійного барвника MitoTracker Orange та ядерного барвника DAPI. Не виявлено значної неспецифічної зеленої FITC-флуоресценції у контрольних клітинах (без добавок), інкубованих за відсутності C₆₀ фулерену (Рис. 3.5А), а

також у ядрі CCRF-CEM клітин пофарбованих DAPI через 24 год інкубації з C_{60} фулереном (Рис. 3.5В).

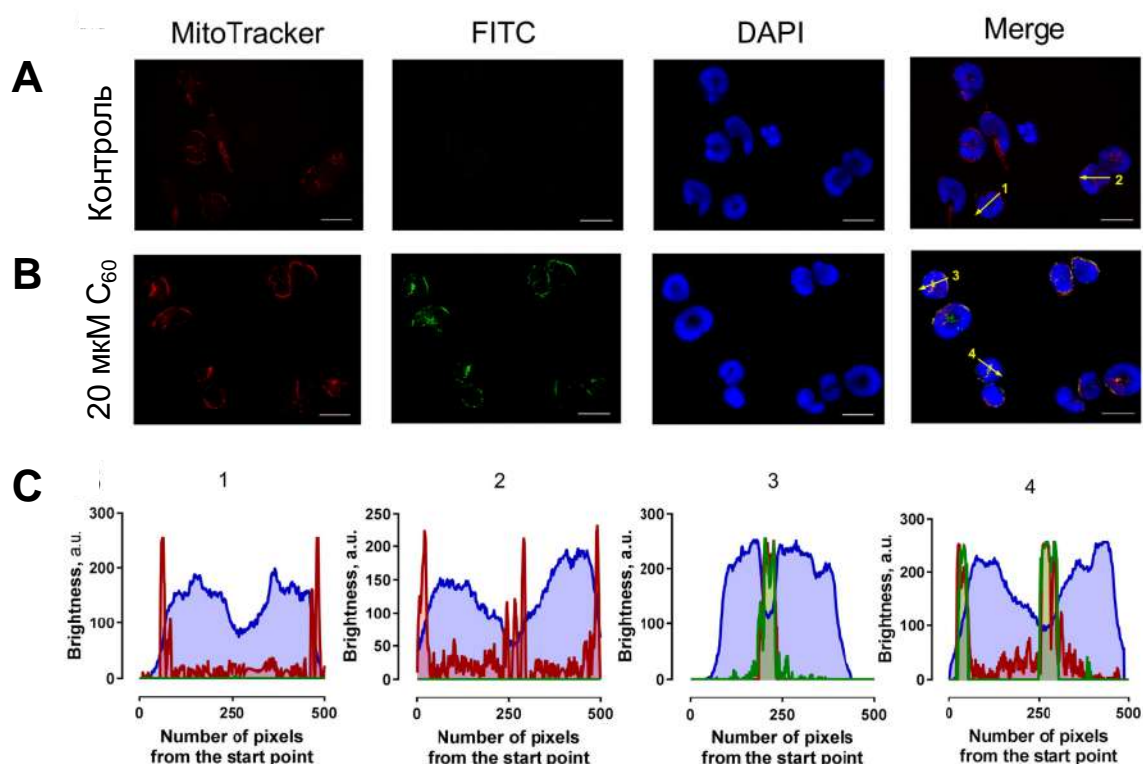


Рис. 3.5. Внутрішньоклітинна локалізація C_{60} фулерену в клітинах CCRF-CEM гострої лімфобластної лейкемії людини. Конфокальні знімки клітин CCRF-CEM пофарбованих барвником MitoTracker (червоний колір), барвником DAPI (синій колір) і FITC-міченими антитілами до C_{60} фулерену (зелений колір): **A** - контрольні клітини, **B** - клітини, інкубовані упродовж 24 год у присутності C_{60} фулерену (20 мкМ); шкала 20 мкм; **C** – флуоресцентні профілі однієї клітини вздовж жовтих стрілок: 1, 2 – контрольні клітини, 3, 4 – клітини, інкубовані упродовж 24 год у присутності C_{60} фулерену (20 мкМ).

З використанням FITC-мічених антитіл до молекул C_{60} та мітохондрійного маркера MitoTracker Orange показано, що зелений флуоресцентний сигнал C_{60} фулерену виявляється там же, де і мітохондрійний сигнал (Рис. 3.5В стрілки). Згідно профілів інтенсивності флуоресцентних каналів (Рис. 3.5С) для окремих клітин виявлено перекриття сигналів зеленого C_{60} фулерену і червоного мітохондрій. Ці дані підтверджують локалізацію C_{60} фулерену в мітохондріях лейкемічних клітин людини. З використанням

високоєфективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії (HPLC-ESI-MS) було показано, що у мітохондрійній фракції клітин CCRF-CEM через 24 год фіксувалося <180 нг/ 10^6 клітин C_{60} фулерену, що складало 72% від загального вмісту карбонової структури у клітинному екстракті [198].

Отримані нами дані демонструють, що C_{60} фулерен переважно накопичується в мітохондріях, що можна пояснити високою електронегативністю молекули C_{60} і як результат чутливістю до мітохондрій-асоційованого пулу протонів [128, 427]. Згідно чисельних розрахунків в межах теорії функції густини C_{60} фулерен дифундує у протонований міжмембранний простір мітохондрій, де взаємодіє з 6 протонами, набуваючи позитивного заряду [220]. Це явище поширене для інших негативно заряджених карбонових наночастинок, таких як одностінні карбонові нанотрубки [538-539], які локалізувалися в мітохондріях різних клітин (ASTC-a-1, MCF 7, COS 7, EVC304 і RAW264.7) [538].

Підтвердженням продемонстрованої нами внутрішньоклітинної локалізації C_{60} фулерену у лейкемічних клітинах є низка літературних даних щодо поглинання немодифікованого фулерену злоякісними клітинами. Так, методом конфокальної мікроскопії виявлено локалізацію C_{60} фулерену у цитозолі клітин раку молочної залози MDA-MB-231 [288], гепатоми RH-35 [291], гострої лейкемії Jurkat [411], у перенуклеарній ділянці клітин фібросаркоми HT1080 [81] та у ядрі клітин раку печінки ліній Hep3B і Huh7 [413]. З використанням міченого 5-амінофлуоресцеїном C_{60} фулерену продемонстровано його локалізацію у цитоплазмі клітин мієлоїдної лейкемії людини лінії K562S та на мембрані клітин лінії K562R [514].

Проникнення молекул C_{60} у клітину відбувається без механічного пошкодження мембран. Припускають, що механізмами внутрішньоклітинного проникнення фулеренів є пасивний транспорт через канали чи пори [405], активний транспорт за допомогою клатрин-залежного [175, 291], або кавеол-опосередкованого [295, 424] ендцитозу, а також фагоцитозу [81].

Таким чином, C_{60} фулерен може не лише вбудовуватись у ліпідний матрикс штучних мембран, але й проникати крізь клітинну мембрану та

локалізуватися всередині клітин. За допомогою флуоресцентної мікроскопії виявлено внутрішньоклітинну локалізацію міченого C₆₀ фулерену у нормальних та злякано трансформованих клітин. Більш детальне вивчення внутрішньоклітинної локалізації показало накопичення молекул C₆₀ у мітохондріях клітин CCRF-CEM. Оскільки виявлена нами динаміка поглинання C₆₀ фулерену клітинами лейкемії була пролонгованою у часі, не виключено, що C₆₀ фулерен потрапляє у клітини шляхом безрецепторного ендцитозу, який є уповільненим процесом порівняно з дифузією.

Взаємодія з біологічними мембранами, проникнення, внутрішньоклітинна локалізація та накопичення всередині клітин відіграють важливу роль у визначенні біологічної активності C₆₀ фулерену.

Висновки до РОЗДІЛУ 3:

C₆₀ фулерен взаємодіяв зі штучним ліпідним бішаром та локалізувався у гідрофобних ділянках його матриксу.

C₆₀ фулерен проникав крізь клітинну мембрану та локалізувався у цитоплазмі клітин HEK293 ембріональної нирки людини та клітин L1210 лімфоцитарної лейкемії миші. Виявлено локалізацію карбонової наноструктури у мітохондріях клітин CCRF-CEM гострої лімфобластної лейкемії людини.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [179, 198, 385, 391, 436].

РОЗДІЛ 4

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ НА КЛІТИННОМУ РІВНІ

Необхідною умовою дослідження біологічної активності C₆₀ фулерену є встановлення діапазону концентрацій, за яких карбонова наноструктура не спричиняє негативних біологічних ефектів у нормальних клітинах, однак здатна спричиняти токсичну дію на злоякісно трансформовані клітини.

Відомості щодо концентраційної залежності біологічних ефектів фулерену є досить суперечливими, оскільки вони залежать від концентрації наноструктури, тривалості інкубації клітин, способу модифікації поверхні молекули C₆₀, природи замісників, розміру похідного тощо [136-137, 195, 471, 503].

Біологічні ефекти немодифікованого C₆₀ фулерену на клітинному рівні залишаються недостатньо з'ясованими, чому й були присвячені наші подальші дослідження.

4.1. Оцінка впливу C₆₀ фулерену на нормальні клітини

4.1.1. Життєздатність та активність антиоксидантних ензимів тимоцитів за дії C₆₀ фулерену

Для з'ясування залежності біологічних ефектів C₆₀ фулерену від концентрації було обрано діапазон 5-100 мкМ, за якого діють більшість біологічно активних природніх антиоксидантів та прооксидантів.

Вплив C₆₀ фулерену на життєздатність тимоцитів досліджували за допомогою МТТ-тесту. Тимоцити як неповністю диференційовані попередники лімфоцитів крові характеризуються достатньо високою метаболічною активністю та вищою, порівняно з іншими клітинами, нестабільністю генома. Використання суспензії ізольованих тимоцитів дозволяє оцінити ефекти, не опосередковані процесами, які відбуваються на органному та організменному рівнях.

Життєздатність тимоцитів було досліджено упродовж 24-годинної інкубації клітин за присутності C_{60} фулерену у концентраціях 5, 10 та 100 мкМ. Життєздатність тимоцитів у суспензії без додавання C_{60} фулерену (контроль) приймали за 100%.

Життєздатність тимоцитів упродовж 24 год інкубації з C_{60} фулереном у концентрації 5 та 10 мкМ залишалася на рівні контролю (Рис. 4.1). За присутності 100 мкМ C_{60} відмічено двоякий вплив, а саме на ранніх етапах інкубації (через 6 год) життєздатність тимоцитів незначно (на $17\pm 2\%$) зростала, тоді як за тривалої інкубації (через 24 год) показник знижувався (на $20\pm 1\%$). Підвищення життєздатності тимоцитів за дії 100 мкМ C_{60} свідчить про посилення їх проліферативної активності, як початкова адаптивна відповідь клітин на дію наносполуки, тоді як при подальшій інкубації клітин спостерігався її інгібуєчий ефект.

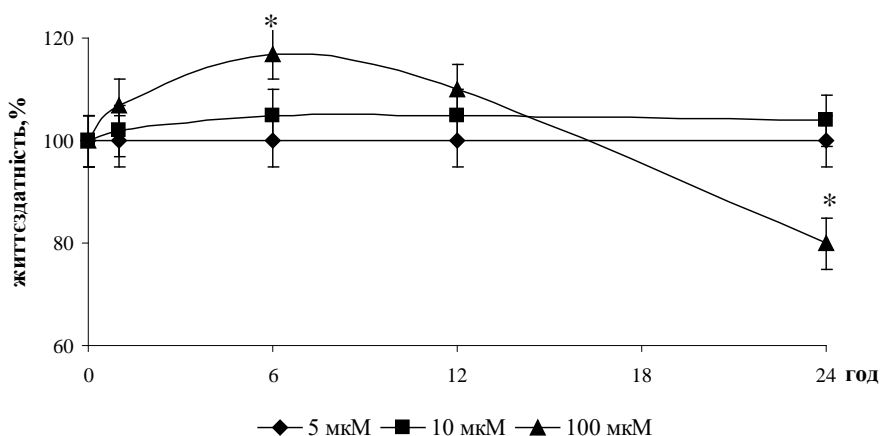


Рис. 4.1. Життєздатність тимоцитів (% від контролю) за інкубації з C_{60} фулереном ($M\pm m$, $n=8$). $*p < 0,05$ порівняно з контролем

Отримані дані щодо відсутності токсичного впливу C_{60} фулерену за досліджуваних концентрацій на тимоцити узгоджуються із літературними даними. Так, авторами [439] показано, що немодифікований C_{60} фулерен проникав і накопичувався у кератиноцитах людини, не спричиняючи токсичних ефектів. Не виявлено токсичного ефекту немодифікованого C_{60} фулерену у діапазоні концентрацій 13-277 мкМ у іморталізованих MCF10A клітинах молочної залози [288], а також 1,38-13,8 мкМ C_{60} у PC-12 клітинах спінального

ганглію щура [278] та 69-417 мкМ C_{60} у клітинах VHR-21 нирки новонародженого хом'яка [303].

Токсична дія немодифікованого C_{60} фулерену на нормальні клітини виявлялася лише за високих концентрацій сполуки (>100 мкМ) та була зумовлена способом приготування та розчинення, чистотою колоїдного розчину, а також розміром агломератів. Так, 139 мкМ C_{60} фулерен виявляв токсичну дію щодо клітин ендотелія пупкової вени людини (HUVECs) [190] і клітин PC-12 спінального ганглію щура [278], 213 мкМ C_{60} щодо кератиноцитів HaCaT людини [226] та 444 мкМ C_{60} щодо клітин VHR-21 нирки новонародженого хом'яка [303].

Отже, згідно наших даних немодифікований C_{60} фулерен у діапазоні концентрацій 5 та 10 мкМ не виявляв цитотоксичного впливу на ізольовані тимоцити. 100 мкМ C_{60} спричиняв цитотоксичну дію лише за тривалої інкубації (через 24 год), про що свідчило зниження їх життєздатності.

Відомо, що C_{60} фулерен виявляє антиоксидантні властивості. Так, порівняльне дослідження антиоксидантних властивостей, показало що C_{60} фулерен діяв у діапазоні нижчих концентрацій (10^{-6} - 10^{-4} М), порівняно із відомим антиоксидантом аскорбіновою кислотою (10^{-4} - 10^{-2} М) та виявляв кращі захисні ефекти щодо гладеньком'язових клітин (A7r5 аорти щура та CASMC коронарної артерії людини) і лімфоцитів людини (CEM) [311].

Наступним завданням було оцінити вплив C_{60} фулерену на активність основних ензимів антиоксидантної системи (АОС) - супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) і глутатіон-залежних глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) та глутатіон-S-трансферази (ГТ, КФ 2.5.1.18), які беруть участь у запобіганні надмірного утворення АФК у клітині та нейтралізації їх ушкоджувальної дії в організмі.

Антиоксидантні властивості C_{60} фулерену вивчали за концентрації 10 мкМ, оскільки за цієї концентрації він не впливав на життєздатність тимоцитів. Дані щодо питомої активності антиоксидантних ензимів у тимоцитах наведено у табл. 4.1.

Активність досліджуваних ензимів АОС тимоцитів через 3 год інкубації з C₆₀ фулереном залишалася на рівні контролю. Відсутність змін у активності антиоксидантних ензимів за дії C₆₀ фулерену свідчить про те, що молекула C₆₀ не спричиняє продукування АФК у тимоцитах.

Таблиця 4.1

Супероксиддисмутазна, глутатіонпероксидазна та глутатіонтрансферазна активність тимоцитів у контролі та за інкубації з 10 мкМ C₆₀ фулереном (M±m, n=5)

Умови експерименту	Ензиматична активність		
	супероксид-дисмутазна, ум.од./ мг білка	глутатіон-пероксидазна, нмоль GSSG/ (мг білка X хв)	глутатіон-трансферазна, нмоль кон'югату/ (мг білка X хв)
Без добавок	2,71±0,10	3,1±0,2	41,90±2,07
+ C ₆₀	2,45±0,09	3,7±0,2	44,10±2,09

Таким чином, 10 мкМ C₆₀ фулерен не спричиняє негативних біологічних ефектів у нормальних клітинах, а саме не впливає на життєздатність та активність антиоксидантних ензимів тимоцитів.

Наступним завданням було дослідити захисні ефекти C₆₀ фулерену як сполуки з антиоксидантним потенціалом від ушкоджувальної дії пероксиду водню та цисплатину як індукторів окисного стресу та апоптогенних чинників на нормальні клітини.

4.1.2. Захисні ефекти C₆₀ фулерену від дії пероксиду водню та цисплатину на тимоцити та еритроцити

Для дослідження захисних ефектів C₆₀ фулерену у нормальних клітинах (тимоцитах та еритроцитах щура) нами було обрано пероксид водню та цисплатин. Пероксид водню є визнаним індуктором окисного стресу та клітинної загибелі, зокрема апоптозу [6, 245, 320]. H₂O₂ є відносно стабільним інтермедіатом із помірною оксидативною активністю, проте він здатен проникати через біологічні мембрани, дифундувати у внутрішньоклітинному просторі та ініціювати ланцюгові реакції утворення АФК. Завдяки системі

антиоксидантного захисту внутрішньоклітинна концентрація H_2O_2 в нормі утримується на рівні 10^{-9} – 10^{-7} М. У разі перевищення фізіологічного рівня H_2O_2 клітина може зазнавати загибелі, спричиненої не так впливом на метаболізм тіолів, як посиленням генерування кисневмісних радикалів у внутрішньоклітинному просторі внаслідок інтенсифікації реакції Фентона [134, 465]. Цитотоксичну дію H_2O_2 на нормальні клітини вивчали за концентрації 100 мкМ, оскільки ця концентрація є ефективною для продукування АФК та зниження життєздатності як нормальних, так і злоякісно трансформованих клітин [5].

Цисплатин є цитостатиком, що виявляє антипроліферативний ефект через ушкодження ДНК, проте відомі позаядерні механізми його токсичної дії, яка супроводжується надмірною продукцією АФК [237] та загибелю клітин за низьких концентрацій (≤ 100 мкМ) шляхом апоптозу [338] і за високих концентрацій (>100 мкМ) шляхом некрозу [314].

Незважаючи на високу ефективність цисплатину, його використання у терапевтичних дозах обмежується токсичною дією на нормальні клітини [102, 227]. Концентраційний діапазон, у межах якого досліджують токсичну дію цисплатину *in vitro* є доволі широким від 1 до 100 мкМ [369]. Нами було оцінено токсичну дію цисплатину на нормальні клітини у низьких концентраціях - 3,3 та 16,7 мкМ окремо та за преінкубації з C_{60} фулереном.

Захисні ефекти C_{60} фулерену від ушкоджувальної дії 100 мкМ H_2O_2 та 3,3 і 16,7 мкМ цисплатину у нормальних клітинах оцінювали за такими показники як продукування АФК та життєздатність тимоцитів, а також стійкість еритроцитів до гемолізу.

Чутливим способом оцінки продукування АФК у клітинах вважається метод із застосування флуоресцентного зонду 2',7'-дихлорфлуоресцеїна діацетата (DCF-DA). Цей зонд здатен проникати через плазматичну мембрану клітини, деацильоватися за участі внутрішньоклітинних естераз з утворенням нефлуоресцентної форми DCFH, що за дії внутрішньоклітинних активних форм кисню окиснюється до флуоресцентної форми DCF [162].

Характер зміни інтенсивності флуоресценції зонда у разі внесення до суспензії необроблених тимоцитів (контроль) (Рис. 4.2, крива 1) відображає динаміку його входження всередину клітин, дозволяє оцінити необхідний для цього період часу (до 10 хв), а також визначити рівень АФК, що утворюються у тимоцитах ендогенно.

Раніше вважалось, що DCF є індикатором вмісту H_2O_2 , однак, пізніше продемонстровано, що механізмом окиснення DCF за дії H_2O_2 є утворення ROO^\cdot та OH^\cdot , адже процес вимагає обов'язкової присутності $Fe(II)$ та пероксидази [347]. Оскільки окиснення DCF всередині клітини спричинене не H_2O_2 безпосередньо (таке окиснення є дуже уповільненим), а опосередковане H_2O_2 -залежними внутрішньоклітинними реакціями з утворенням АФК, флуоресценцію зонду вважають не кількісним індикатором вмісту H_2O_2 , а маркером окисного стресу у клітині [31, 74].

Слід зазначити, що DCFH може окиснюватись не лише АФК, але і гемвмісними протеїнами, зокрема цитохромом *c*, який вивільнюється з мітохондрій у цитоплазму внаслідок ушкоджувальної дії H_2O_2 [347]. Тому зонд DCFH може розглядатись як ефективний і чутливий індикатор не лише продукування АФК, але і цитотоксичності.

Вплив C_{60} фулерену на продукування АФК у тимоцитах оцінювали за різних умов постановки експерименту: внесення 10 мкМ C_{60} фулерену у пробу одночасно з 100 мкМ H_2O_2 або ж внесення 100 мкМ H_2O_2 у пробу після преінкубації клітин з 10 мкМ C_{60} фулереном.

Внесення 10 мкМ C_{60} фулерену одночасно з H_2O_2 не впливало на кінетику спричиненого пероксидом водню продукування АФК (Рис. 4.2, криві 2 та 3), дані вказують на те, що молекула C_{60} не взаємодіє з H_2O_2 поза клітиною.

Згідно літературних даних, час необхідний для проникнення молекули C_{60} через плазматичну мембрану та накопичення всередині клітин різних типів коливається від 30 хв до 4 год [174]. Тому за іншої постановки експерименту тимоцити попередньо інкубували з 10 мкМ C_{60} упродовж 1 год. У разі дії 100 мкМ H_2O_2 на преінкубовані з C_{60} клітини швидкість продукування АФК пригнічувалась, а їх рівень падав (Рис. 4.2, крива 4).

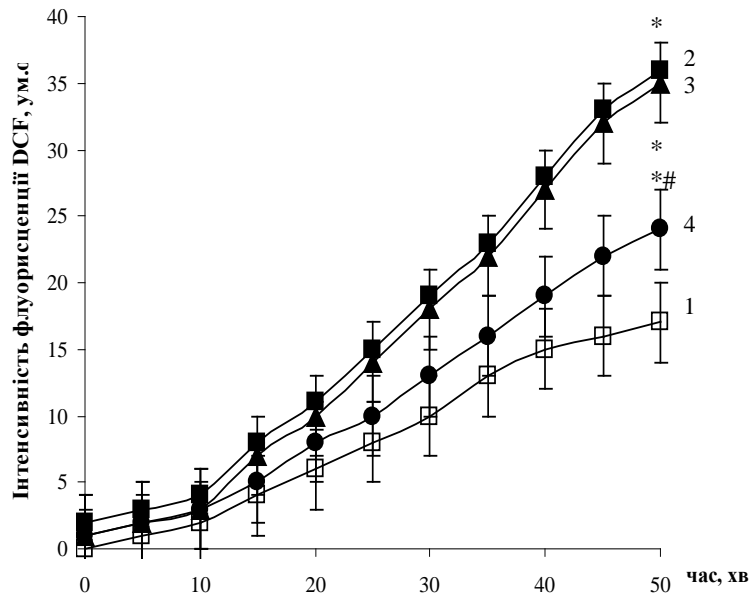


Рис. 4.2. Динаміка продукування АФК у тимоцитах за дії 100 мкМ H₂O₂ та 10 мкМ C₆₀ фулерену. 1 - контроль; 2 - внесення H₂O₂; 3 - одночасне внесення C₆₀ фулерену та H₂O₂; 4 - внесення H₂O₂ після попередньої 1-годинної преінкубації клітин з C₆₀ фулереном (M±m, n=6). *p<0,05 порівняно з показником у контролі, #p<0,05 порівняно з показником за дії 100 мкМ H₂O₂

Отже, отримані дані показали, що C₆₀ фулерен здатен втручатись у процес продукування АФК у тимоцитах, пригнічуючи пероксид-індуковане продукування АФК, та виявляти антиоксидантний ефект.

Для перевірки того, чи позначається виявлений антиоксидантний ефект C₆₀ фулерену на життєздатності оброблених пероксидом водню тимоцитів було використано МТТ-тест. Швидкість реакції відновлення МТТ у клітинах оцінювали через 1 та 3 год після внесення 100 мкМ H₂O₂ у середовище інкубації. Пероксид водню спричиняв зниження життєздатності тимоцитів, вже через 1 год на 28%, а через три години – на 43% порівняно з контролем (Табл. 4.2).

У разі додавання H₂O₂ до тимоцитів, що були преінкубовані з C₆₀ фулереном, життєздатність клітин через 1 год відновлювалася до контрольних значень (Табл. 4.2). Захисний ефект C₆₀ фулерену також виявлено і у віддаленіший термін – через 3 год після внесення H₂O₂. Так, за преінкубації з

C₆₀ фулереном життєздатність тимоцитів була вищою на 23 та 21% через 1 та 3 год після дії пероксиду водню порівняно з його окремою цитотоксичною дією.

Таблиця 4.2

Життєздатність тимоцитів (%) за дії пероксиду водню та C₆₀ фулерену

(M±m, n=8)

Умови експерименту	Термін інкубації	
	1 год	3 год
Контроль (без добавок)	100 ± 9,0	100 ± 9,5
+ 100 мкМ H ₂ O ₂	72 ± 6,7*	57 ± 5,1*
+ 1 год преінкубація з 10 мкМ C ₆₀ + 100 мкМ H ₂ O ₂	95 ± 8,9*#	78 ± 7,4*#

*p < 0,05 порівняно з показником у контролі

#p < 0,05 порівняно з показником за дії 100 мкМ H₂O₂

Отже, з використанням флуоресцентного зонду DCF-DA показано H₂O₂-індуковане продукування АФК у тимоцитах. Преінкубація клітин з C₆₀ фулереном призводить до зниження рівня АФК утворюваних за дії H₂O₂ та до попередження його цитотоксичної дії. Ці дані демонструють, по-перше, що у тимоцитах реалізується антиоксидантний ефект C₆₀ фулерена, по-друге, що 1-годинна інкубація клітин з C₆₀ є достатньою для проникнення молекул C₆₀ у клітину.

Захисні ефекти C₆₀ фулерену та його похідних при окисному стресі підтверджено низкою літературних даних. У експериментах з обробленими пероксидом водню клітинами MA-104 епітелію нирки мавпи з використанням зонду DCF-DA підтверджено антиоксидантний ефект фулерену C₆₀, солюбілізованого у полівінілпіролідоні [161]. Дані ЕПР підтверджують, що ефективними вловлювачами вільних радикалів, здатними нейтралізувати не лише супероксидний аніон, але й гідроксильний радикал, є як вихідна молекула C₆₀, так і її гідроксильовані похідні. Так, 20 мкМ фулеренол захищав первинні клітини пігментного епітелію сітківки ока (primary retinal pigment epithelium) людини (pRPE) та свині (ppRPE) від ушкоджувальної дії 200 мкМ H₂O₂ [542].

Фулеренол C₆₀(OH)₂₂ у діапазоні концентрацій 10, 50, 100 мкМ через 24 год виявляв антиоксидантні властивості та цитопротекторну дію щодо

клітин A549 легень людини та клітин rVSEC мозку щура від 50 мкМ H₂O₂-індукованого окисного пошкодження [527].

Наступним завданням було дослідити захисні ефекти C₆₀ фулерену від токсичної дії цисплатину на тимоцити та еритроцити щура.

Оскільки, продукування АФК вважають одним з основних позаядерних механізмів прояву токсичної дії цисплатину [66, 373] нами було оцінено вплив цисплатину (Cis-Pt) на продукування АФК у тимоцитах.

За дії Cis-Pt у концентрації 3,3 мкМ спостерігалось посилення продукування АФК, рівень якого на 40-ій хвилині зростав у 1,7 рази порівняно з контролем (Рис. 4.3). За дії 16,7 мкМ Cis-Pt такий же рівень АФК досягався вже через 25 хв, а через 40 хв інкубації показник перевищував контрольний у 2,7 рази.

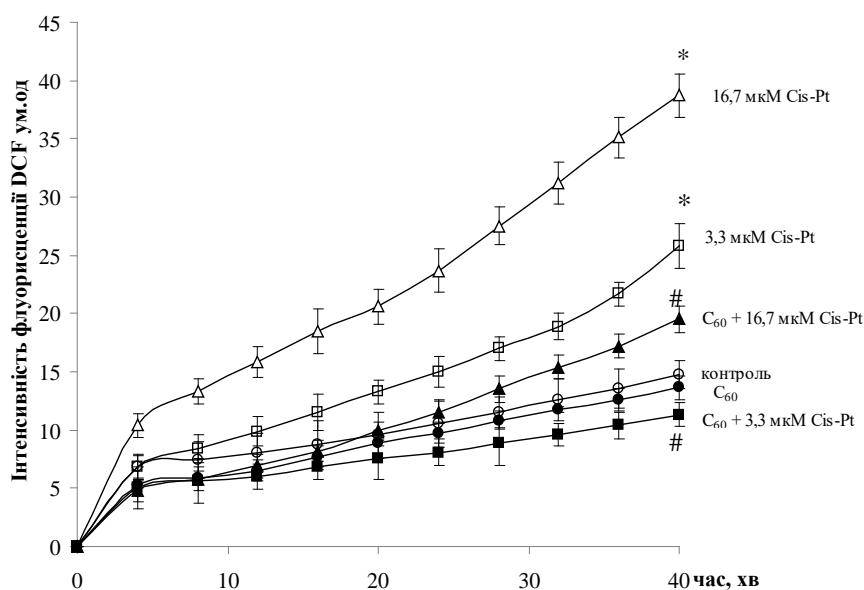


Рис. 4.3. Динаміка продукування АФК у тимоцитах за дії 10 мкМ C₆₀ фулерену, цисплатину (3,3 та 16,7 мкМ) та їх комбінації (M±m, n=8). *p<0,05 порівняно з показником у контролі (без добавок), #p<0,05 порівняно з показником за дії цисплатину відповідної концентрації

Значне зростання продукування АФК за дії цисплатину у концентрації 25 мкМ було продемонстровано і у експериментах на нормальних клітинах нирки (LLC-PK1) [373].

За преінкубації клітин з C_{60} фулереном спостерігалось пригнічення індукованого цисплатином продукування АФК у тимоцитах (Рис. 4.3). Так, рівень продукції АФК у преінкубованих з C_{60} фулереном тимоцитах за дії 3,3 мкМ цисплатину не перевищував контроль, а за дії 16,7 мкМ цисплатину значно послаблювався порівняно з окремою дією цитостатика.

Виявлений антиоксидантний ефект C_{60} фулерену у тимоцитах за дії цисплатину може бути пов'язаний з локалізацією молекул C_{60} на плазматичній мембрані. Так, у роботі [4] показано, що активність ензима екто-АТФази, активний центр якого орієнтований у позаклітинний простір, пригнічується у тимоцитах, преінкубованих з C_{60} фулереном.

Розглядаючи позаядерні мішені дії цисплатину варто відмітити, що цисплатин насамперед взаємодіє з плазматичною мембраною клітини, спричиняючи зміни її структурно-функціонального стану. Так, за дії цисплатину відмічено пригнічення активності іонних обмінників та каналів ПМ [207, 227, 469]. Показано також, що цисплатин може взаємодіяти з негативно зарядженими фосфоліпідами та утворювати координаційні комплекси з фосфотидилсеринном на внутрішній поверхні мембрани [414, 469].

Для оцінки впливу цисплатину на рівні плазматичної мембрани клітин було досліджено динаміку кислотного гемолізу еритроцитів. Процес гемолізу еритроцитів у контролі прискорювався через 40 с після внесення гемолітика у пробу, максимум гемолізу (35 ± 2 %) припадав на термін 60 с (Рис. 4.4).

Після преінкубації еритроцитів з цисплатином процес гемолізу еритроцитів уповільнювався, проте частка гемолізованих еритроцитів зростала до 45 ± 3 % за дії 3,3 мкМ Cis-Pt та до 55 ± 2 % за дії 16,7 мкМ Cis-Pt (Рис. 4.4). Збільшення частки гемолізованих еритроцитів свідчить про те, що за дії цисплатину послаблюється структурна організація мембрани еритроцитів.

Виявлений нами цисплатин-залежний гемоліз у нормальних клітинах узгоджується з літературними даними. Так, показано, що цисплатин за концентрації 35 мкМ може вбудовуватись у внутрішній шар мембрани еритроцитів людини та спричиняти морфологічні зміни клітини [469]. Такий вплив цисплатину пов'язують з його високою спорідненістю до

фосфатидилсерину та здатністю вбудовуватись у внутрішній моношар плазматичної мембрани еритроцитів та ушкоджувати її.

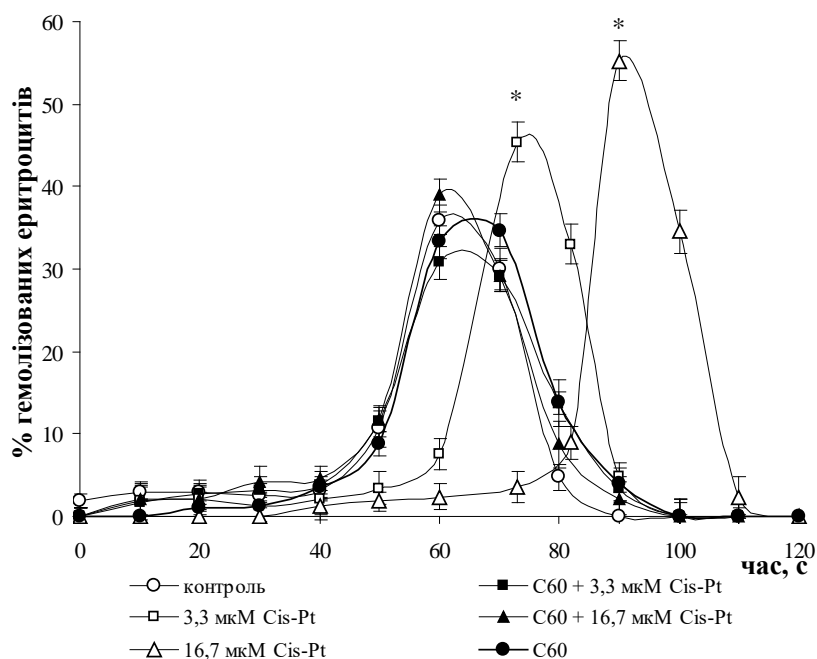


Рис. 4.4. Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії цисплатину (3,3 та 16,7 мкМ), 10 мкМ C_{60} фулерену та їх комбінації ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з показником у контролі

У нашій роботі показано, що цисплатин навіть за низьких концентрацій (3,3 та 16,7 мкМ) порушує структурну організацію плазматичної мембрани еритроцитів. Гемолітичні властивості платинових препаратів за умови їх використання у хіміотерапії є причиною розвитку гемолітичної анемії та ураження кісткового мозку [274], тому наразі пошук шляхів захисту еритроцитів від дії цитостатиків є актуальним.

Параметри еритрограми для еритроцитів, преінкубованих з C_{60} фулереном, не відрізнялись від контролю, що вказує на відсутність гемолітичної дії 10 мкМ C_{60} . Згідно з даними представленими у роботах [16, 421] лише за концентрацій C_{60} фулерену > 50 мкМ можливе посилення гемолізу еритроцитів (на 10-20%).

За дії цисплатину на еритроцити, попередньо інкубовані з C_{60} фулереном, гемолітичний ефект препарату не виявлявся, еритрограми гемолізу повертались

до контрольних значень (Рис. 4.4). Зсув еритрограми вліво до контрольних значень може бути пов'язаний з тим, що гідратовані молекули C_{60} можуть утворювати кластери, і, локалізуючись на поверхні еритроцита, змінювати структурну організацію полярної частини інтегральних білків, що послаблює взаємодію цисплатину з мембраною еритроцитів.

Отримані дані демонструють мембранотропні властивості C_{60} фулерену та його здатність підвищувати стійкість мембрани еритроцитів до гемолізу, спричиненого цисплатином.

Отже, за дії C_{60} фулерену у концентрації 5 та 10 мкМ не було виявлено зміни таких показників, як життєздатність та активність АО ензимів тимоцитів та стійкості до гемолізу еритроцитів. Окрім того, завдяки антиоксидантним властивостям C_{60} фулерен виявляє захисні ефекти щодо нормальних клітин (тимоцитів та еритроцитів) від ушкоджувальної дії пероксиду водню та цисплатину. Дані про послаблення токсичної дії цисплатину на тимоцити та еритроцити за умови їх преінкубації з C_{60} фулереном вказують на можливість застосування наноструктури як цитопротектора нормальних клітин.

Особливої уваги заслуговує вивчення біологічної дії C_{60} фулерену щодо злоякісно трансформованих клітин, які характеризуються активною і неконтрольованою проліферацією та відсутністю диференціювання, пригніченням апоптозу, надмірною продукцією АФК, підвищеною концентрацією Ca^{2+} , змінами у функціонуванні мітохондрій, порушеннями у метаболічних процесах, зокрема, у енергетичному обміні окисне фосфорилування у мітохондріях є пригніченим, а потребу АТФ більшою мірою забезпечує аеробний гліколіз (ефект Варбурга) [99, 139, 173, 467].

Наразі значна увага дослідників приділяється розробці підходів, спрямованих, по-перше, на селективне відновлення апоптичного потенціалу злоякісно трансформованих клітин, по-друге, на уникнення пошкоджуючої дії на нормальні клітини [113, 537].

Окрім того, пухлинні клітини здатні більшою мірою накопичувати та довше, ніж нормальні клітини, утримувати екзогенні сполуки, особливо з великою молекулярною масою, що і може пояснити вибіркковість дії C_{60}

фулеренів щодо злоякісно трансформованих клітин та їх утримання всередині, порівняно з нормальними клітинами. Тому нашим наступним завданням було оцінити вплив C_{60} фулерену на життєздатність злоякісно трансформованих клітин різних ліній та активність АО ензимів клітин лейкозу різних ліній.

4.2. Оцінка впливу C_{60} фулерену на злоякісно трансформовані клітини

4.2.1. Вплив C_{60} фулерену на життєздатність злоякісно трансформованих та активність антиоксидантних ензимів клітин лейкемії.

Для вивчення впливу C_{60} фулерену на життєздатність злоякісно трансформованих клітин та їх проліферативну активність було використано клітинні лінії різного гістогенезу. Крім того, резистентні лінії клітин лейкемії L1210/Cis-Pt миші до цисплатину та HL-60/vinc і HL-60/adr людини до вінкристину і адріаміцину.

Токсичний ефект C_{60} фулерену щодо злоякісних клітин різного гістогенезу оцінювали за концентрацій 10 та 20 мкМ, оскільки у цьому діапазоні C_{60} фулерен не спричиняв токсичних ефектів на нормальні клітини. Вживаність клітин оцінювали через 24 год після внесення C_{60} фулерену у середовище інкубації клітин (Табл. 4.3).

10 мкМ C_{60} фулерен через 24 год інкубації не впливав на виживаність досліджуваних злоякісно трансформованих клітин (Табл. 4.3). Після внесення 20 мкМ C_{60} у інкубаційне середовище знижувалася виживаність лише клітин АКЕ асцитної карциноми молочної залози (на 23%), HL-60/wt лейкемії (на 22%) та LLC карциноми легені миші (на 26%) відносно контролю (необроблені клітини).

Ці дані свідчать про вибірковість токсичної дії C_{60} фулерену на злоякісно трансформовані клітини. Найбільш чутливими до цитотоксичної дії C_{60} фулерену виявилися клітини АКЕ асцитної карциноми молочної залози, клітини HL-60 лейкемії людини та клітини LLC карциноми легені миші.

**Вживаність злоякісно трансформованих клітин (% від контролю)
після 24 год інкубації у присутності C₆₀ фулерену (M±m, n=5)**

Клітинні лінії	C ₆₀ фулерен	
	10 мкМ	20 мкМ
Суспензійні культури:		
АКЕ (рак молочної залози миші)	101,0±9,4	77,0±6,7*
L1210 (лімфоцитарна лейкемія миші)	90,0±8,9	85,0±8,0
L1210/Cis-Pt	96,0±8,9	87,0±7,8
HL-60/wt (гостра промієлоцитарна лейкемія людини)	82,0±7,9	78,0±6,9*
HL-60/vinc	98,0±9,0	90,0±8,9
HL-60/adr	100,0±9,0	99,0±9,5
Jurkat (гостра Т-клітинна лейкемія людини)	90,0±8,9	83,0±7,3
Моношарові культури:		
LLC (карцинома легені Льюїс миші)	80,0±7,9	76,0±6,7*
CCRF-CEM (гостра лімфобластна лейкемія людини)	89,0±9,0	85,0±8,9
HeLa (карцинома шийки матки людини)	98,0±9,0	92,0±8,9
KB-3-1 (карцинома шийки матки людини)	100,0±9,5	80,0±8,9
HCT-116/wt (колоректальна карцинома людини)	88,0±8,3	85,0±8,2
MCF-7 (аденокарцинома молочної залози людини)	100±9,0	100±9,0

*p < 0,05 порівняно з показником у контролі (необроблені C₆₀ фулереном)

Вибірковість токсичної дії C₆₀ фулерену щодо злоякісно трансформованих клітин, порівняно з нормальними клітинами узгоджується з літературними даними. Так, 139 мкМ C₆₀ фулерен через 72 год не впливав на життєздатність первинних гепатоцитів щура, тоді як життєздатність клітин гепатоми людини HepG2 та щура dRLh-84 знижувалася на 55 та 25% відповідно [450].

Отже, згідно отриманих нами даних C₆₀ фулерен виявляє вибіркочу цитотоксичну дію щодо злоякісно трансформованих клітин, яка залежить від гістогенезу клітин, термінів інкубації та концентрації карбонової сполуки.

Оскільки антиоксидантні ензими відіграють важливу роль у канцерогенезі та забезпеченні життєздатності пухлинних клітин, не виключено, що шляхом модуляції антиоксидантно-прооксидантної рівноваги можна впливати на цей показник. У зв'язку з цим нами було досліджено вплив C₆₀ фулерену на активність АО ензимів у клітинах лейкемії ліній L1210 і Jurkat. Дані щодо питомої активності АО ензимів у клітинах L1210 і Jurkat наведено у табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонтрансферазна активність тимоцитів та клітин L1210 і Jurkat

(M±m, n=8)

Клітини	Ензиматична активність		
	супероксид-дисмутаза, ум.од./мг білка	глутатіон-пероксидаза, нмоль GSSG/ (мг білка X хв)	глутатіон-трансферазна, нмоль кон'югату/ (мг білка X хв)
Тимоцити	2,71±0,10	3,1±0,2	41,90±2,07
L1210	11,31±0,60	9,5±0,4	81,3±3,7
Jurkat	9,70±0,76	6,2±0,7	80,0±2,1

Клітини лейкемії ліній L1210 і Jurkat характеризуються однаковим рівнем ензиматичної активності (табл. 4.4), який є значно вищим порівняно з виявленим у тимоцитах, що свідчить про підвищений антиоксидантний потенціал у злякано трансформованих клітин.

Злякисні клітини посилено продукують АФК і зазнають більшого оксидативного стресу порівняно з нормальними через підвищену метаболічну активність, онкогенну стимуляцію та порушення у функціонуванні електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Загалом злякано трансформованим клітинам властивий підвищений антиоксидантний потенціал як пристосування до внутрішнього оксидативного стресу, проте дані щодо функціонального стану окремих антиоксидантних ензимів (АОЕ) суперечливі, оскільки їх експресія й активність залежать від типу, походження та ступеня диференціації клітин [135, 144, 249, 357, 458].

Підвищену активність АОС виявлено у багатьох малігнізованих клітинах. У хворих на лейкемію показано підвищене продукування супероксиданіона лейкоцитами на фоні підвищеної супероксиддисмутазної та глутатіонпероксидазної активності, що свідчить про м'який оксидативний стрес [144]. Супероксиддисмутазна активність підвищена, зокрема, у клітинах аденокарциноми нирки [357] та колоректального раку [458] порівняно з гістологічно незміненою тканиною, а також у андроген-нечутливих клітинах PC-3 та DU145 раку простати [249]. При дослідженні загальної супероксиддисмутазної активності й активності мітохондріальної MnСОД у клітинних лініях аденокарциноми підшлункової залози встановлено, що показники залежать від ступеня диференціювання клітин і є значно вищими у диференційованих метастазуючих клітинах Саран 1 порівняно з показниками у нормальних первинних культурах [135]. Автори припускають, що посилення антиоксидантної активності є не лише адаптацією до стресу, але й однією з умов виникнення стійкості трансформованих клітин до лікарських препаратів.

Інформативним показником чутливості клітин до дії окисного стресу може бути оцінка активності СОД, експресія якої посилюється при підвищеному рівні супероксиданіону у клітині, тому зміна активності СОД є біохімічним маркером продукування $O_2^{\cdot -}$ і показником резистентності клітин до окисного стресу.

Активність АО ензимів клітин різних ліній лейкемії за дії C_{60} фулерену виражали у % порівняно з відповідним контролем (клітини без добавок C_{60}). За інкубації у присутності 10 мкМ C_{60} фулерену виявлено ранні зміни супероксиддисмутазної активності клітин лейкозу (Рис. 4.5). Так, через 1 год активність ензиму у клітинах L1210 та Jurkat знижувалася на 40 та 33% відповідно відносно контролю, залишаючись на тому ж рівні через 3 год.

C_{60} фулерен призводив до пригнічення активності СОД у клітинах лейкемії, що свідчить про зниження рівня продукування АФК та може бути пов'язано з потужними антиоксидантними властивостями молекул C_{60} . Оскільки синтез СОД зростає при активації перекисного окислення і, навпаки, гальмується, за умов зменшення кількості АФК у клітині.

Відомо, що C_{60} фулерен є вловлювачем АФК, зокрема супероксиданіона, молекулярними механізмами його антиоксидантної дії може бути або безпосередня взаємодія супероксидного аніон-радикалу з системою кон'югованих подвійних π -зв'язків з утворенням радикала C_{60}^- , або каталітична дисмутація супероксиданіона на поверхні наночастинки. Так, мономалоніл-похідне C_{60} розглядають як міметик СОД, який може бути використаний для зниження експресії цього індукцибельного ензиму у пухлинних клітинах [71].

Важливою ланкою знешкодження АФК у клітині є глутатіон-залежна АОС, зокрема, такі глутатіонзалежні ензими, як глутатіонпероксидаза та глутатіон-S-трансфераза. Глутатіонпероксидаза утилізує глутатіон для відновлення H_2O_2 до H_2O , а утворюваних вторинних продуктів пероксидації (органічних гідропероксидів) – до гідроксисполук [41]. Нами не виявлено змін глутатіонпероксидазної активності клітин лейкемії ліній L1210 і Jurkat за дії C_{60} фулерену порівняно з контролем (Рис. 4.5). Це можна пояснити тим, що за присутності C_{60} фулерену знижується вміст супероксиданіона та пригнічується активність СОД, отже, не напрацьовується надлишковий H_2O_2 .

Глутатіонпероксидаза запобігає накопиченню токсичних вторинних продуктів пероксидації, але не забезпечує їх знешкодження. Цю функцію виконує інший ензим глутатіон-залежної АОС - глутатіон-S-трансфераза, яка забезпечує кон'югацію глутатіону з електрофільними субстратами – продуктами пероксидного окиснення ліпідів, а також використовує глутатіон (GSH) для утворення змішаних дисульфідів з окисненими SH-групами білків та їх подальшого відновлення [39].

Внесення у середовище інкубації C_{60} фулерену призводило до підвищення глутатіонтрансферазної активності лейкемічних клітин. Так, через 3 год активність ГТ клітин L1210 та Jurkat зростала на 20 та 30% відповідно порівняно з контролем (Рис. 4.5).

Припускають, що глутатіонтрансфераза може проявляти глутатіонпероксидазну активність, перебираючи на себе функції цього ензиму [80]. Тому виявлена активація глутатіонтрансферази за присутності C_{60}

фулерену можна розглядати як компенсаторну реакцію, направлену на нейтралізацію продуктів ПОЛ.

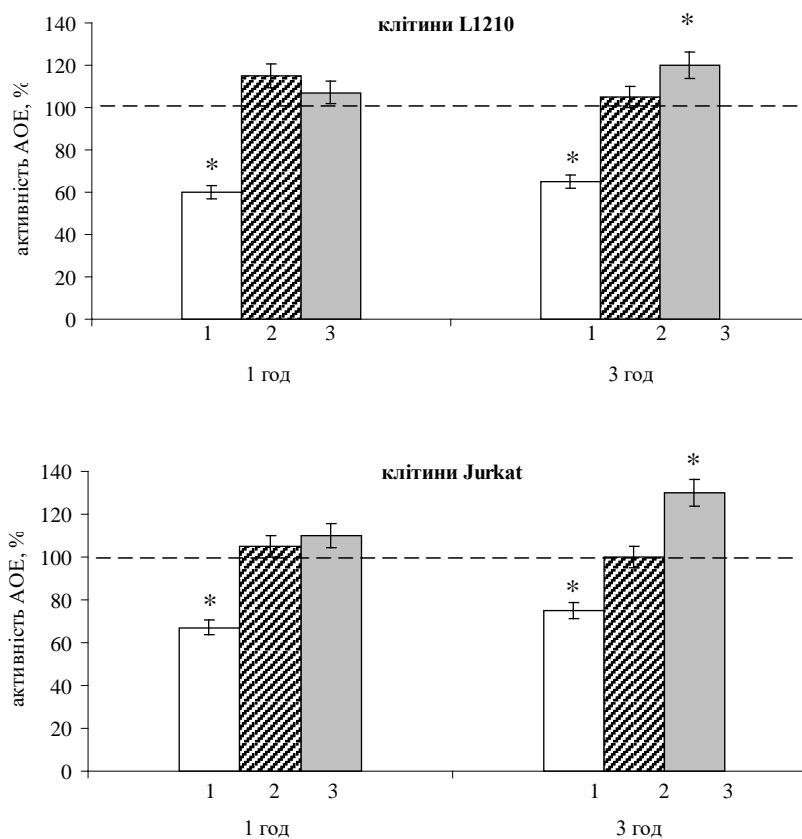


Рис. 4.5. Супероксиддисмутазна (1), глутатіонпероксидазна (2) та глутатіонтрансферазна (3) активність клітин лейкемії ліній L1210 та Jurkat за інкубації у присутності 10 мкМ C_{60} фулерену ($M \pm m$, $n=8$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок)

Існують дані, що 10 мкМ $C_{60}(OH)_{24}$ не впливав на життєздатність клітин K562 еритроїдної лейкемії людини упродовж 24-72 год, однак вибірково модулював активність АО ензимів - не впливав на активність каталази та СОД, однак знижував активність NOS (удвічі), та посилював активність ГТ (удвічі) і ГП (на 29%) [463].

Отримані дані демонструють вибірковість дії C_{60} фулерену, який не впливав на супероксиддисмутазу, глутатіонпероксидазу та глутатіонтрансферазу активність тимоцитів, але спричиняв зміни у активності компонентів АОС клітин лейкемії – знижувалася активність СОД та зростала

активність ГТ. Такі дані можуть свідчити скоріше не про безпосередню взаємодію карбонових наночастинок з ензимами, а про втручання C₆₀ фулерену у процес продукування АФК у клітинах.

Наразі активно вивчаються можливості застосування модуляторів виживання злоякісних клітин з метою пригнічення їх проліферації. Здатність до проліферації, метастазування та міграції злоякісно трансформованих клітин значною мірою залежить від їх адгезивних властивостей та участі позаклітинного матриксу в регуляції клітинного циклу. Наступним завданням було дослідити вплив C₆₀ фулерену на адгезивні властивості пухлинних клітин.

4.2.2. Вплив C₆₀ фулерену на адгезивні властивості клітин карциноми молочної залози людини лінії MCF-7

Вплив C₆₀ фулерену на показники адгезії пухлинних клітин вивчали за умови тривалої інкубації клітин MCF-7 без заміни культурального середовища (модель «unfed culture») [404]. Клітини MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини характеризуються високим клоногенним і метастатичним потенціалом та здатністю до прогресії за умов нестачі живильних субстратів.

На рис. 4.6 наведено результати порівняльної оцінки кількості клітин MCF-7, що прикріпились до субстрату через 1, 24 та 48 год інкубації у контролі та після додавання 5 і 10 мкМ C₆₀ фулерену до культурального середовища. Адгезивні властивості клітин, інкубованих протягом 1 та 24 год, у контролі та у присутності C₆₀ фулерену були однаковими, натомість у разі подовження терміну інкубації до 48 год виявлявся пригнічувальний ефект C₆₀ фулерену - кількість адгезивних клітин при інкубації в присутності 5 та 10 мкМ C₆₀ знижувалась порівняно з контролем у 1,3 та 1,4 раза відповідно.

Завдяки малим розмірам, сферичній формі і гідрофобності молекули C₆₀ здатен взаємодіяти з клітинними мембранами та модифікувати адгезивні властивості пухлинних клітин. Вплив C₆₀ фулерену на клітинні мембрани може здійснюватися різними способами - шляхом адсорбуванням на поверхні, вбудовування у ліпідний бішар та/або зв'язуванням із мембранними протеїнами тощо. Існують дані щодо впливу C₆₀ фулерену на взаємодію епітеліальних

клітин з елементами позаклітинного матриксу [466], експресію адгезивного протеїну ICAM-I в ендотеліальних клітинах [190], проведення регуляторних сигналів у клітинах гепатоми [230].

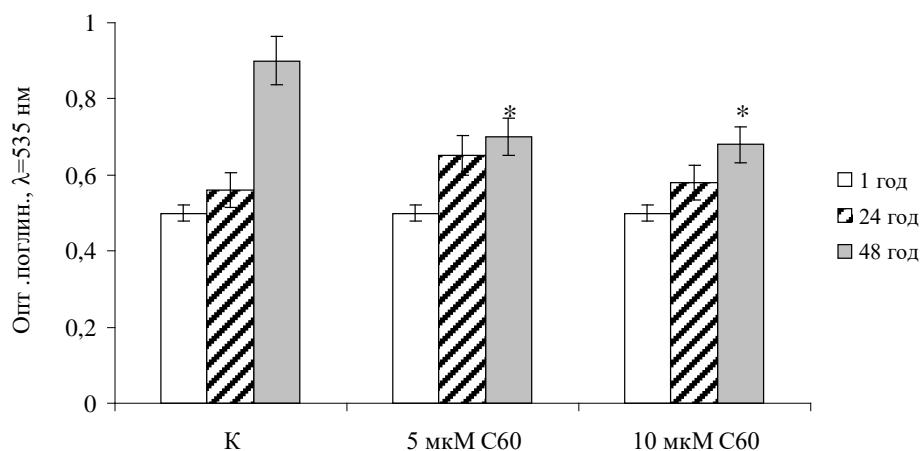


Рис. 4.6. Показник адгезії клітин MCF-7 за тривалої інкубації у присутності C₆₀ фулерену (M±m, n=8). *p<0,05 порівняно з контролем (клітини без добавок)

Оскільки клітини MCF-7 є клоногенними, було поставлено завдання з'ясувати, чи буде впливати C₆₀ фулерен у концентрації 10 мкМ на адгезію клітин MCF-7 у разі подовження терміну їх інкубації до 10 діб без заміни культурального середовища. Для цього спочатку було оцінено показник адгезії клітин MCF-7 у динаміці їх інкубації в контролі.

У досліджуваній період виявлено зміни клітинної адгезії, які носять фазовий характер - показник набуває максимальних значень на 2-гу, 5-ту, 7-му та 10-ту добу культивування (Рис. 4.7.). Припускається, що виявлені зміни показника адгезії можуть бути пов'язані з тривалістю клітинного циклу клітин MCF-7, який становить приблизно 3 доби [440].

Показник адгезії клітин MCF-7 за їх інкубації в присутності 10 мкМ C₆₀ змінюється так само, як і в контролі, однак максимального зниження (у 1,25 раза) показник набуває на 7-му, 8-му та 10-ту добу культивування.

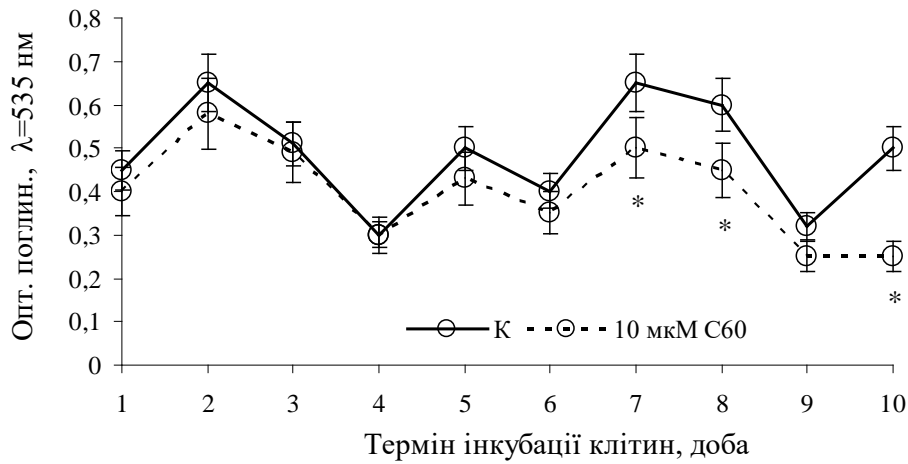


Рис. 4.7. Показник адгезії клітин MCF-7 у динаміці їх тривалого культивування у присутності 10 мкМ C₆₀ фулерену (M±m, n=8). *p<0,05 порівняно з відповідним контролем без C₆₀ фулерену

Для з'ясування можливих механізмів пригнічувального ефекту C₆₀ фулерену на клітинну адгезію доцільними є подальші дослідження впливу карбонової наносполуки на морфологічні ознаки, перебіг клітинного циклу та проліферативну активність клітин MCF-7.

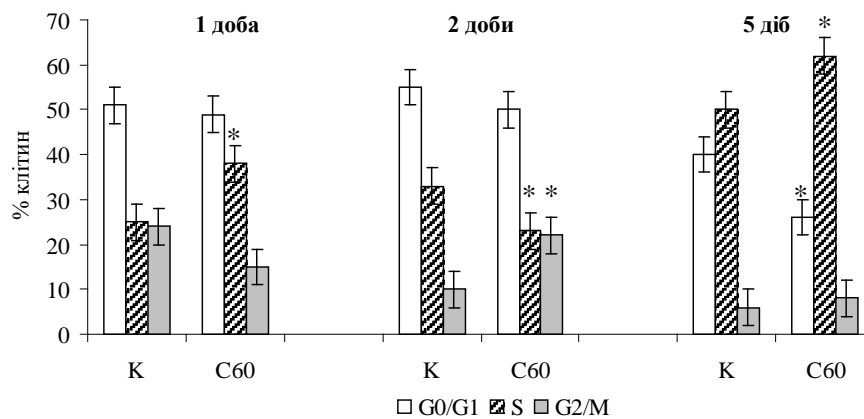


Рис. 4.8. Розподіл клітин MCF-7 за фазами клітинного циклу за тривалої інкубації з 10 мкМ C₆₀ фулереном (M±m, n=5). *p<0,05 порівняно з клітинами без C₆₀ фулерену (контроль)

C₆₀ фулерен упродовж досліджуваних термінів (через 1, 2 та 5 діб) викликав зміни розподілу клітин MCF-7 за фазами клітинного циклу (Рис. 4.8).

Так, на початковому етапі інкубації після внесення C_{60} фулерену у середовище інкубації спостерігається збільшення кількості клітин, які перебувають у S-фазі. Дані, отримані через 2 доби після внесення C_{60} фулерену у культуральне середовище, вказують на те, що входження клітин у S-фазу пригнічується, а клітини, що завершили синтез ДНК і вступили в G2/M-фазу, зазнають затримки у цій фазі. Так, вміст в G2/M-фазі клітин, інкубованих із C_{60} фулереном через 2 доби, удвічі перевищує показник у контролі (Рис. 4.8). Слід зазначити, що блокування клітинного циклу у фазі G2/M з подальшою індукцією загибелі клітин є характерним проявом дії протипухлинних препаратів [70, 283,476].

У подальший термін інкубації через 5 діб клітини *MCF-7* характеризуються значним проліферативним потенціалом, оскільки 50% перебуває у S-фазі (Рис. 4.8). Водночас за дії C_{60} фулерену спостерігається підвищення кількості клітин у S-фазі.

Необхідною умовою проліферації *in vitro* клітин *MCF-7* є формування фокусів адгезії, що залежить від експресії специфічних мембранних адгезивних протеїнів. На третю добу культивування у популяції контрольних клітин виявляються розпластані на субстраті клітини, що формують видовжені відростки (позначено стрілками на Рис. 4.9А). Під час інкубації у присутності C_{60} фулерену клітини стають округлішими і не утворюють відростків (Рис. 4.9.Б).

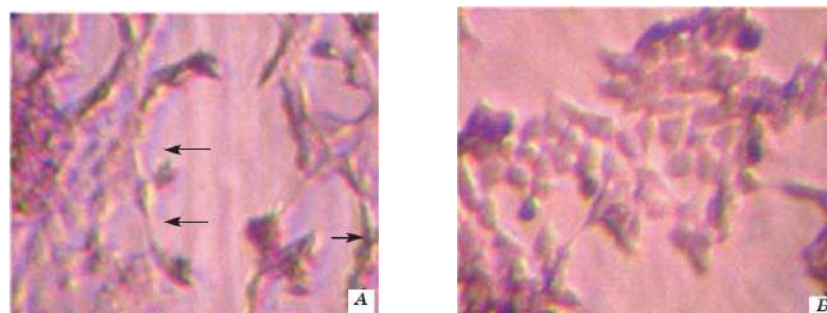


Рис. 4.9. Мікрофотографії клітин *MCF-7* через 3 доби культивування у контролі (А) та за присутності 10 мкМ C_{60} фулерену (Б).

Результати морфологічного аналізу узгоджуються з даними щодо зниження показника адгезії до субстрату клітин MCF-7 за присутності C₆₀ фулерену і демонструють взаємозв'язок між зміною адгезивних властивостей клітин MCF-7 та проходженням клітинного циклу за дії C₆₀ фулерену.

Таким чином, показано, що C₆₀ фулерен знижує показник адгезії клітин до субстрату, а також впливає на розподіл клітин MCF-7 за фазами клітинного циклу. На початкових термінах інкубації за присутності C₆₀ фулерену збільшується кількість клітин MCF-7 у S-фазі, однак у подальшому спостерігається затримка клітин у фазі G2/M.

Висновки до РОЗДІЛУ 4:

5 та 10 мкМ C₆₀ фулерен не спричиняв токсичних ефектів щодо нормальних клітин – не впливав на життєздатність і активність АО ензимів тимоцитів та стійкість еритроцитів до гемолізу.

10 мкМ C₆₀ фулерен виявляв захисні ефекти у нормальних клітинах від ушкоджувальної дії 100 мкМ пероксиду водню та цисплатину (3,3 і 16,7 мкМ) – у тимоцитах знижувався рівень АФК утворюваних за дії H₂O₂ і Cis-Pt, попереджалася H₂O₂-індуковане зниження життєздатності тимоцитів та цисплатин-індукований гемоліз еритроцитів.

20 мкМ C₆₀ фулерен виявляв токсичну дію щодо злоякісно трансформованих клітин – через 24 год знижувалася виживаність клітин АКЕ (на 23%), HL-60/wt (на 22%) та LLC (на 26%) відносно контролю.

Виявлено вибірковість дії 10 мкМ C₆₀ фулерену на активність АО ензимів, який не впливав на супероксиддисмутазу, глутатіонпероксидазу та глутатіонтрансферазу активність тимоцитів, однак спричиняв зміни у активності компонентів АОС клітин лейкемії – знижувалася активність СОД та зростала активність ГТ.

10 мкМ C₆₀ фулерен знижував показник адгезії клітин MCF-7 до субстрату, а також впливав на розподіл клітин за фазами клітинного циклу - на

початкових термінах інкубації збільшувалася кількість клітин у S-фазі, тоді як у подальшому спостерігалася затримка клітин у фазі G2/M.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [3, 5, 7, 8, 176, 178, 203, 390, 392, 395].

ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ ЦИСПЛАТИНУ ЩОДО ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИН РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ ТА ЧУТЛИВОСТІ ДО ЦИТОСТАТИКІВ

Ефективне використання цисплатину у протипухлинній терапії обмежується розвитком стійкості до дії цитостатику у злоякісних клітин. Одним з молекулярних механізмів розвитку стійкості до ліків у пухлинних клітин є інгібування входження та активація виведення цисплатину [101]. Виведення протипухлинних препаратів з пухлинних клітин регулюється АТФ-залежними мембранними АВС транспортерами, зокрема, Р-глікопротеїнами та MRP1 [129, 286], надекспресія цих білків вважається головною причиною розвитку стійкості до ліків [287].

Чутливість злоякісно трансформованих клітин до цисплатину оцінювали за їх виживаністю через 24 год після дії цитостатика за різних концентрацій. Об'єктом дослідження були клітини різного гістогенезу: клітини лейкемії ліній HL-60 та L1210, клітини колоректальної карциноми людини лінії HCT-116, клітини карциноми шийки матки людини ліній HeLa і KB-3-1 та їх резистентні до цитостатиків сублінії, а також клітини LLC карциноми легені.

Цисплатин дозозалежно інгібував проліферацію досліджуваних злоякісно трансформованих клітин різного гістогенезу (Рис. 5.1). Найбільш чутливими до токсичної дії цисплатину виявилися клітини лейкемії лінії HL-60/wt (Рис. 5.1А). Концентрація цисплатину, за якої через 24 год інкубації спостерігалось 50% зниження виживаності клітин HL-60/wt (показник IC_{50}) становила 0,95 мкМ. Ці дані узгоджуються з літературними, так у роботі [133] показано, що цисплатин спричиняє 50% зниження виживаності клітин лейкемії людини лінії CCRF-CEM/wt за концентрації 0,9 мкМ.

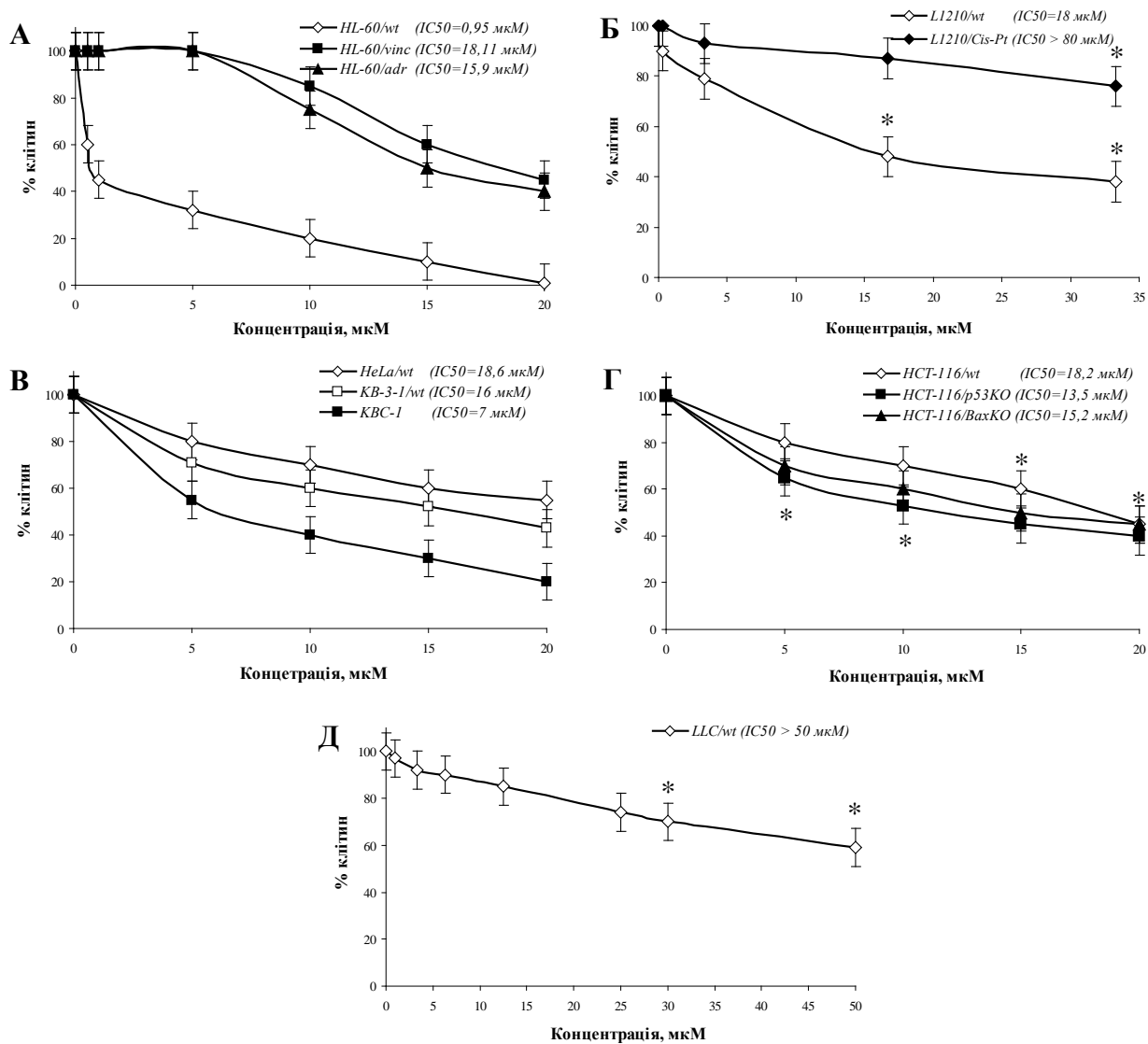


Рис. 5.1. Вживаність злоякісно трансформованих клітин різного гістогенезу через 24 год після дії цисплатину за різних концентрацій. **А** - клітини лінії HL-60/wt гострої промієлоцитарної лейкемії людини дикого типу та їх сублінії резистентні до вінкристину HL-60/vinc (надекспресія Р-глікопротеїну) і до адриаміцину HL-60/adr (надекспресія MRP1); **Б** - клітини лінії L1210 лімфоцитарної лейкемії миші та їх сублінія резистентна до цисплатину L1210/Cis-Pt; **В** - клітини карциноми шийки матки людини ліній HeLa/wt і KB-3-1/wt та їх сублінія до резистентна колхіцину KBC-1 (надекспресія Р-глікопротеїну); **Г** - клітини колоректальної карциноми людини лінії HCT-116/wt (p53+/+, Vax+/+) та її резистентні сублінії з нокаутами генів p53 HCT-116/p53KO (p53-/-) та Vax HCT-116/VaxKO (Vax-/-); **Д** - клітини карциноми легені Льюїс миші LLC. (M±m, n=6). *p<0,05 порівняно з контролем

У діапазоні концентрацій до 10 мкМ цисплатин не впливав на виживаність клітин лейкемії сублінії HL-60/vinc резистентної до вінкристину, що характеризуються надекспресією Р-глікопротеїну, тоді як у клітин сублінії HL-60/adr резистентної до адриаміцину, що характеризуються надекспресією білка MRP1 за дії 10 мкМ цисплатину даний показник знижувався на 25% (Рис. 5.1А). Із підвищенням концентрації до 20 мкМ цитостатик пригнічував виживаність резистентних клітин HL-60/vinc та HL-60/adr на 55% та 60% відповідно (Рис. 5.1А). Клітини HL-60/vinc та HL-60/adr виявилися в 19 та 16,7 разів стійкішими до дії цисплатину порівняно з лінією клітин HL-60 дикого типу, про що свідчать значення показника IC_{50} для клітин HL-60/vinc - 18,11 мкМ та для HL-60/adr - 15,9 мкМ. Отже, надекспресія Р-глікопротеїну та MRP1 у клітинах лейкемії резистентних ліній HL-60 (до вінкристину та адриаміцину) посилює резистентність цих клітин до дії цисплатину.

Виявлено відмінності у чутливості клітин лімфоцитарної лейкемії миші лінії L1210 та їх сублінії L1210/Cis-Pt резистентної до цисплатину. За дії цисплатину у концентраційному діапазоні від 0,33 до 33,3 мкМ виживаність клітин L1210 дозозалежно знижувалась упродовж 24 год (Рис. 5.1Б). Показник IC_{50} за дії цисплатину для чутливих клітин L1210 через 24 год інкубації становив 18 мкМ (Рис. 5.1Б), що узгоджується з літературними даними [486] згідно яких 17,8 мкМ цисплатин індукував 50% зниження виживаності клітин L1210.

Цисплатин у діапазоні досліджуваних концентрацій не виявляв цитотоксичних ефектів у резистентних клітинах L1210/Cis-Pt (Рис. 5.1Б). Нами показано, що через 24 год зниження виживаності клітин L1210 на 25% спостерігалось за дії 3,3 мкМ цисплатину, а клітин L1210/Cis-Pt - за дії 33,3 мкМ цисплатину (Рис. 5.1 Б).

Наступним об'єктом дослідження токсичної дії цисплатину було обрано клітини карциноми шийки матки людини ліній HeLa/wt і KB-3-1/wt та їх сублінія KBС-1 резистентна до колхіцину, що характеризується надекспресією Р-глікопротеїну. Клітини HeLa дикого типу є стійкішими (у 1,2 рази) до токсичної дії цисплатину у досліджуваному діапазоні концентрацій (5-20 мкМ)

порівняно з клітинами KB-3-1 (Рис. 5.1В). За дії 5 мкМ цисплатину виживаність клітин HeLa/wt і KB-3-1/wt знижувалася на 20 та 29% відповідно. Показник IC₅₀ за дії цисплатину для клітин HeLa/wt і KB-3-1/wt через 24 год становив 18,6 та 16 мкМ відповідно. Резистентні клітини KBC-1 до колхіцину, з надекспресією Р-глікопротеїну, виявилася чутливими до дії цисплатину у досліджуваному діапазоні концентрацій, порівняно з лінією клітин KB-3-1/wt дикого типу (Рис. 5.1В). Про це свідчило значне зниження виживаності клітин KBC-1 за дії 5 мкМ цисплатину на 45% порівняно з контролем та на 16 % порівняно з клітинами дикого типу. Із збільшенням концентрації цитостатика токсичний ефект на резистентні клітини KBC-1 посилювався. Значення показника IC₅₀ за дії цисплатину через 24 год для резистентних клітин до колхіцину KBC-1 становило 7 мкМ, напівлетальна концентрація цитостатика для резистентних клітин є у 2,3 рази нижчою порівняно із клітинами дикого типу цієї ж лінії клітин. Отже, надекспресія Р-глікопротеїну у резистентних до колхіцину клітинах карциноми шийки матки людини KBC-1 посилювала протипухлинний потенціал цисплатину, в результаті чого у клітин знижувалася резистентність до дії цитостатика.

Іншим механізмом зниження резистентності до цитостатиків у злоякісних клітин є апоптоз регулюючий. Білки Вах і p53 залучені у процеси проліферації клітин та регулюють клітинний цикл і апоптоз [126]. У злоякісно трансформованих клітин структура генів цих білків є пошкодженою, тому дефектні білки не виконують свої функції, внаслідок чого клітини виявляють вищу інвазивність, метастазну активність і є більш стійкими до дії хіміопрепаратів порівняно з клітинами, які містять вихідні копії цих генів.

Досліджено токсичний вплив цисплатину на клітини колоректальної карциноми людини лінії HCT-116 дикого типу, які містять інтактні копії генів p53 та Вах (HCT-116/wt (p53^{+/+}, Вах^{+/+})) та їх сублінії з нокаутами генів p53 HCT-116/p53KO (p53^{-/-}) та Вах HCT-116/ВахKO (Вах^{-/-}). Показано, що клітини HCT-116 як дикого типу, так і ізогенних субліній є чутливими до токсичної дії цисплатину у досліджуваному діапазоні концентрацій (5-20 мкМ) (Рис. 5.1Г). За дії 5 мкМ цисплатину виживаність клітин HCT-116/wt знижувалася на 20%,

тоді як ізогенних субліній НСТ-116/ВахКО і НСТ-116/p53КО на 30 і 35% відповідно відносно контролю. Виявлений токсичний ефект цисплатину на клітини клітини колоректальної карциноми людини лінії НСТ-116 спостерігався у діапазоні концентрацій цитостатику від 5 до 20 мкМ. Показник IC_{50} за дії цисплатину для клітин НСТ-116/wt, НСТ-116/ВахКО і НСТ-116/p53КО через 24 год становив 18,2, 15,2 та 13,5 мкМ відповідно. Отже, делеція генів p53 та Вах посилювала чутливість у резистентних клітинах НСТ-116 до дії цисплатину порівняно з клітинами дикого типу.

Отримані нами дані щодо більшої чутливості резистентних субліній клітин колоректальної карциноми людини лінії НСТ-116 до цитостатиків порівняно з диким типом узгоджуються з літературними. Так, резистентна сублінія клітин НСТ-116/СНК2 ко ($IC_{50} = 6$ мкМ) виявилася удвічі чутливішою через 8 год після дії похідного цисплатину – оксаліплатину, порівняно з клітинами НСТ-116/wt ($IC_{50} = 12$ мкМ) [380]. При порівняльній оцінці чутливості клітин НСТ-116/wt та їх резистентної сублінії НСТ-116+ch3 (з трансферною хромосою) показник IC_{50} через 24 год після дії алкілюючого агенту нідорану становив $48,5 \pm 7,7$ та $32,8 \pm 10,8$ мкМ відповідно, а алкалоїду вінкристину $0,73 \pm 0,28$ та $0,46 \pm 0,2$ мкМ відповідно [485].

Оскільки білки p53 та Вах відіграють важливу роль в процесах апоптозу, тому зниження стійкості p53- та Вах-дефіцитних клітин до токсичної дії цисплатину вказує на те, що він індукує загибель пухлинних клітин шляхом апоптозу.

Більш стійкими до дії цисплатину, порівняно з іншими досліджуваними лініями злоякісно трансформованих клітин, виявилися клітини LLC карциноми легені Льюїс миші. Зниження проліферативної активності клітин LLC (на 26%) спостерігалось через 24 год після дії 25 мкМ цисплатину, із збільшенням концентрації цитостатику виявлений ефект посилювався (Рис. 5.1Д). Значення показника IC_{50} для клітин LLC через 24 год після дії цисплатину знаходилося у концентраційному діапазоні > 50 мкМ.

Стійкість клітин раку легень до дії цисплатину було показано у роботах [2, 428, 536], а значення IC_{50} через 24 год для клітин LLC становило 60 мкМ, та для клітин A549 - 55 мкМ і 64 мкМ, що узгоджується з нашими даними.

Таким чином, цисплатин дозозалежно впливав на виживаність злоякісно трансформованих клітин різного гістогенезу, як клітин лейкемії ліній L1210 і HL-60, так і клітин колоректальної карциноми людини лінії HCT-116, клітин карциноми шийки матки людини ліній HeLa і KB-3-1 і клітин LLC карциноми легені Льюїс. На ранніх етапах інкубації (через 24 год) клітини HL-60/wt ($IC_{50} = 0,95$ мкМ) виявилися більш чутливими до токсичної дії цисплатину, а клітини LLC ($IC_{50} = > 50$ мкМ) більш стійкими.

Цисплатин знижував виживаність клітин резистентних субліній HCT-116 та KB-3-1 порівняно з диким типом, тоді як клітини HL-60 з фенотипом стійкості до ліків демонстрували підвищену стійкість до цисплатину.

Надекспресія білків-транспортів ліків, зокрема, Р-глікопротеїну та MRP1 у клітинах лейкемії резистентних субліній HL-60/vinc до вінкристину та HL-60/adr до адриаміцину спричиняла розвиток резистентності до дії цисплатину, тоді як надекспресія Р-глікопротеїну у клітинах карциноми шийки матки резистентної сублінії KBC-1 до колхіцину знижувала їх резистентність до дії цитостатику. Делеція генів p53 та Вах у резистентних сублініях клітин колоректальної карциноми людини HCT-116/p53KO і HCT-116/ВахKO знижувала їх резистентність до дії цисплатину порівняно з клітинами HCT-116/wt.

Відомо, що цисплатин проникає у клітини різними способами, зокрема, шляхом пасивної дифузії [72, 188], за участі транспортів [279, 444] і шляхом ендоцитозу [89, 145, 212], а виведення цисплатину з пухлинних клітин відбувається за участі АТФ-залежних мембранних АВС-транспортів білків Р-gp, ABCC1 (MRP1) та ABCC2 (MRP2) [102, 321] та при зв'язуванні з глутатіоном через MRP1/GS-X, або MRP2/GS-X помпу [120].

Одним із механізмів токсичної дії акумуляованого злоякісними клітинами цисплатину є індукція апоптозу, яка реалізується не лише через вплив на ДНК, але й на позаядерні мішені (ПМ, мітохондрії). Припускають, що одним з

підходів до підвищення токсичності цисплатину у злоякісно трансформованих клітинах, зокрема, лейкозних, та подолання резистентності до цитостатика є комбінація агентів, спрямованих на різні мішені та з різними механізмами дії. Одним з агентів, що може бути використаний для такої комбінації, є представник карбонових наноструктур C_{60} фулерен.

Висновки до РОЗДІЛУ 5:

Цисплатин у досліджуваному діапазоні концентрацій (5-20 мкМ) дозозалежно знижував виживаність злоякісно трансформованих клітин різного гістогенезу, зокрема клітин HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії людини, клітин HCT-116 колоректальної карциноми людини, клітин HeLa і KB-3-1 карциноми шийки матки людини і їх резистентних субліній, а також клітин LLC карциноми легені Льюїс миші. На ранніх етапах інкубації (через 24 год) клітини HL-60/wt ($IC_{50} = 0,95$ мкМ) виявилися більш чутливими до токсичної дії цисплатину, а клітини LLC ($IC_{50} = > 50$ мкМ) - більш стійкими.

Надекспресія білків-транспортерів, зокрема, Р-глікопротеїну та MRP1 у клітин резистентних субліній до вінкристину HL-60/vinc та адриаміцину HL-60/adr спричиняла розвиток резистентності до дії цисплатину, тоді як надекспресія Р-глікопротеїну у клітин резистентної сублінії до колхіцину KB3-1 та делеція генів p53 та Вах у резистентних сублініях клітин HCT-116/p53KO і HCT-116/WaxKO знижувала їх резистентність до дії цитостатику порівняно з клітинами дикого типу.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [178, 179, 397].

РОЗДІЛ 6

ВЗАЄМОДІЯ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ З АВС-ТРАНСПОРТЕРАМИ *IN SILICO*

Модифікатором токсичної дії цисплатину щодо пухлинних клітин та резистентного стану клітин до ліків може бути C₆₀ фулерен. Припускається, що C₆₀ фулерен за рахунок особливостей структурної будови молекули та хімічних властивостей здатен модифікувати роботу АТФ-залежних мембранних АВС-транспортерів. Для цього з використанням молекулярного докінгу (МД) дослідили взаємодію C₆₀ фулерену з трьома основним білками: Р-*gp* (Р-глікопротеїн), MRP-1 (multidrug-resistance associated protein) і MRP-2, які забезпечують резистентність клітин до протипухлинних препаратів. Кожний з цих білків-транспортерів діє специфічно до певного типу субстрату: так, Р- глікопротеїн відповідальний за стійкість клітин до цисплатину, колхіцину, дексаметазону, доксорубіцину, вінбластину і етопозиду, тоді як MRP-1 – до цисплатину, вінкрістину і доксорубіцину [157, 540].

МД є одним з найбільш поширених обчислювальних методів при моделюванні біофізичних систем, особливо у пошуках молекулярних мішеней нових лікарських препаратів [183, 186, 371], який базується на детальному вивченні конформаційних енергій, що аналізуються при приєднанні білкових молекул.

МД взаємодії молекули C₆₀ із Р-глікопротеїном провели у чотирьох потенційно можливих позиціях (Рис. 6.1а): позиція 1 - частина білка локалізована у позаклітинному просторі; позиція 2 – природній (основний) сайт зв'язування; позиція 3 - частина білка локалізована всередині мембрани; позиція 4 - частина білка локалізована у внутрішньоклітинному просторі. Структуру Р-глікопротеїну отримано з бази даних [514].

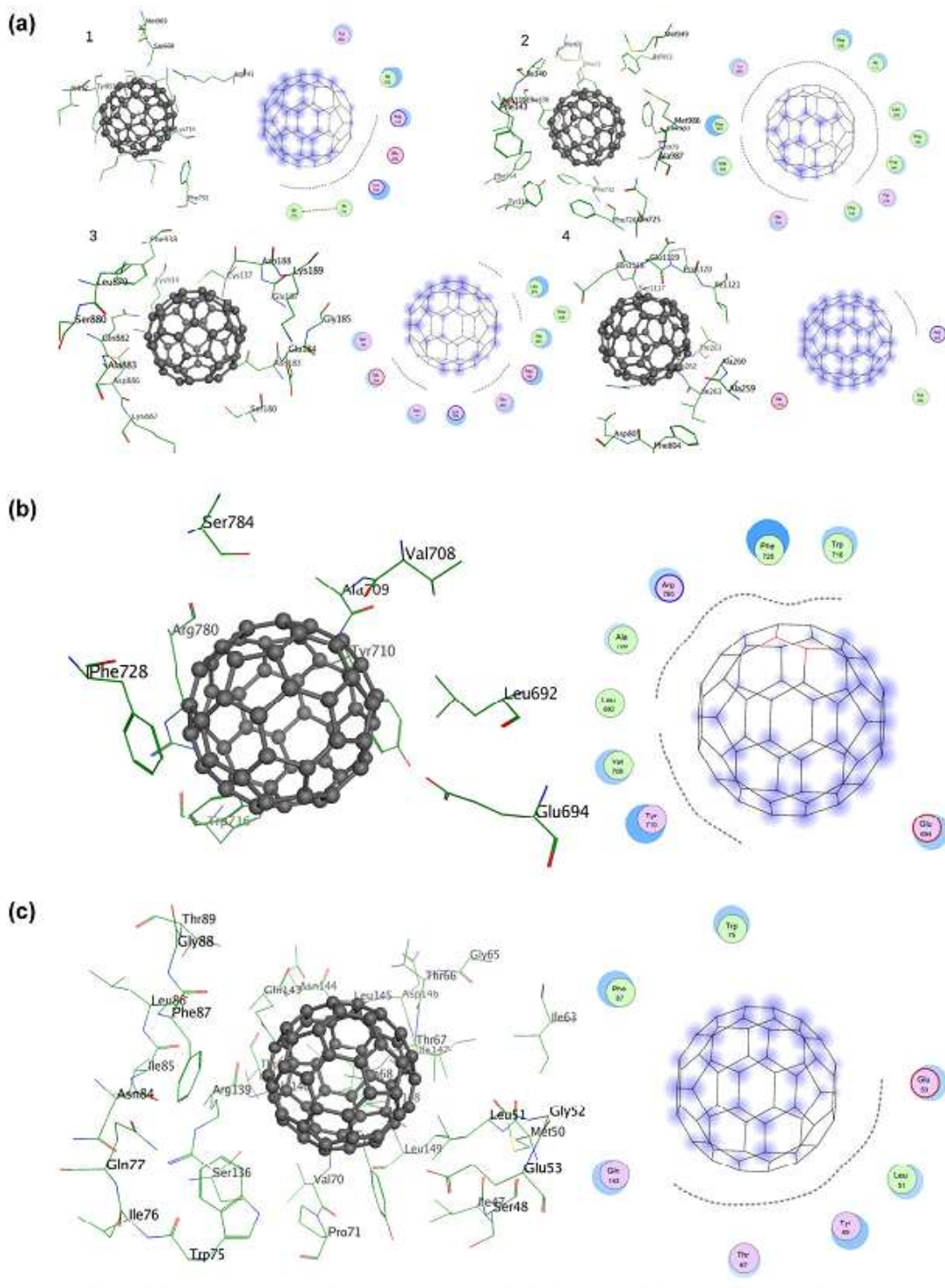


Рис. 6.1. Молекулярний докінг взаємодії C₆₀ фулерену з білками-транспортерами: Р- глікопротеїном (а 1-4), MRP-1 (б 2) і MRP-2 (с 2). Гіпотетичне зв'язування молекули C₆₀ фулерену з білком у чотирьох потенційних позиціях: 1 - білок локалізується у позаклітинному просторі; 2 - природній (основний) сайт зв'язування; 3 - білок локалізується всередині мембрани; 4 - білок локалізується у внутрішньоклітинному просторі.

Розраховані енергетичні характеристики зв'язування молекули C₆₀ із Р-глікопротеїном представлено у Таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Енергетичні параметри зв'язування C₆₀ фулерену з Р-глікопротеїном залежно від локалізації білка

Позиції	FreE ^a (кДж/моль)	Cntc ^b (кДж/моль)	Vump ^c (кДж/моль)
1 - Позаклітинний простір	-23,5	-70,0	19,1
2 - Природне зв'язування	-49,1	-78,5	1,6
3 - Мембранний простір	-29,5	-72,1	8,3
4 - Внутрішньоклітинний простір	-22,2	-54,0	6,2

FreE^a: вільна енергія зв'язування молекули C₆₀ із білком; Cntc^b: енергія контактної взаємодії між молекулою C₆₀ і білком; Vump^c: енергія стеричних зіткнень між молекулою C₆₀ і білком.

Зв'язування C₆₀ фулерену з білком у позиціях 1 (коли частина білка локалізована у позаклітинному просторі), 2 (природній сайт зв'язування) і 3 (білок локалізується у мембранному просторі) характеризується повним заповненням кишень зв'язування та низькою енергією контактних взаємодій (Cntc) між молекулами C₆₀ і Р-глікопротеїну -70,0, -78,5 і -72,1 кДж/моль відповідно (Табл. 6.1). Спостерігається незначна енергія стеричних зіткнень (Vump) між взаємодіючими структурами 1,6, 8,3 і 6,2 кДж/моль у позиціях зв'язування в основному сайті (2), коли білок локалізується у мембранному (3) і у внутрішньоклітинному (4) просторах відповідно. Водночас, у позиції 1 (коли частина білка локалізована у позаклітинному просторі) відмічається значне стеричне зіткнення (Vump) 19.1 кДж/моль між молекулами C₆₀ і Р-глікопротеїну. Також слід відмітити, що за умови зв'язування C₆₀ фулерену з білком у позиції 4 (білок локалізується у внутрішньоклітинному просторі) відбувається лише часткове заповнення потенційного сайту зв'язування з

максимальною контактною енергією (Cn_{tc}) -54.0 кДж/моль. Енергія водневих зв'язків виявилася рівною нулю для усіх сайтів зв'язування.

У формуванні взаємодій між C₆₀ фулереном з Р-глікопротеїном брали участь наступні амінокислоти (Рис. 6.1a):

- у позиції 1 (коли частина білка локалізована у позаклітинному просторі): Ile 730, Ile 731, Lys 734, Arg 741, Ile 852, Tyr 853 і Glu 932;

- у позиції 2 (основний сайт зв'язування): Tyr 310, Phe 336, Leu 339, Ile 340, Phe 343, Gln 725, Phe 728, Phe 732, Tyr 953, Phe 983 і Met 986;

- у позиції 3 (білок локалізується у мембранному просторі): Ser 180, Asn 183, Glu 184, Asp 188, Lys 189, Leu 879, Gln 882, Ala 883 і Phe 938;

- у позиції 4 (білок локалізується у внутрішньоклітинному просторі): Ala 259, Arg 262 і Glu 1119.

Переважає більшість амінокислот є неполярними із гідрофобним радикалом. Припускається, що стабілізація взаємодій між молекулами C₆₀ та Р-глікопротеїну відбувається за рахунок Ван-дер-Ваальсових сил.

МД взаємодії між молекулами C₆₀ і MRP-1 або C₆₀ і MRP-2 проводили у позиції 2 (основний сайт зв'язування) (Рис. 6.1b). Показники енергетичних параметрів зв'язування між взаємодіючими молекулами C₆₀ і MRP-1, зокрема, енергія контактної взаємодії (Cn_{tc}) становила -50,7 кДж/моль та енергія стеричних зіткнень (Bump) становила 5,9 кДж/моль, які були нижчими порівняно із показниками, які були отримані для Р-глікопротеїну у випадку будь-якого сайту зв'язування.

У формуванні взаємодій між C₆₀ фулереном з MRP-1 у позиції 2 брали участь наступні амінокислоти (Рис. 6.1b): Leu 692, Glu 694, Val 708, Ala 709, Tyr 710, Trp 716, Phe 728 і Arg 780, а у стабілізації - Ван-дер-Ваальсові взаємодії.

Розрахована енергія контактної взаємодії (Cn_{tc}) між досліджуваними структурами C₆₀ фулереном і MRP-2 виявилася меншою (-61,5 кДж/моль) порівняно з такою як для MRP-1 і кишень зв'язування була повністю заповнена. Водночас, енергія стеричних зіткнень (Bump) між молекулами C₆₀ і MRP-2 виявилася удвічі більшою (13,6 кДж/моль), аніж для MRP-1. Амінокислоти, які

брали участь у формуванні та стабілізації (за рахунок Ван-дер-Ваальсових взаємодій) взаємодій між C_{60} фулереном та MRP-2 у позиції 2: Leu 51, Glu 53, Thr 67, Tyr 69, Trp 75, Phe 87 і Gln 143 (Рис. 6.1с).

Отже, згідно розрахованих енергетичних параметрів зв'язування молекула C_{60} взаємодіє з білком-транспортером та індукує його конформаційні зміни. Крім того, C_{60} фулерен здатен діяти як субстрат або інгібітор білка-транспортера. Однак, варто зазначити, що автори [514] стверджують, що C_{60} фулерен не розпізнається Р-глікопротеїном і з однаковою ефективністю накопичується як чутливими (K562S), так і резистентними (K562R) лейкемічними клітинами.

Таким чином, отримані результати молекулярного докінгу вказують на безпосередню взаємодію між C_{60} фулереном і трьома основними білками-транспортерами, які беруть участь у процесах резистентності пухлинних клітин до лікарських препаратів, а саме Р-глікопротеїном, MRP-1 і MRP-2, що узгоджується з літературними даними [287, 304, 376]. Найбільш оптимальні модельні результати спостерігали при зв'язуванні C_{60} фулерену з білками-транспортерами (Р-гр, або MRP-1, або MRP-2) у природньому (основному) сайті зв'язування. У формуванні та стабілізації взаємодій між молекулою C_{60} та білком-транспортером беруть участь Ван-дер-Ваальсові сили.

Розвиток резистентності у пухлинних клітин до ліків є серйозною перешкодою на шляху ефективної хіміотерапії злоякісних новоутворень. Результати проведених досліджень молекулярного докінгу свідчать про ймовірне зв'язування молекул C_{60} з основними білками-транспортерами плазматичної мембрани, а саме Р-глікопротеїном, MRP-1 і MRP-2, які виводять протипухлинний препарат з клітини, тому біосумісні карбонові наноструктури можуть бути залучені до механізму подолання пухлинними клітинами резистентності до ліків.

Висновки до РОЗДІЛУ 6:

Результати молекулярного докінгу та розрахованих енергетичних параметрів вказують на те, що C_{60} фулерен взаємодіє із трьома основними

білками ABC-транспортерами, а саме P-гр, MRP-1 і MRP-2, які беруть участь у процесах резистентності пухлинних клітин до лікарських препаратів та індукує їх конформаційні зміни. У формуванні та стабілізації взаємодій між молекулою C₆₀ та білком-транспортером беруть участь Ван-дер-Ваальсові сили.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [397].

РОЗДІЛ 7

КОМБІНОВАНА ДІЯ ФОТОЗБУДЖЕНОГО C₆₀ ФУЛЕРЕНУ ТА ЦИСПЛАТИНУ НА ЧУТЛИВІ ТА РЕЗИСТЕНТНІ ДО ЦИТОСТАТИКУ КЛІТИНИ L1210 ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ МИШІ

Наступним завданням було дослідити фототоксичну дію C₆₀ фулерену за комбінації з цисплатином на злоякісні клітини. Дані про накопичення C₆₀ фулеренів у клітинах L1210 лімфоцитарної лейкемії миші та CCRF-CEM гострої лімфобластної лейкемії людини, їх вплив на активність АО ензимів у клітинах лейкемії ліній L1210 і Jurkat - зниження активності СОД і посилення активності ГТ, дозволили перейти до вивчення можливостей використання фотодинамічного потенціалу C₆₀ фулерену для ушкодження клітин лейкемії лінії L1210. Важливо було з'ясувати чи виявиться фототоксичний ефект C₆₀ фулерену у резистентних до хіміопрепарату, зокрема цисплатину, лейкемічних клітинах, та чи посилиться токсична дія цисплатину за низької концентрації у комбінації з фотозбудженим C₆₀ фулереном.

Спектр оптичного поглинання C₆₀ фулерену є максимальним в УФ (при 265 та 345 нм) діапазоні, але фіксується і у видимому (при 450 та 600 нм) діапазоні світла (Рис. 1.4). Раніше ми показали, що опромінення C₆₀ фулерену в УФ-Вид діапазоні (350-600 нм) супроводжувалося інтенсифікацією утворення АФК та підвищенням супероксиддисмутазної активності у клітинах L1210 [203]. Однак, УФ опроміненню властивий ушкоджувальний вплив на біологічні об'єкти, ступінь якого корелює з кумулятивною дозою УФ [285, 530]. У разі УФ-опромінення посилюється ймовірність розвитку мутагенезу, онтогенезу, загибелі клітин [261]. Для фотозбудження C₆₀ фулерену у видимому діапазоні спектра (410-600 нм) використано світло-діодну лампу з λ_{\max} у діапазонах - 450 нм та 550-600 нм (потужністю 100 мВт).

7.1. Життєздатність чутливих та резистентних до цитостатику клітин L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину

Вплив фотозбудженого C₆₀ фулерену за комбінації з цисплатином досліджували на різні за чутливістю до цитостатика клітини лімфоцитарної лейкемії – чутливі L1210 та резистентні L1210/Cis-Pt до цисплатину. Цисплатин було використано у низькій 3,3 мкМ концентрації, оскільки за цієї концентрації хіміопрепарату знижувалася виживаність клітин L1210, тоді як у резистентних клітин L1210/Cis-Pt цитотоксичного ефекту не спостерігалось.

Показано, що 3,3 мкМ цисплатин спричиняв значне зниження життєздатності клітин L1210 впродовж 72 год, тоді як клітини L1210/Cis-Pt виявилися не чутливими до токсичної дії цитостатика за цієї концентрації (Рис. 7.1 А,Б).

За окремої дії 10 мкМ C₆₀ фулерену або опромінення значного зниження життєздатності клітин L1210 не спостерігалось, показник знижувався не більше, ніж на 20% у термін 48-72 год. За умови фотозбудження поглинутого C₆₀ фулерену було виявлено фототоксичний ефект, про що свідчило зниження життєздатності клітин L1210 на 40% через 72 год. За дії 3,3 мкМ цисплатину життєздатність клітин L1210 знижувалася через 72 год на 30% (Рис. 7.1 А).

Виявлене зниження життєздатності клітин лейкемії за умови фотозбудження поглинутого C₆₀ фулерену узгоджується з літературними даними про фототоксичний ефект як немодифікованого C₆₀ фулерену, так і його похідних. Автори [368] показали, що опромінення C₆₀ фулерену ртутною лампою у діапазоні 320-600 нм спричиняло зниження виживаності клітин Jurkat на 50% через 24 год інкубації. Зниження виживаності клітин карциноми легені LLC, аденокарциноми товстої кишки СТ26 та ретикулосаркоми J774 зафіксовано у разі фотозбудження у видимому діапазоні (400-700 нм) поглинутого похідного фулерену C₆₀ – монопіролідініума [231]. Зменшення відсотку життєздатних клітин HeLa після фотозбудження (400-550 нм) похідного C₆₀ фулерену з глюкозою (C₆₀-Glc) було показано у роботі [525].

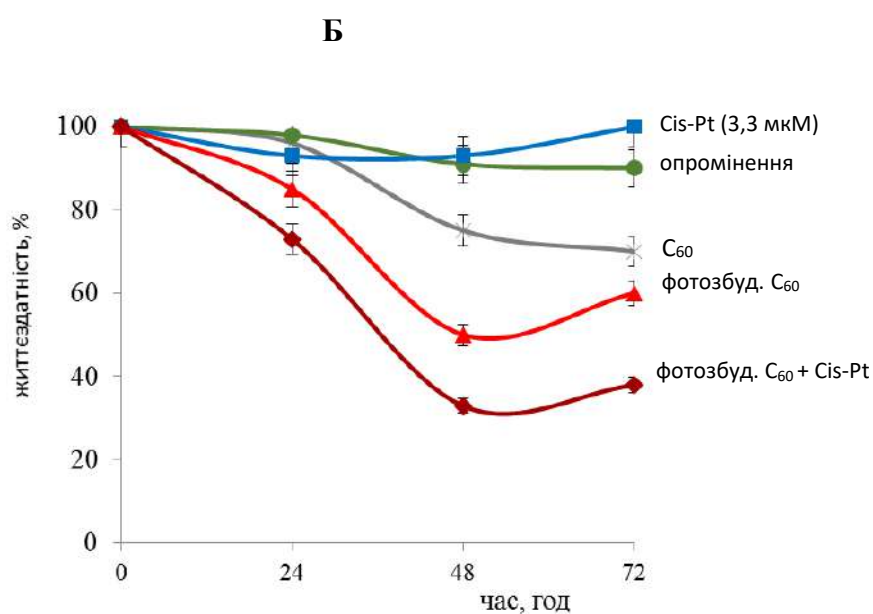
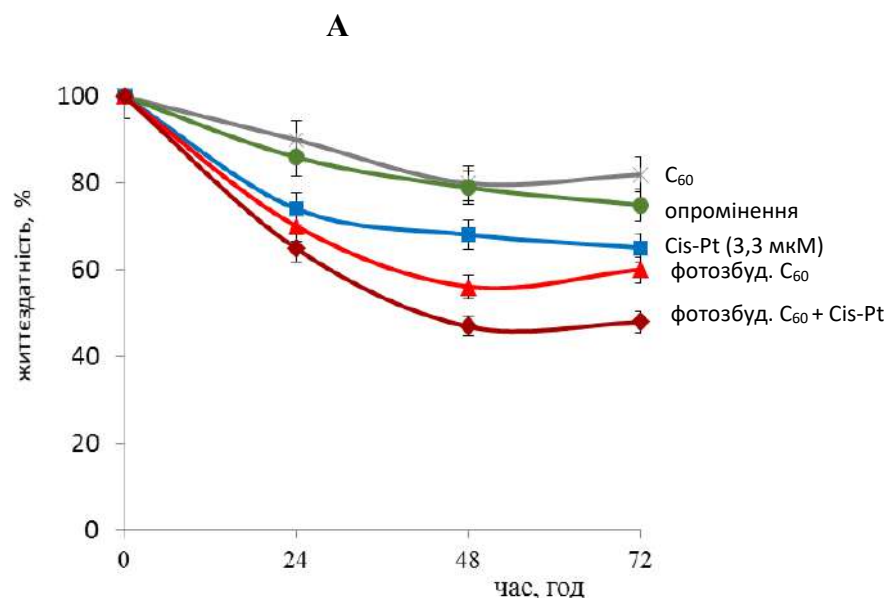


Рис. 7.1. Життєздатність чутливих (А) та резистентних до цисплатину (Б) клітин L1210 за дії досліджуваних чинників ($M \pm m$, $n=6$); $p < 0,05$

У разі комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину життєздатність клітин L1210 знижувалась на 50% упродовж 48-72 год, показник був нижчим порівняно з окремою дією 3,3 мкМ цисплатину на 20% через 72 год (Рис. 7.1 А).

Нами не було відмічено достовірних змін у життєздатності резистентних клітин L1210/Cis-Pt упродовж 72 інкубації після дії як опромінення, так і цисплатину. За обробки клітин L1210/Cis-Pt C₆₀ фулереном їх життєздатність через 72 год знижувалась на 20% (Рис. 7.1 Б).

На особливу увагу заслуговує той факт, що фототоксичний ефект C_{60} фулерену спостерігався не лише в чутливих, але й у резистентних до цисплатину клітинах L1210/Cis-Pt. Після фотозбудження C_{60} фулерену життєздатність клітин L1210/Cis-Pt через 48 год знижувалась на 50%. Токсичний ефект комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину був потужнішим, про що свідчило зниження життєздатності клітин L1210/Cis-Pt на 70% через 48 год, порівняно з окремою дією чинників (Рис. 7.1 Б).

Таким чином, за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину вдалося підвищити цитотоксичний ефект цисплатину за низької концентрації не лише у чутливих, але й у резистентних до дії препарату клітинах лейкемії лінії L1210.

Посилення цитотоксичного ефекту цисплатину у низькій 3,3 мкМ концентрації за комбінованої дії з металопохідним C_{60} фулерену $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ було продемонстровано на резистентних до цисплатину клітинах раку передміхурової залози людини лінії PC-3-luc. Вживаність клітин резистентної лінії знижувалась до 70% порівняно з показником за окремої дії агентів внаслідок реактивації похідним C_{60} дефектного ендоцитозу цитостатика [295].

Припускається, що токсичний ефект комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину на клітини лейкемії лінії L1210 спричинений активацією на мембранному та цитозольному рівнях сигнальних шляхів апоптозу, що передує у часі більш пізнім ДНК – ушкоджувальним ефектам цисплатину на рівні ядра. Виявлені відмінності у дії цисплатину окремо та у комбінації з фотозбудженим C_{60} фулереном на життєздатність клітин L1210/Cis-Pt свідчать про здатність C_{60} фулерену посилювати акумуляцію цисплатину резистентними клітинами, у такий спосіб підвищуючи чутливість клітин L1210/Cis-Pt до цього цитостатику.

Щоб дослідити, чи пов'язане виявлене нами зниження життєздатності чутливих і резистентних до цисплатину клітин лейкемії за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину з індукцією окисного стресу було

оцінено продукування АФК у клітинах L1210 та L1210/Cis-Pt через 3 год після комбінованої дії цих чинників.

7.2. Продукування АФК у чутливих та резистентних до цитостатику клітинах L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину

Рівень АФК у чутливих до дії цисплатину клітинах L1210 за окремої дії C₆₀ фулерену або опромінення порівняно з контролем достовірно не змінювався впродовж всього терміну інкубації (Рис. 7.2А).

За дії 3,3 мкМ цисплатину на клітини L1210 спостерігалось підвищення рівня АФК, яке на 40-ій хв удвічі перевищувало контрольний показник (Рис. 7.2А). За умови фотозбудження поглинутого клітинами L1210 C₆₀ фулерену продукування АФК посилювалось, на 40-ій хв показник перевищував контроль у 3,4 рази (Рис. 7.2А).

Відмічене нами індуковане фотозбудженим C₆₀ фулереном продукування АФК у клітинах лейкемії найвірогідніше відбувається за механізмом передачі електронів від фотозбудженої молекули C₆₀ на молекулу O₂ з подальшим утворенням супероксидного аніон-радикалу, що бере участь у реакціях утворення H₂O₂ та гідроксил радикалу (Розділ 1.3) [345, 518].

Отримані нами дані щодо продукування АФК за умови фотоактивації C₆₀ фулерену узгоджуються з літературою. У роботі [406] показано, що фотозбудження галогеновою лампою (560 нм) поглинутого клітинами HeLa похідного C₆₀ (біс-метанофосфонат-C₆₀) спричиняє підвищену генерацію синглетного кисню та гідроксил радикалу. Фотозбудження похідного фулерену C₆₀-аргінін у діапазоні 400-700 нм спричиняло підвищення продукції АФК та зниження активності АО ензимів (СОД, каталази та глутатіонпероксидази) у клітинах HeLa [46].

Опромінення у видимому діапазоні світла (400-700 нм, 150 мВт/см²) клітин HeLa інкубованих з похідними фулерену C₆₀[>CRAF-(C₂MC₃N₆⁺)₂]-(Γ)₁₀ та C₆₀[>M(C₃N₆⁺C₃)₂]-(Γ)₁₀ спричиняло значне продукування гідроксильного радикала та синглетного кисню відповідно [528]. У роботі [167] на клітинах

фібросаркоми людини лінії HT1080 показано, що фотоактивація похідного фулерену C₆₀-PEG у видимому діапазоні світла (400–600 нм, 140 Дж/см²) посилювала продукування АФК, а саме гідроксил радикалу та супероксидного аніон-радикалу.

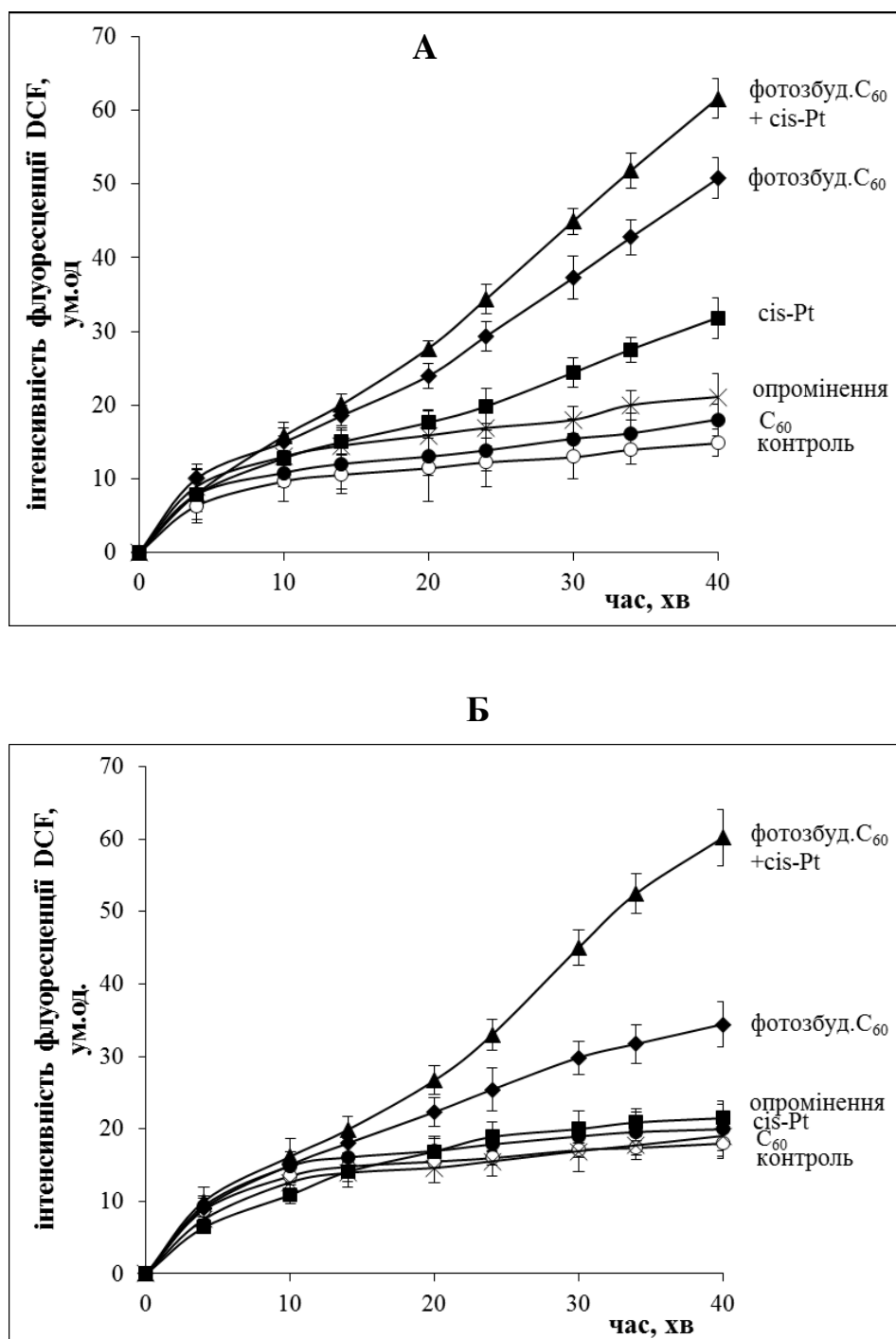


Рис. 7.2. Динаміка продукування АФК у чутливих (А) та резистентних до цисплатину (Б) клітинах L1210 за дії досліджуваних чинників (M±m, n=5); p<0,05

Найбільший рівень АФК у чутливих клітинах L1210 зростав за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину. Досліджуваний показник на 40-ій хв перевищував не лише контрольні значення (у 4 рази), але й значення за дії цисплатину (у 2 рази) та фотозбудженого C₆₀ фулерену (у 1,2 рази) (Рис. 7.2А).

У клітинах L1210/Cis-Pt не спостерігалось достовірних змін у продукуванні АФК за окремої дії C₆₀ фулерену, або цисплатину, або опромінення. За умови фотозбудження C₆₀ фулерену рівень АФК у резистентних до цисплатину клітинах лейкемії зростав та перевищував контрольні значення у 2,3 рази (Рис. 7.2Б). Проте, інтенсивність індукованого фотозбудженим C₆₀ фулереном продукування АФК у резистентних до цисплатину клітинах лейкемії виявилась меншою, ніж у чутливих - величина показника на 40 хв інкубації була нижчою (Рис. 7.2Б).

На нашу думку, посилення продукування АФК у клітинах L1210/Cis-Pt за дії фотозбудженого C₆₀ фулерену, може свідчити про здатність резистентних клітин накопичувати C₆₀ фулерен, оскільки зонд DCFH-DA переходить у активну флуоресцентну форму лише за умови проникнення у цитозоль клітини та окиснення внутрішньоклітинними естеразами [194].

За комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину у клітинах L1210 обох ліній (чутливої та резистентної) спостерігалось найбільше посилення продукування АФК. У клітинах L1210/Cis-Pt на 40-ій хв рівень АФК перевищував не лише контрольне значення (у 4 рази), але й рівень АФК індукований фотозбудженим C₆₀ фулереном (у 2 рази) (Рис. 7.2Б).

Наступним завданням було дослідити ранні механізми комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину у клітинах лейкемії за концентрацією вільного цитозольного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$), як інтегральний показник кальцієвого гомеостазу.

7.3. Концентрація вільного цитозольного Ca^{2+} у чутливих та резистентних до цитостатику клітинах L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину

Рівноважна концентрація вільного цитозольного Ca^{2+} у чутливих та резистентних до цисплатину клітинах лейкемії у контролі не відрізнялась і становила 135 ± 27 нМ. Нами не було виявлено достовірних змін показника після опромінення клітин L1210 як чутливих, так і резистентних (дані не представлено).

За дії як 10 мкМ C_{60} фулерену, так і 3,3 мкМ цисплатину у клітинах L1210 виявлено підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, яке відрізнялось за величиною. За дії C_{60} фулерену показник зростав порівняно з контролем у 1,6 рази через 3 год, тоді як за дії цисплатину - у 2,9 рази уже через 1 год та утримувався на цьому рівні впродовж 3 год (Рис. 7.3А). Після фотозбудження поглинутих клітинами L1210 молекул C_{60} концентрація цитозольного Ca^{2+} через 3 год досягала 787 ± 45 нМ, перевищуючи контроль у 6 разів (Рис. 7.3А).

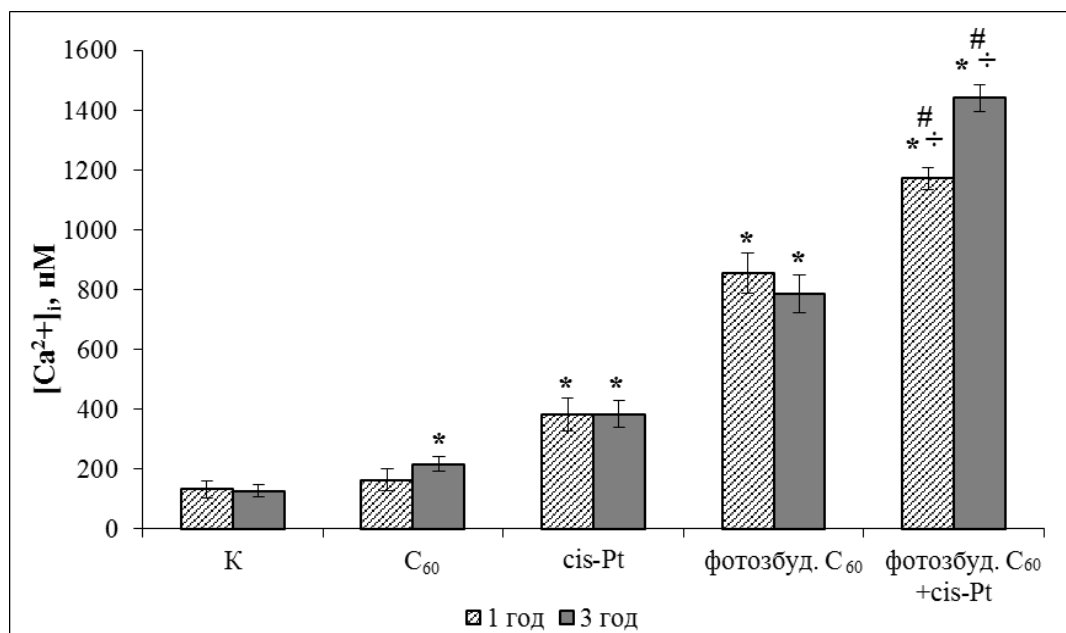
Найбільше зростання сигналу флуоресценції індо-1 у клітинах L1210 спостерігалось за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину. Вже через 1 год показник зростав до 1174 ± 38 нМ, а через 3 год - до 1445 ± 44 нМ (Рис. 7.3А).

Величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у резистентних до цисплатину клітинах L1210/Cis-Pt за дії C_{60} фулерену у незбудженому стані, або цисплатину не змінювалась. Проте через 3 год після фотозбудження C_{60} фулерену показник перевищував контрольне значення у 3,7 рази, а за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину - у 6 разів, досягаючи 830 ± 43 нМ (Рис. 7.3Б).

Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ за дії цисплатину може відбуватись як внаслідок посилення входу катіону з позаклітинного простору, так і внаслідок вивільнення катіону з внутрішньоклітинних депо [473]. Так, у літературі показано, що цисплатин у діапазоні низьких концентрацій (0,001-10 мкМ) спричиняв зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітинах аденокарциноми шийки матки HeLa-S3 через вплив на потенціал-керовані кальцієві канали L-типу та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани [171]. На клітинах HeLa [172] та MCF-7 [248]

було показано вплив цисплатину на активність ріанодинових каналів – рецепторів та рецепторів до 1,4,5-інозитолтрифосфату (IP3) у ЕПР.

А



Б

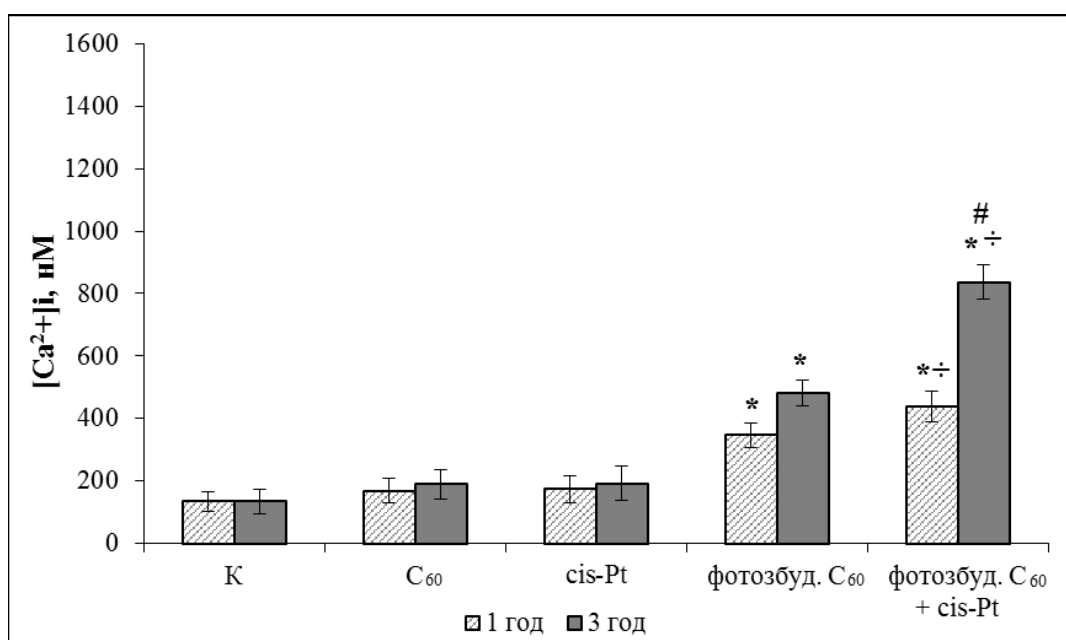


Рис. 7.3. Концентрація цитозольного Ca^{2+} у чутливих (А) та резистентних до цисплатину (Б) клітинах L1210 через 1 та 3 год після дії досліджуваних чинників ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ÷ $p < 0,05$ порівняно з дією цисплатину, # $p < 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C_{60} фулерену

Згідно літературних даних рівень цитозольного Ca^{2+} зростає за дії як фотозбудженого C_{60} фулерену, так і його похідних [200, 522]. У клітинах HeLa з використанням зонду флуо-3 показано підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у разі фотоактивації лазером (567 нм) дималонового похідного C_{60} . Припускається, що такі зміни у величині показника спричинені ушкодженням плазматичної мембрани та входженням катіона з позаклітинного простору [522]. У роботі [200] показано, що через 3 год після фотозбудження в УФ-видимому діапазоні (320–600 нм) немодифікованого C_{60} фулерену концентрація цитозольного Ca^{2+} у клітинах лейкемії Jurkat перевищувала контроль у 3,5 рази.

Отримані нами дані щодо зміни рівня цитозольного Ca^{2+} у чутливих та резистентних лейкемічних клітинах L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину можуть свідчити про досягнення критичного для активації клітинної загибелі рівня Ca^{2+} у цитозолі. Вважають, що за умови досягнення мікромолярної концентрації цитозольного Ca^{2+} саме поблизу мітохондрій відбувається неконтрольоване надходження катіона до органели, що є ранньою умовою активації Ca^{2+} -залежного мітохондрійного шляху апоптозу [419, 437].

Підвищене продукування АФК за умови фотозбудження C_{60} фулерену не лише в чутливих L1210, але й резистентних L1210/Cis-Pt клітинах лейкемії свідчить на користь АФК-індукованого механізму зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Взаємозв'язок між продукуванням АФК та рівнем цитозольного Ca^{2+} продемонстровано у роботах інших авторів. Так, надмірне продукування АФК може призводити до окиснення тіолових груп у складі таких структур, як Ca^{2+} -АТФаза ЕПР, рецептори до 1,4,5-інозитолтрифосфату ЕПР, потенціал-керовані Ca^{2+} канали ПМ, до порушення їх узгодженого функціонування та неконтрольованого підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [196].

Відомо, що надмірна акумуляція мітохондріями катіону Ca^{2+} може призводити до порушень у їх функціонуванні - відкриття мітохондрійної пори, неконтрольованого вивільнення Ca^{2+} , виходу цитохрому *c* та активації каспази-9 [196]. Для дослідження структурно-функціонального стану мітохондрій за дії

досліджуваних чинників на лейкемічні клітини нами було оцінено відносну величину мітохондрійного потенціалу.

7.4. Величина мембранного потенціалу мітохондрій у чутливих та резистентних до цитостатику клітинах L1210 за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину

Відносна величина мітохондрійного потенціалу ($\Delta\psi$) у резистентних клітинах L1210/Cis-Pt виявилась нижчою, ніж у чутливих клітинах L1210 (Рис. 7.4). Високе значення мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах лейкозу L1210 пояснюють підвищеною активністю ANT2, яка з дефектною АТФ синтазою, забезпечує посилене надходження протонів до міжмембранного простору мітохондрій та утримання мембранного потенціалу мітохондрій на постійно високому рівні [459]. Знижений рівень мітохондрійного потенціалу у резистентних до дії цисплатину клітинах лейкемії пов'язують, зокрема, з надмірною експресією у мітохондріях протеїну UCP2 (mitochondrial uncoupling protein-2) [214].

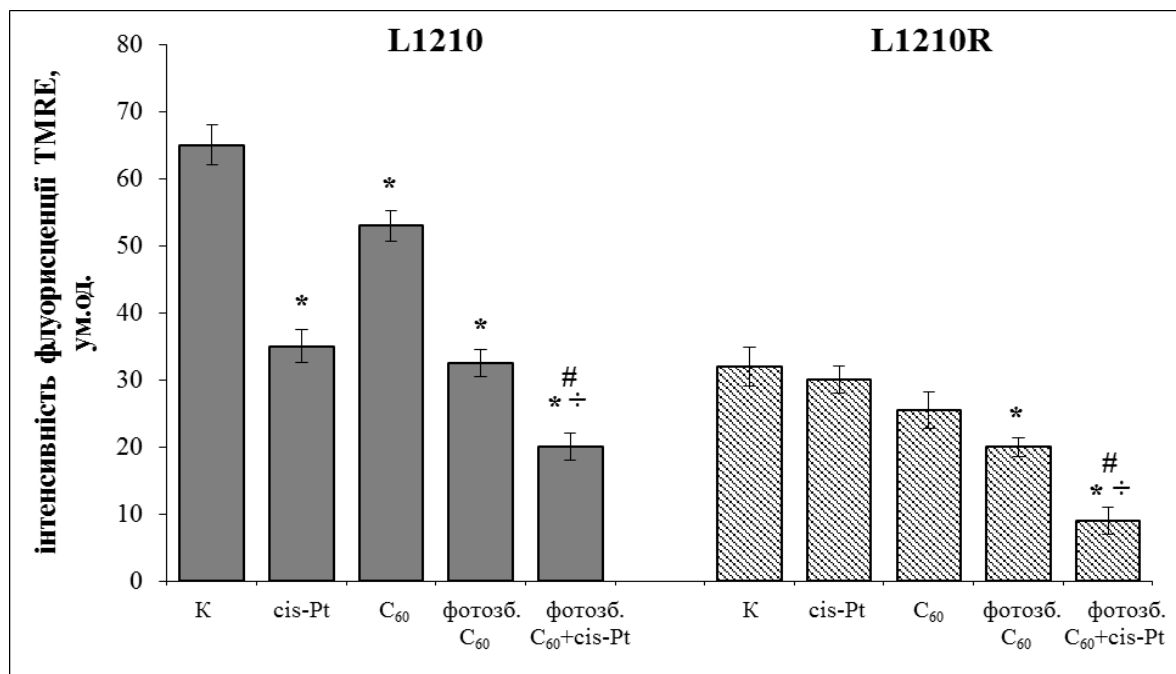


Рис. 7.4. Відносна величина мітохондрійного потенціалу у чутливих та резистентних до цисплатину клітинах L1210 за дії досліджуваних чинників ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ÷ $p < 0,05$ порівняно з дією цисплатину, # $p < 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C₆₀

За дії цисплатину на чутливі до препарату клітини L1210 через 3 год спостерігалось зниження величини мітохондрійного потенціалу у 2 рази порівняно з контролем (Рис. 7.4), що свідчить про порушення функціонального стану мітохондрій у клітинах досліджуваної лінії. Припускається, що цисплатин може впливати на мембранний потенціал мітохондрій або через утворення аддуктів з мхДНК, або опосередковано, через продукування АФК, наприклад НАДФН-оксидазами ЕПР та ПМ [172]. У роботі на клітинах раку стравоходу ЕС-109 показано, що цисплатин спричиняє посилення продукції АФК, збільшення проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани, зниження величини її трансмембранного потенціалу та активацію апоптозу [112]. Активацію апоптозу за мітохондрійним шляхом (падіння мітохондрійного потенціалу, транслокація Вах у мітохондрії) за інкубації клітин раку молочної залози MCF-7 з цисплатином продемонстровано і у роботі [172]. У роботі на клітинах раку шийки матки ME180, клітинах раку легень A549 та клітинах раку яєчників SKOV3 показано, що цисплатин у діапазоні концентрацій 50 – 300 мкМ спричиняв посилення продукування АФК та дисипацію мітохондрійного мембранного потенціалу [122].

Нами не було виявлено достовірних змін у величині мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах L1210 лейкемії обох ліній за дії опромінення (дані не представлено).

За дії C_{60} фулерену у чутливих клітинах L1210, на відміну від резистентних клітин L1210/Cis-Pt, спостерігалось зниження величини мітохондрійного потенціалу у 1,2 рази порівняно з контролем (Рис. 7.4). Такий вплив C_{60} фулерену можна пояснити здатністю наноструктури проникати у міжмембранний простір мітохондрій. Припускають, що негативний заряд поверхні гідратованих фулеренових наноструктур сприяє їх вбудовуванню у мітохондрійні мембрани, порушуючи протонний градієнт та впливаючи на деполаризацію мітохондріальної мембрани [128].

За дії фотозбудженого C_{60} спостерігалось падіння величини мітохондрійного потенціалу у лейкемічних клітинах обох ліній. У клітинах

L1210 показник знижувався у 2 рази, а у клітинах L1210/Cis-Pt – у 1,6 рази порівняно з контролем (Рис. 7.4).

Отримані нами дані узгоджуються з наведеними у роботі [42], де показано значне падіння мітохондрійного потенціалу у клітинах лейкемії Jurkat за умови фотоактивації фулерену C_{60} в УФ-видимому діапазоні світла. Опромінення у діапазоні 400-700 нм навантажених модифікованим фолієвою кислотою C_{60} фулереном клітин HeLa також призводило до зниження мембранного потенціалу мітохондрій та активації каспази-3 [228].

Комбінована дія фотозбудженого C_{60} та цисплатину призводила до дисипації мітохондрійного потенціалу як у чутливих, так і резистентних до протипухлинного препарату клітинах L1210 - відносна величина мітохондрійного потенціалу була меншою з контрольними показниками у 3,2 та 3,5 рази відповідно (Рис. 7.4).

На нашу думку, дисипація мембранного потенціалу мітохондрій як показника порушення функціонального стану органел за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину свідчить на користь припущення щодо залучення мітохондрій до вивільнення Ca^{2+} у цитозоль, значного підвищення $[Ca^{2+}]_i$ та до активації мітохондрійного шляху апоптозу.

Узагальнюючи отримані дані, ми припускаємо, що продемонстровані нами на ранніх етапах зміни у прооксидантно-антиоксидантній рівновазі та кальцієвому гомеостазі чутливих та резистентних до цисплатину клітин L1210 лейкемії за дії як фотозбудженого C_{60} , так і комбінації фотозбудженого C_{60} з цисплатином запускають пролонговані у часі сигнальні механізми активації клітинної загибелі. Механізми довготривалої комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину оцінювали за розподілом клітин L1210 за фазами клітинного циклу.

7.5. Розподіл чутливих та резистентних до цитостатику клітин L1210 за фазами клітинного циклу після комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину

На рис. 7.5 представлено дані про розподіл клітин L1210 та L1210/Cis-Pt за фазами циклу через 48 год після дії досліджуваних чинників. Аналіз розподілу виявив найбільше накопичення клітин L1210 обох ліній у G₀/G₁ фазі (44,3±5,1 % клітин L1210/wt та 47,6±4,6 % клітин L1210/Cis-Pt). Припускають, що надмірне накопичення злоякісно трансформованих клітин саме у G₀/G₁ фазі циклу пов'язане зі збільшеною експресією циклінів, що контролюють перехід клітин з G₁ до S фази [225, 441]. Подібну акумуляцію різних за чутливістю до цисплатину клітин а саме у G₀/G₁ фазі показано на лініях клітин раку яєчників SKOV3 [521] та раку легень A549, MOR, H460 [87].

За дії 3,3 мкМ цисплатину спостерігалось значне накопичення чутливих клітин L1210 у G₂/M фазі (з 15±1,78 % до 73,1±4,46 %) та зменшення відсотка клітин у G₀/G₁ фазі (з 44,3±5,1 % до 4±1,9 %) і у S фазі (з 39,2±2,67 % до 18,3±3,95 %) (Рис. 7.5А).

Така дія цитостатика узгоджується з літературними даними та пов'язана зі змінами активності циклінів [87, 239]. Необхідною умовою переходу клітин з G₂ до M фази циклу є активація комплексу Cdc2/циклінВ, що відбувається за умови активації Cdc2.

Так, у роботі на клітинах раку легень лінії A549 показано, що цисплатин завдяки зниженню активності Cdc2 спричиняє арешт клітин у G₂/M фазі [225]. Також показано, що цисплатин-індукований арешт клітин раку яєчників лінії A2780 [532] та клітин колоректальної карциноми людини лінії HTC116 [447] у G₂/M фазі циклу супроводжується зниженням життєздатності досліджуваних клітин та активацією апоптозу.

Тоді як за дії цисплатину не було виявлено змін у розподілі за фазами клітинного циклу клітин L1210/Cis-Pt (Рис. 7.5Б). C₆₀ фулерен також не впливав на проходження циклу клітинами L1210/wt, але спричиняв збільшення кількості клітин L1210/Cis-Pt у SubG₁ фазі (з 2,7±1,5 % до 8,7±3,5 %) (Рис. 7.5 А,Б). У експериментах з використанням фулерену [240] також було виявлено

підвищення вмісту клітин лейкемії лінії K562 у SubG1 фазі (з $3,8 \pm 1,3$ % до $11 \pm 3,89$ %).

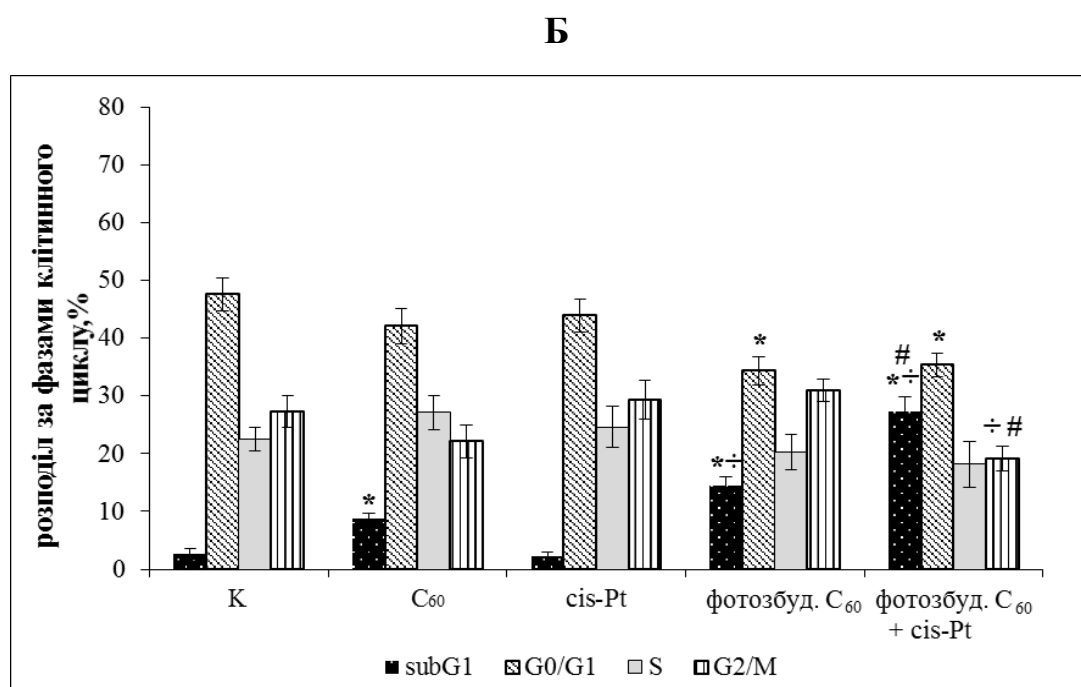
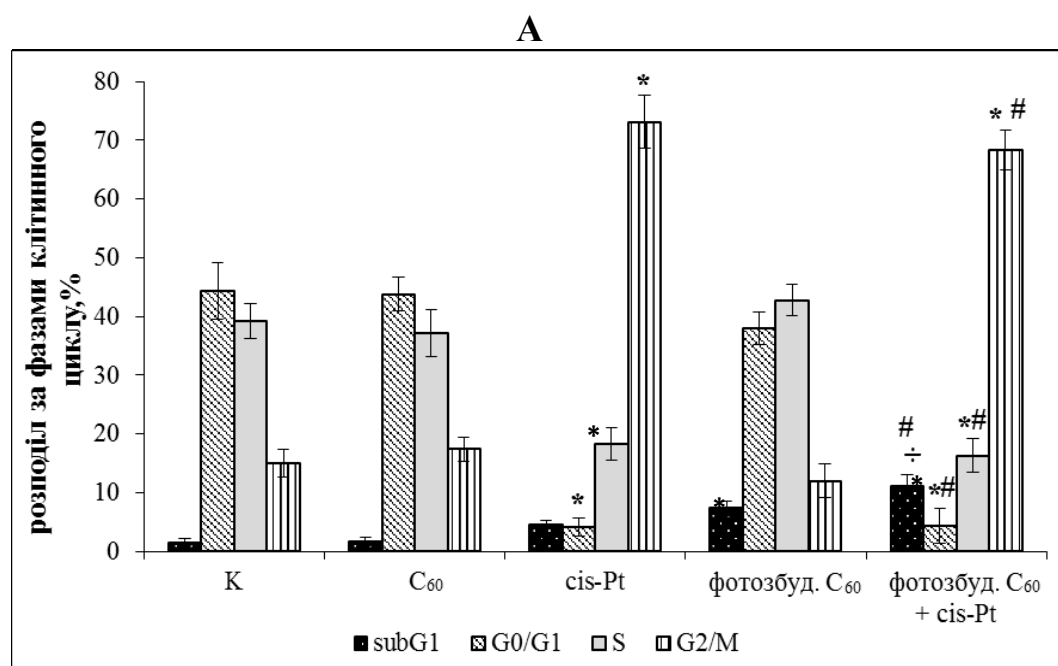


Рис. 7.5. Розподіл чутливих (А) та резистентних до цисплатину (Б) клітин L1210 за фазами клітинного циклу через 48 год після дії досліджуваних чинників ($M \pm m$, $n=6$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ÷ $p < 0,05$ порівняно з дією цисплатину, # $p < 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C₆₀ фулерену

За дії фотозбудженого C₆₀ фулерену спостерігалось значне накопичення клітин обох ліній у SubG1 фазі (з 1,5±0,9 % до 7,3±2,9 % у клітинах L1210 та з 2,7±1,5 % до 14,4±2,9 % у клітинах L1210/Cis-Pt). Показано, що збільшення кількості клітин у SubG1 фазі супроводжувалась зниженням їх відсотку у G0/G1 фазі (Рис. 7.5).

У літературі накопичено дані щодо впливу фотоактивованих похідних C₆₀ фулерену на розподіл клітин за фазами циклу, проте вони відрізняються залежно від гістогенезу клітин та від природи замісника у складі карбонової наноструктури. Так, опромінення у видимому діапазоні (400-600 нм) клітин HeLa, оброблених C₆₀-DMA (C₆₀-малонова кислота) спричиняло арешт у G2/M фазі (з 6±0,89 % до 26±3,8 %) [524], тоді як опромінення лампою розжарювання (потужністю 25 Вт) клітин MCF-7, навантажених амінокислотними похідними C₆₀ фулерену (C₆₀-phe, C₆₀-gly) супроводжувалось зменшенням їх кількості у G2/M фазі з одночасним підвищенням у S фазі [293].

У разі комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину на клітини L1210 нами виявлено значне їх накопичення у G2/M фазі (з 15±1,78 % до 68,3±4,46 %) та SubG1 фазі (з 1,5±0,9 % до 11±2,9 %) (Рис. 7.5А), тобто спостерігається поєднання цитотоксичного ефекту цисплатину та фотозбудженого C₆₀ фулерену. У клітинах L1210/Cis-Pt комбінована дія фотозбудженого C₆₀ та цисплатину спричиняла більш значне, ніж за дії фотозбудженого C₆₀ окремо, накопичення клітин у SubG1 фазі (з 2,7±1,5 % до 27,3±3 %) (Рис. 7.5Б).

Оскільки накопичення клітин у SubG1 фазі циклу корелює з фрагментацією ДНК та активацією апоптозу [499], ми припускаємо, що зниження життєздатності клітин L1210 лейкемії обох ліній як за окремої дії фотозбудженого C₆₀, так і за його комбінації із цисплатином є наслідком активації клітинної загибелі саме за механізмом апоптозу. Виявлені зміни у клітинному циклі свідчать про значний внесок фотозбудженого C₆₀ фулерену в активацію сигнальних шляхів апоптичної загибелі чутливих та резистентних до цисплатину клітин лейкемії.

Таким чином, фотозбуджений C_{60} фулерен спричиняв токсичний ефект як у чутливих L1210, так і резистентних L1210/Cis-Pt до цисплатину клітинах лейкемії, життєздатність клітин L1210 та L1210/Cis-Pt через 72 год знижувалася до 59 ± 3 та $54\% \pm 4$ відповідно від контролю. Цитотоксична дія фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину за їх комбінації значно посилюється, спричиняючи інтенсифікацію продукування АФК, значне підвищення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} та падіння величини мітохондрійного потенціалу як у чутливих, так і резистентних до цисплатину клітинах лейкемії, а також призводить до їх накопичення у проапоптичній subG1 фазі клітинного циклу. Відновлення та посилення чутливості резистентних до дії цисплатину у низькій концентрації (3,3 мкМ) лейкемічних клітин L1210 за комбінації з фотозбудженим C_{60} фулереном, свідчить про перспективність його застосування як фотосенсибілізатора для фотодинамічної терапії пухлин та для розробки підходів до подолання стійкості пухлинних клітин до дії цитостатиків за низьких концентрацій.

Висновки до Розділу 7:

За комбінованої дії фотозбудженого 10 мкМ C_{60} фулерену та 3,3 мкМ цисплатину у низькій концентрації токсичний ефект протипухлинного препарату щодо чутливих клітин L1210 лейкемії посилювався, а у резистентних до цисплатину клітинах L1210/Cis-Pt – відновлювався, про що свідчило зниження життєздатності клітин через 72 год на 21% і 65%, відповідно, порівняно з окремою дією цисплатину, а також накопичення клітин у проапоптичній SubG1 фазі. Механізмами токсичної комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину на лейкемічні клітини L1210 є посилення продукування АФК, підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} і падіння мітохондрійного потенціалу.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [10, 42, 176, 178, 390].

РОЗДІЛ 8

ХАРАКТЕРИСТИКА C₆₀ ФУЛЕРЕНУ ТА НАНОКОМПЛЕКСУ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ З ЦИСПЛАТИНОМ

Ще одним підходом до посилення дії протипухлинних препаратів є створення їх ковалентних та нековалентних комплексів з C₆₀ фулереном. Припускається, що кон'югація C₆₀ фулерену з протипухлинними препаратами може послабити побічні ефекти цитостатиків в організмі, посилити чутливість пухлинних клітин та знизити їх резистентність до хіміопрепаратів, а також сприяти ціленаправленій доставці ліків шляхом вибіркового поглинання та накопиченням у пухлинних клітинах. З цією метою нами було створено нековалентний нанокomплекс C₆₀ фулерену з цисплатином та досліджено його протипухлинну активність у *in vitro* і *in vivo*. Дослідженням біологічної дії нанокomплексу C₆₀-Cis-Pt передували оцінка агрегатного стану C₆₀ фулерену у водному розчині та характеристика нанокomплексу з використанням комп'ютерного моделювання та фізико-хімічних методів.

8.1. Агрегатний стан C₆₀ фулерену у водному середовищі

Застосування C₆₀ фулерену у хімічних, біологічних та медичних дослідженнях є обмеженим, перш за все високим ступенем гідрофобності молекул C₆₀, їх агломерацією у водному середовищі, утворенням наночастинок різного розміру і, як наслідок, нестабільністю водних дисперсій наночастинок C₆₀ фулерену. Біологічна активність немодифікованого C₆₀ фулерену значною мірою залежить від його концентрації у водному середовищі, розподілу за розміром утворених наночастинок, поверхневого заряду, що і пояснює певні протиріччя даних відносно токсичності C₆₀ фулерену [226, 288, 343, 402].

Відносна агломерація молекул C₆₀ у водній дисперсії визначається двома основними факторами - способом отримання цих наночастинок і складу біологічного/суспензійного середовища, яке часто містить диспергуючі

речовини: тетрагідрофуран, диметилсульфоксид, полівінілпіролідон для забезпечення стабільності водних дисперсій [108, 140, 243]. Крім того, як біологічні рідини організму, так і культуральні середовища характеризується високим вмістом електролітів (солі, амінокислоти, вітаміни), які є необхідними для нормального функціонування організму та клітинного росту, але сприяють агломерації молекул C_{60} . Важливим було оцінити розподіл за розміром наночастинок немодифікованого C_{60} фулерену у водних середовищах, які відрізняються за сольовим і протеїновим складом.

Оскільки гідрофобність поверхні немодифікованого C_{60} фулерену сприяє самозбиранню і агрегації молекул C_{60} з формуванням частинок різного розміру, то спочатку було проаналізовано агрегатний стан молекул C_{60} у водному розчині у динаміці. Під час проведення повторюваних упродовж 15 хв трьох вимірювань гідродинамічний діаметр частинок C_{60} фулерену у водному розчині коливався від 12 до 110 нм із середнім значенням піку 50 нм (Рис. 8.1, криві 1-3). Інтенсивність світлового розсіювання та середній розмір наночастинок упродовж цього періоду не змінювалися, що свідчить про відсутність агломерації молекул C_{60} або їх седиментацію. Варто зазначити, що цей показник не змінюється і через 6 місяців, що вказує на високу стабільність отриманого водного колоїдного розчину C_{60} фулерену упродовж тривалого періоду зберігання за температури $+4^{\circ}C$.

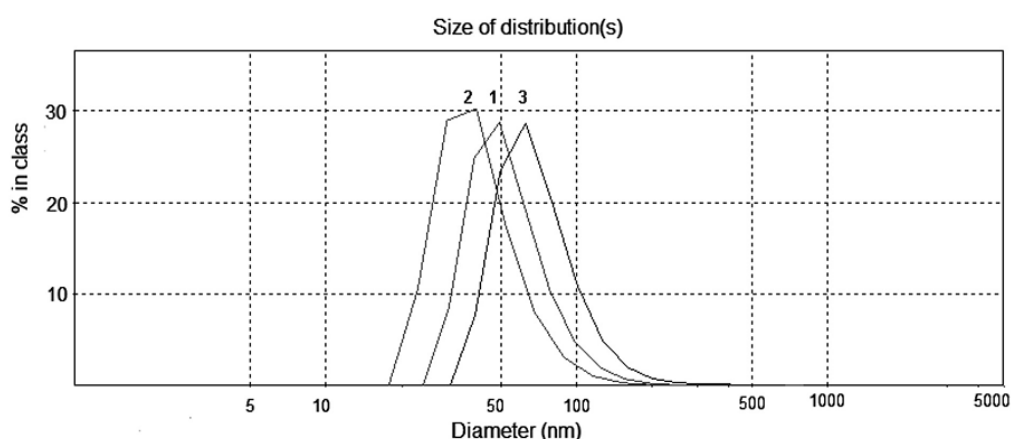


Рис. 8.1. Динамічне світлорозсіювання водного колоїдного розчину 100 мкМ C_{60} фулерену. Проводили три вимірювання кожні 5 хв (піки 1, 2 і 3) упродовж 15 хв

Поведінка C_{60} фулеренових наночастинок, які мають негативний поверхневий заряд, визначається не лише гідрофобними і Ван-дер-Ваальсовими, але й електростатичними взаємодіями, тобто залежить від присутності електролітів у середовищі розчинення [123].

Порівняльний аналіз відносної кількості певного розміру C_{60} фулеренових частинок вказує на те, що у водному зразку значну частину (30%) складають наночастинки діаметром 43 нм, тоді як у фізіологічному розчині виявлено частинки C_{60} фулерену розміром від 40 до 600 нм переважно (25%) діаметром 94 нм та у невеликій кількості (лише 2%) частинки діаметром 378 нм (Рис. 8.2).

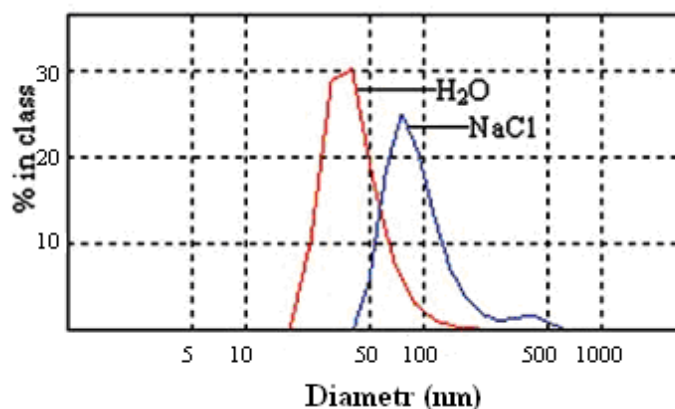


Рис. 8.2. Динамічне світлорозсіювання 100 мкМ C_{60} фулерену у воді та розчині 0,9% NaCl

Отже, агрегатний стан частинок C_{60} фулерену у розчині NaCl змінюється, а саме спостерігається відхиленням вправо як діапазону розміру частинок, так і значення піку, що свідчить про зростання вмісту більших за діаметром частинок C_{60} фулерену (від 48 до 600 нм), порівняно з таким у водному розчині (від 12 до 120 нм).

Встановлено, що електрофоретична рухливість, обумовлена негативним поверхневим зарядом наночастинок C_{60} фулерену, знижується при підвищенні концентрації електролітів типу як 1:1, так 1:2 [103, 140, 328]. Наприклад, підвищення концентрації йонів натрію призводить до зв'язування іону на поверхні наночастинки, екранування її поверхневого заряду і зниження енергетичного бар'єра агрегації, внаслідок чого агрегація наночастинок прискорюється [158]. Згідно даних [123], критична концентрація коагуляції

наночастинок немодифікованого C_{60} фулерену для NaCl при рН=5,2 становить 120 мМ. Отримані нами результати підтверджують тенденцію до агломерації наночастинок немодифікованого C_{60} фулерену у фізіологічному розчині NaCl.

Оскільки обов'язковим компонентом культуральних поживних середовищ, наближених за складом до біологічних рідин, є білки, тому був досліджений розподіл за розміром частинок C_{60} фулерену при внесенні їх у середовище альбуміну.

Характерний діапазон розміру наночастинок у 5%-му водному розчині альбуміну становив 2-26 нм з піком порядку 5 нм (Рис. 8.3, крива 2). При змішуванні C_{60} фулерену і альбуміну діаметр утворених наночастинок у такому розчині збільшувався від 4 до 40 нм з піком порядку 10 нм (Рис. 8.3, крива 3), що свідчить про зв'язування C_{60} фулерену з альбуміном.

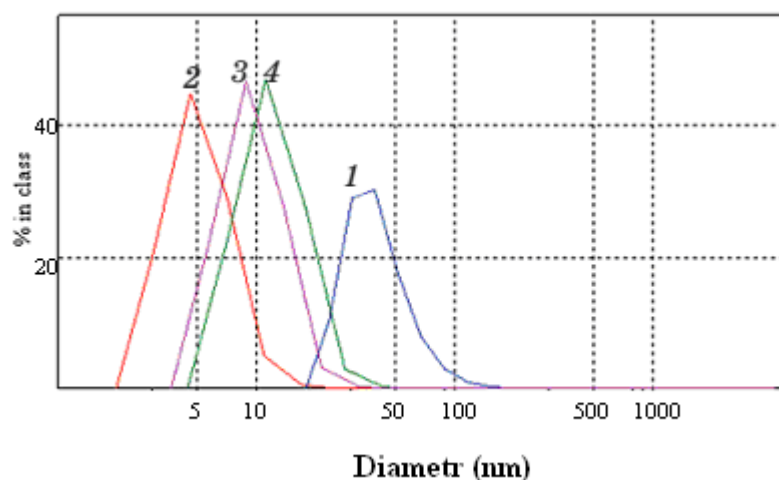


Рис. 8.3. Динамічне світлорозсіювання водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (1), альбуміну (2), C_{60} фулерену і альбуміну (3), C_{60} фулерену, альбуміну і NaCl (4)

Таке зв'язування попереджало агломерацію поодиноких молекул C_{60} , викликану NaCl, оскільки в розчині, який містив альбумін, NaCl і C_{60} фулерен розмір наночастинок (Рис. 8.3, крива 4) залишався майже у такому ж діапазоні (4,5-45 нм), як і в розчині C_{60} фулерену з альбуміном, а значення середнього діаметра наночастинок у середовищі, що містило альбумін, NaCl і C_{60} фулерен

(13 нм) є значно меншим, ніж наночастинок C_{60} фулерену у воді (43 нм) (Рис. 8.3, крива 1) та в 0,9%-му NaCl (94 нм) (Рис. 8.2).

Таким чином, наявність альбуміну в середовищі сприяє диспергуванню наночастинок C_{60} фулерену і, водночас, попереджає як їх спонтанну, так і індуковану NaCl агломерацію.

Важливою складовою досліджень є оцінка концентраційної залежності ефектів наночастинок. Розподіл за розміром частинок C_{60} фулерену вивчали в середовищі RPMI 1640 з 5% ЕТС при внесенні C_{60} фулерену за концентрацій 100 і 200 мкМ. Культуральне середовище RPMI 1640 є складною сумішшю, що містить, зокрема, солі, амінокислоти, різні протеїни і ліпіди.

Аналіз кривих, які відображають кількість частинок певного розміру у загальному об'ємі зразка, показав наявність частинок розміром у діапазоні від 20 до 450 нм у середовищі RPMI 1640 із 5% ЕТС за присутності 100 мкМ C_{60} фулерену (Рис. 8.4). Однак суттєвої агломерації не відбувалося: як у RPMI 1640, так і водному розчині переважають наночастинки із середнім діаметром 50 нм (Рис. 8.4; Рис. 8.1). Водночас, двократне збільшення концентрації C_{60} фулерену у середовищі RPMI супроводжується помітним посиленням агломерації. Крива, яка характеризує розподіл частинок за розміром зміщується вправо у діапазон від 40 до 600 нм і має два піки - 60 і 413 нм (Рис. 8.4).

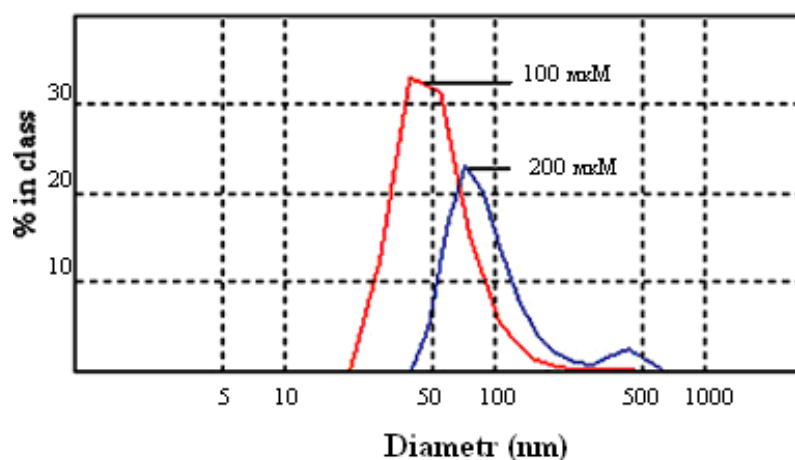


Рис. 8.4. Динамічне світлорозсіювання водного колоїдного розчину C_{60} фулерену у середовищі RPMI 1640 з 5% ембріональною сироваткою теляти

Таким чином, при внесенні 100 мкМ C₆₀ фулерену у середовище, яке є наближене за складом до біологічних рідин, не спостерігається значної агломерації частинок. Це узгоджується з гіпотезою [108] відносно того, що включення компонентів протеїнової та ліпідної природи до складу середовища є умовою оптимального диспергування карбонових наночастинок у біологічних системах. Критичним фактором, який сприяє агломерації наночастинок C₆₀ фулерену, є підвищення його концентрації у середовищі.

Отримані результати динамічного розсіювання світла показали, що водний колоїдний розчин немодифікованого C₆₀ фулерену є гомогенним, стабільним та полідисперсним, у якому переважно містяться агломерати з гідродинамічним діаметром від 12 до 120 нм, при цьому значна частина (30%) припадає на наночастинки діаметром 43 нм.

8.2. Характеристика просторової структури нанокomплексу C₆₀ фулерену з цисплатином (C₆₀-Cis-Pt) *in silico*

Можливість комплексоутворення C₆₀ фулерену з цисплатином у водному середовищі було оцінено з використанням комп'ютерного моделювання. Структурні та енергетичні параметри комплексоутворення між молекулами C₆₀ фулерену і цисплатину були розраховані шляхом мінімізації його загальної енергії у водному середовищі. Структура оптимізованого нанокomплексу C₆₀-Cis-Pt представлена на Рис. 8.5. Зазначимо, що найближчий атом карбону молекули C₆₀ знаходиться на відстані 2,75 Å від атому Pt; атоми нітрогену знаходяться ближче до C₆₀ фулерену, ніж атоми хлору; молекула Cis-Pt орієнтується відповідно до її дипольного моменту з позитивним полюсом, розташованим ближче до молекули C₆₀; відстань між найближчим атомом карбону C₆₀ фулерену до атому гідрогену Cis-Pt дорівнює 1,78 Å і це є найменша відстань між цими молекулами.

Як результат проведеної молекулярної динаміки структури нанокomплексу C₆₀-Cis-Pt у водному середовищі, були одержані такі його енергетичні характеристики: Ван-дер-Ваальсова енергія - $\Delta G_{vdw} \approx -0,6$ кДж/моль, електростатична енергія - $\Delta G_{el} \approx 0,9$ кДж/моль та енергія гідрофобних взаємодій

- $\Delta G_{\text{hyd}} \approx -9,0$ кДж/моль. Досить малі значення Ван-дер-Ваальсової та електростатичної енергій є цілком очікуваними як наслідок компенсаторної природи взаємодій з водним середовищем (ентальпійна складова) та між самими взаємодіючими молекулами. Водночас, гідрофобні взаємодії є домінуючими, чому сприяє переважно ентропійний характер комплексоутворення між молекулами C_{60} і цисплатину.

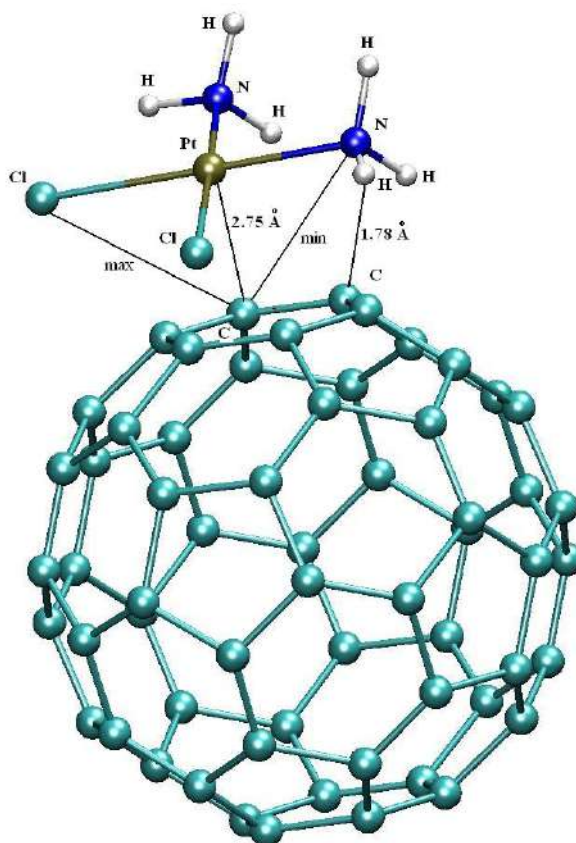


Рис. 8.5. Розрахована структура наноконкомпексу C_{60} -Cis-Pt (співвідношення молекул 1:1) у водному розчині

Отже, з використанням комп'ютерного моделювання показано, що між молекулами C_{60} та Cis-Pt можливе комплексоутворення переважно за рахунок гідрофобних взаємодій. Важливо також зазначити, що наноконкомпекс C_{60} -Cis-Pt у співвідношенні молекул 1:1 (Рис. 8.5) є найпростішою одиницею взаємодії. Хоча не виключено, що на поверхні фулеренового кластера може абсорбуватися більше ніж одна молекула цисплатину (~15). Наступним

завданням було охарактеризувати структуру та стабільність створеного наноконплексу C₆₀-Cis-Pt.

8.3. Характеристика структури C₆₀-Cis-Pt наноконплексу з використанням фізичних методів

Щоб переконатися в стійкості та стабільності C₆₀-Cis-Pt наноконплексу у водному розчині необхідним є вивчення його структурних параметрів. Структурний стан та морфологію C₆₀-Cis-Pt наноконплексу вивчали з використанням таких методів, як динамічне розсіювання світла (ДРС), атомно-силова мікроскопія (АСМ), сканувальна тунельна мікроскопія (СТМ) та малокутове рентгенівське розсіювання (МКРР).

Цисплатин розчиняється у фізіологічному розчині [314], тому приготовлений розчин наноконплексу C₆₀-Cis-Pt у своєму складі містив NaCl за кінцевої концентрації 0,45%. Оскільки NaCl впливає на агрегатний стан молекул C₆₀ (Рис. 8.2), то при порівняльних дослідженнях структури C₆₀ фулерену та наноконплексу C₆₀ фулерену з цисплатином, у водному розчині C₆₀ фулерену створювали певну іонну силу за рахунок додавання фізіологічного розчину. Ступінь агрегації молекул C₆₀ буде однаковим як у водному розчині, так і розчині із цисплатином. З метою запобігання утворення фулеренових кластерів великого розміру водний колоїдний розчин C₆₀ фулерену і наноконплексу обробляли ультразвуком.

Комплексоутворення між C₆₀ фулереном і цисплатином у співвідношенні 1:2,4 молярних концентрацій (1:1 масових) спочатку оцінювали за допомогою методу динамічного розсіювання світла (ДРС).

Згідно результатів ДРС, представлених на Рис. 8.6, впливає, що у водному колоїдному розчині C₆₀ фулерену містяться наночастинки гідродинамічного розміру від 40 до 100 нм, значну частину (42%) складають наночастинки діаметром 80 нм, тоді як у суміші C₆₀ фулерену з Cis-Pt відмічено зростання гідродинамічного розміру частинок від 80 до 160 нм (середній гідродинамічний діаметр частинок становить приблизно 120 нм).

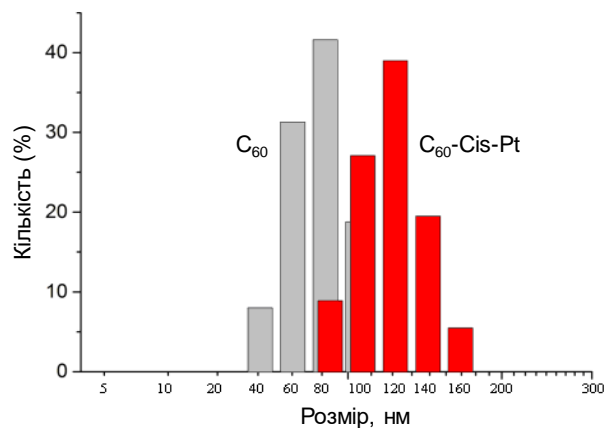


Рис. 8.6. Динамічне розсіювання світла водного колоїдного розчину C₆₀ фулерену (104 мкМ) (сірий колір) та суміші C₆₀ фулерену з Cis-Pt (104 мкМ C₆₀:250 мкМ Cis-Pt) (червоний колір)

Отримані результати ДРС щодо збільшення розміру частинок при комплексації C₆₀ фулерену із цисплатином узгоджуються з даними АСМ. Так, поверхня, утворена з водного колоїдного розчину C₆₀ фулерену рівномірно вкрита наночастинками розміром від 5 до 32 нм, тоді як поверхня, утворена із суміші C₆₀ фулерену із цисплатином, вкрита наночастинками удвічі більшого розміру від 10 до 70 нм (Рис. 8.7).

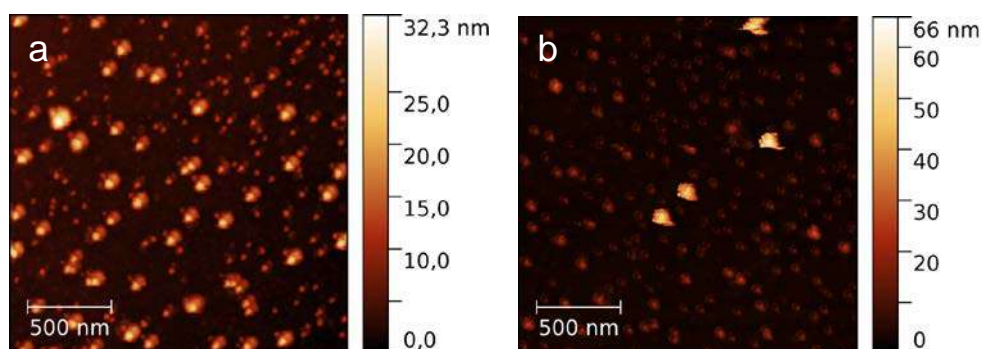


Рис. 8.7. Знімки атомно-силової мікроскопії (АСМ) наночастинок C₆₀ фулерену (а) та наноконплексу C₆₀-Cis-Pt (b), осаджених з відповідних розчинів (104 мкМ C₆₀ фулерен, 250 мкМ Cis-Pt) на поверхню слюди

C₆₀ фулерен інтенсивно поглинає світло у діапазоні ближнього ультрафіолету при 208, 265 та 347 нм [431] і цисплатин - при 200 та 300 нм

[184]. Комплексація C_{60} фулерену із цисплатином підтверджена спектрофотометричним методом [400], про що свідчило зростання інтенсивності піка при 347 нм.

Можна припустити, що комплексоутворення між C_{60} фулереном і Cis-Pt, відбувається шляхом адсорбції молекули Cis-Pt на поверхні кластерів C_{60} фулерену, послаблюючи, таким чином, електростатичні відштовхування між самими молекулами C_{60} , та є подібним до комплексоутворення між C_{60} фулереном і доксорубіцином [164, 494].

Наступним методом за допомогою якого вивчали розмір наночастинок C_{60} фулерену, цисплатину та їх суміші у водному розчині є сканувальна тунельна мікроскопія (СТМ). Даний метод характеризується високою роздільною здатністю та дозволяє вивчати структуру наночастинок розміром від 0,2 нм.

СТМ знімки моношарових плівок, утворених шляхом нанесення на поверхню Au (111) відповідних розчинів C_{60} фулерену, або Cis-Pt, або C_{60} -Cis-Pt наноконкомпексу, представлені на Рис. 8.8 і 8.9. Висоту частинок оцінювали вздовж позначених на зображеннях ліній (Z-профілі).

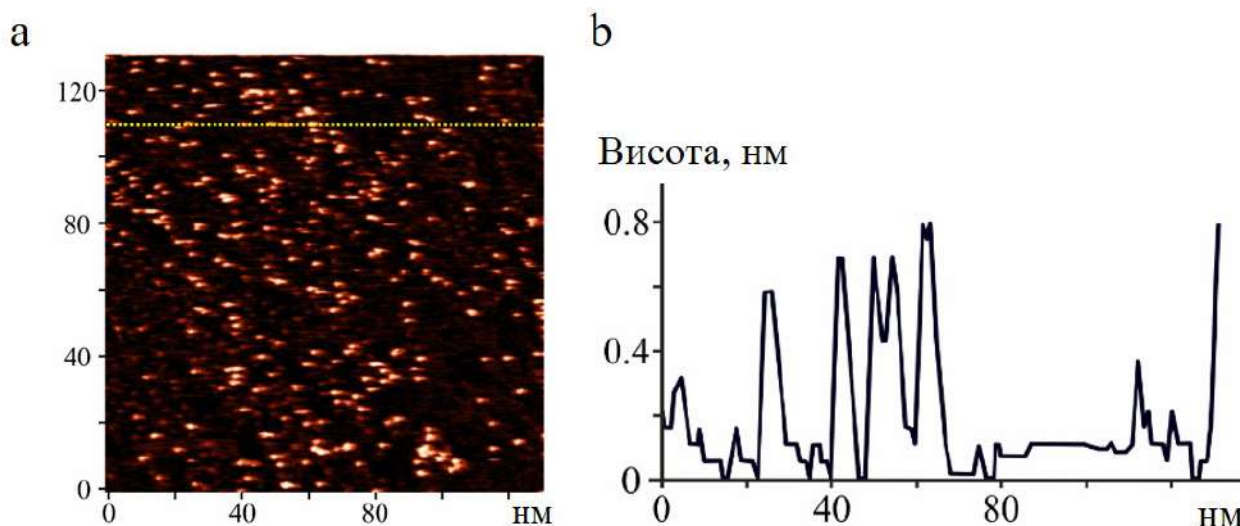


Рис. 8.8. Знімки сканувальної тунельної мікроскопії (СТМ) моношару C_{60} фулеренів (104 мкМ), осадженого з водного колоїдного розчину на поверхню Au (111). Параметри сканування: $I_t = 93$ рА, $U_t = 713$ мВ (а); Z-профіль (б) уздовж жовтої лінії, позначеної на зображенні (а)

Згідно наших попередніх спектроскопічних даних [203, 400] в розчині C_{60} фулерену (100 мкМ) присутні як нанокластери (наноагрегати) з середнім гідродинамічним діаметром 100 нм, так і поодинокі молекули C_{60} діаметром 1 нм.

Аналіз СТМ знімків показав, що моношарова плівка, приготовлена з водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (104 мкМ) на поверхні Au (111), вкрита поодинокими молекулами C_{60} (Рис. 8.8а). Середня висота скануючих об'єктів коливалася в межах від 0,2 до 0,8 нм, із середнім розміром $\sim 0,72$ нм (Рис. 8.8b).

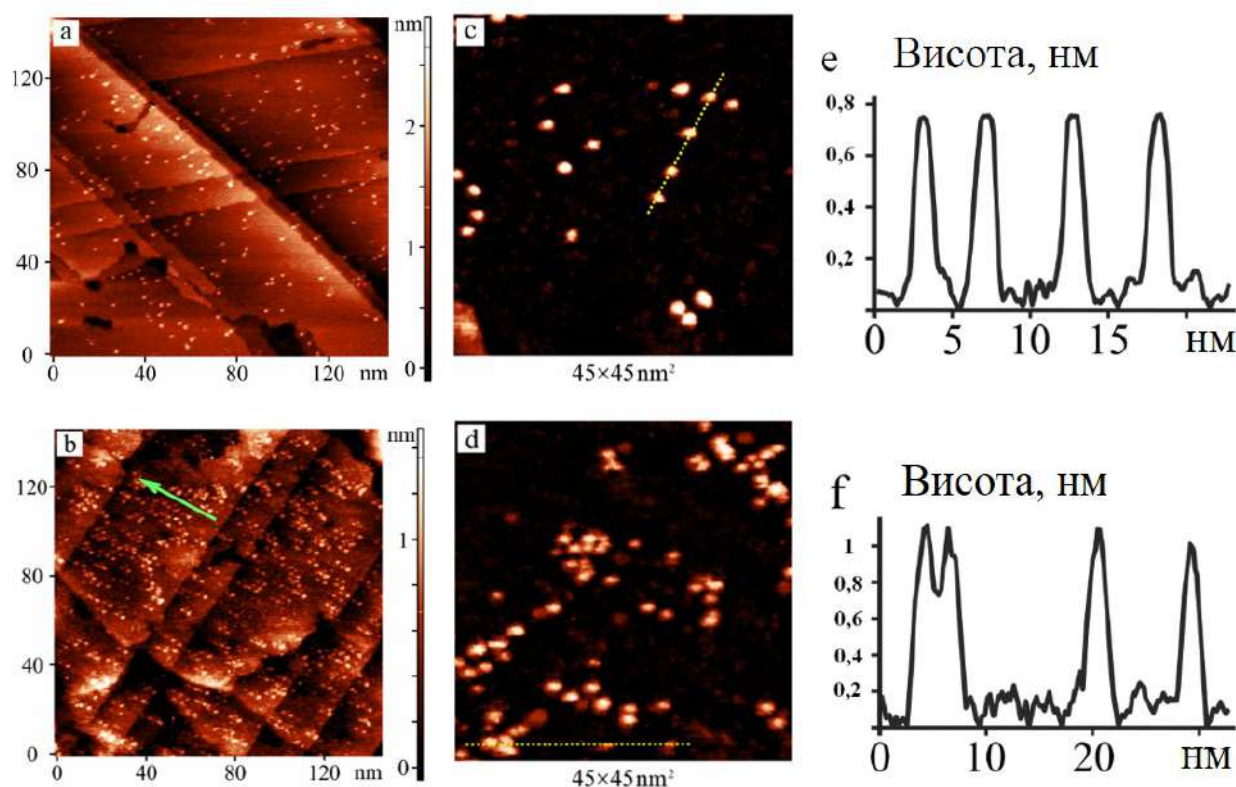


Рис. 8.9. Знімки сканувальної тунельної мікроскопії (СТМ) моношарів Cis-Pt (a) та C_{60} -Cis-Pt (b), осаджених з відповідних розчинів (Cis-Pt (250 мкМ), C_{60} -Cis-Pt (104:250 мкМ)) на поверхню Au (111); Поодинокі молекули Cis-Pt: параметри сканування: $I_t = 93$ рА, $U_t = 713$ мВ (c) та поодинокі молекули C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексів: параметри сканування: $I_t = 58$ рА, $U_t = 685$ мВ (d); Z-профілі (e, f) уздовж жовтих ліній, позначених на зображеннях (c) (Cis-Pt) і (d) (C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс)

СТМ знімки моношару приготовленого з розчину цисплатину (концентрація Cis-Pt у розчині становила 250 мкМ) вказують на те, що поверхня підкладки вкрита поодинокими молекулами Cis-Pt (Рис. 8.9а, с). Скануючі молекули Cis-Pt мали висоту до 0,75 нм (Рис. 8.9е).

При вивченні моношарових плівок, приготовлених із розчину C₆₀ фулерену та цисплатину (C₆₀:Cis-Pt як 104:250 мкМ), за допомогою СТМ показано, що спостережувані молекули C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу були більшого розміру, ніж молекули C₆₀ фулерену або Cis-Pt окремо (Рис. 8.9b, d). Середня висота C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу становила 1,1 нм (Рис. 8.9f).

Згідно СТМ знімків наночастинки комплексу C₆₀-Cis-Pt утворюють ланцюгоподібні структури, орієнтовані в певному напрямі (на Рис. 8.9b показано зеленою стрілкою), що вказує на комплексоутворення за механізмом самозбирання.

Структуру отриманого C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу, а також його стабільність в розчині оцінювали за значенням ζ (дзета) –потенціалу (потенціал на межі фаз між твердим тілом і рідиною). Нами показано, що значення дзета-потенціалу C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу дорівнювало -21.2 мВ, яке не змінювалося через 3 місяці після створення наноконкомплексу. Для водного колоїдного розчину C₆₀ фулерену значення дзета-потенціалу становить -23 мВ [417]. Такий високий негативний заряд окремих наночастинок (або електростатичне відштовхування між негативно зарядженими агрегатами) свідчить про стабільність досліджуваного водного розчину.

Отже, запропонована технологія додавання нейтральних молекул Cis-Pt до водного розчину C₆₀ фулеренів призводить до їх фізичної адсорбції як поодинокими молекулами C₆₀, так і фулереновими кластерами, що і спричинює перерозподіл зарядів на межі фаз між частинками і рідиною у досліджуваній системі, зменшуючи абсолютне значення дзета-потенціалу. Слід зазначити, що велике (за абсолютною величиною) значення дзета-потенціалу будь-якого водного колоїдного розчину свідчить про його високу стійкість до агрегації.

Можливість формування наноконкомплексу між молекулами C₆₀ і Cis-Pt вивчали за допомогою мало-кутового рентгенівського розсіювання (МКРР).

При проведенні МКРР експериментів було зафіксовано сигнали рентгенівського розсіювання у досліджуваних водних розчинах зразків, які відрізнялися за інтенсивністю (Рис. 8.10а). Так, у водному колоїдному розчині C_{60} фулерену інтенсивність рентгенівського розсіювання була вищою, порівняно з розчином C_{60} фулерену із Cis-Pt. Хвильове число випромінювання зразків знаходилося в діапазоні $0,07 - 4,6 \text{ nm}^{-1}$. Отримані експериментальні дані інтенсивності рентгенівського розсіювання зразків обробляли методом непрямого Фур'є-перетворення [193], внаслідок чого були отримані функції розподілу по парним відстаням рентгенівського розсіювання C_{60} фулерену і C_{60} -Cis-Pt (Рис. 8.10b). Важливо зазначити, що ці функції розподілу відрізняються лише кількістю максимумів – один для C_{60} фулерену і два для C_{60} -Cis-Pt. Згідно даних [193], це є прямим свідченням формування комплексу між молекулами C_{60} і Cis-Pt.

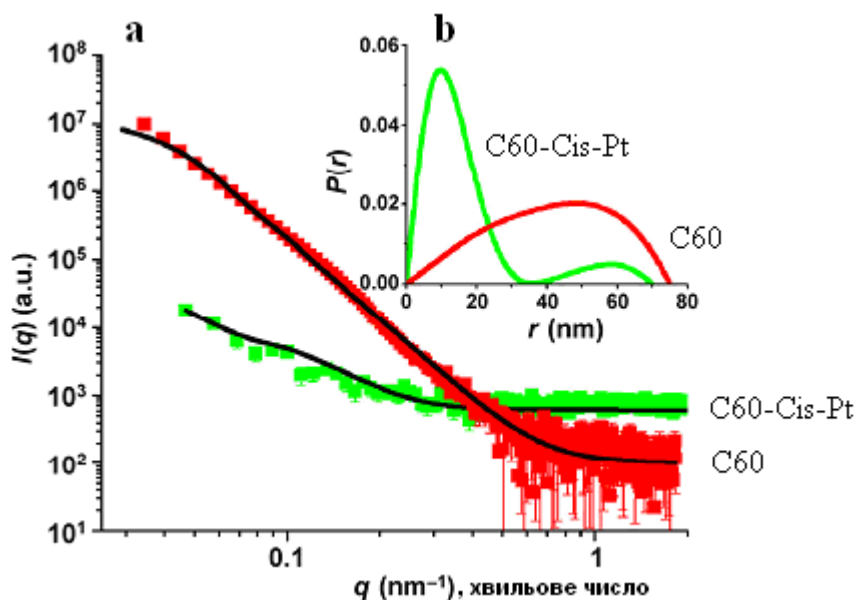


Рис. 8.10. Криві інтенсивності мало-кутового рентгенівського розсіювання (МКРР) водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (104 мкМ) та розчину C_{60} -Cis-Pt (104:250 мкМ) (а). Функції розподілу по парним відстаням для розсіювання C_{60} фулерену і C_{60} -Cis-Pt у воді (б)

Отримані результати оцінки структурного стану C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу за допомогою фізико-хімічних методів добре узгоджуються з теоретичними розрахунками про формування C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу. Згідно

молекулярного моделювання C_{60} -Cis-Pt наноконплекс у співвідношенні молекул 1:1 є найпростішою одиницею взаємодії молекул C_{60} фулерену із Cis-Pt, не виключено адсорбцію більш ніж однієї молекули Cis-Pt нанокластером C_{60} фулерену. За допомогою методів зондової мікроскопії підтверджено конплексоутворення між молекулами C_{60} фулерену і Cis-Pt, а за допомогою динамічного розсіювання світла - стабільність утвореного наноконплексу. Молекули Cis-Pt можуть адсорбуватися на поверхні нанокластерів C_{60} фулерену, послаблюючи електростатичне відштовхування молекул C_{60} , внаслідок чого утворюється нековалентний C_{60} -Cis-Pt наноконплекс, який стабілізується за рахунок гідрофобних взаємодій.

Створений нами колоїдний розчин C_{60} -Cis-Pt наноконплексу є стабільним та гомогенним упродовж 3 місяців, що свідчить про можливість його використання в біологічних дослідженнях. Наступним завданням було дослідити біологічну активність отриманого C_{60} -Cis-Pt наноконплексу за умов *in vitro*.

Висновки до РОЗДІЛУ 8:

У водному колоїдному розчині містяться як поодинокі молекули C_{60} фулерену, так і частинки розміром від 12 до 120 нм, при цьому їх значну частину складають наночастинки із середнім гідродинамічним діаметром близько 43 нм.

Конплексоутворення між поодинокими молекулами C_{60} та Cis-Pt підтверджено з використанням молекулярного моделювання та фізико-хімічних методів: динамічного розсіювання світла (ДРС), атомно-силової мікроскопії (АСМ), сканувальної тунельної мікроскопії (СТМ) та мало-кутового рентгенівського розсіювання (МКРР).

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [32, 203, 394, 396, 397, 398,].

РОЗДІЛ 9

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ C₆₀-Cis-Pt НАНОКОМПЛЕКСУ В СИСТЕМІ *IN VITRO*

При дослідженні біологічних ефектів хімічних сполук необхідною умовою є порівняльна оцінка їх токсичної дії щодо нормальних і злякисно трансформованих клітин, тому об'єктами дослідження цитотоксичної дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу було використано лінію клітин HEK293 ембріональної нирки людини та лінії злякисно трансформованих клітин різного гістогенезу, зокрема, клітини LLC карциноми легені Льюїс миші, клітини HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії людини та їх резистентні сублінії, клітини HeLa і KB-3-1 карциноми шийки матки людини.

Для порівняння цитотоксичного ефекту C₆₀-Cis-Pt наноконплексу з вільним цисплатином концентрацію наноконплексу було представлено у еквівалентній концентрації цисплатинового компонента.

9.1. Життєздатність і цитоморфологічні особливості клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293 за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу

Життєздатність клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293 оцінювали за допомогою МТТ-тесту через 24 та 48 год після дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу у порівнянні із окремою дією цисплатину. Як контроль використано клітини інкубовані без додавання C₆₀ фулерену, Cis-Pt або C₆₀-Cis-Pt наноконплексу, показник життєздатності яких приймали за 100%.

Через 24 год інкубації C₆₀-Cis-Pt наноконплексу і цисплатину у діапазоні концентрацій (5-20 мкМ) не виявляли токсичності щодо клітин HEK293 (Рис. 9.1А). Після дії 5 мкМ C₆₀-Cis-Pt наноконплексу у еквівалентній концентрації цисплатину життєздатність клітин HEK293 зростала на 25% порівняно з контролем, що свідчить про підвищення їх проліферативної активності, як наслідок початкової адаптивної відповіді на дію сполуки. Наноконплексу та

цисплатин у концентрації 40 мкМ спричиняли інгібуючий ефект на життєздатність клітин, внаслідок чого показник проліферативної активності знижувався на 20 та 23% відповідно відносно контролю (Рис. 9.1А).

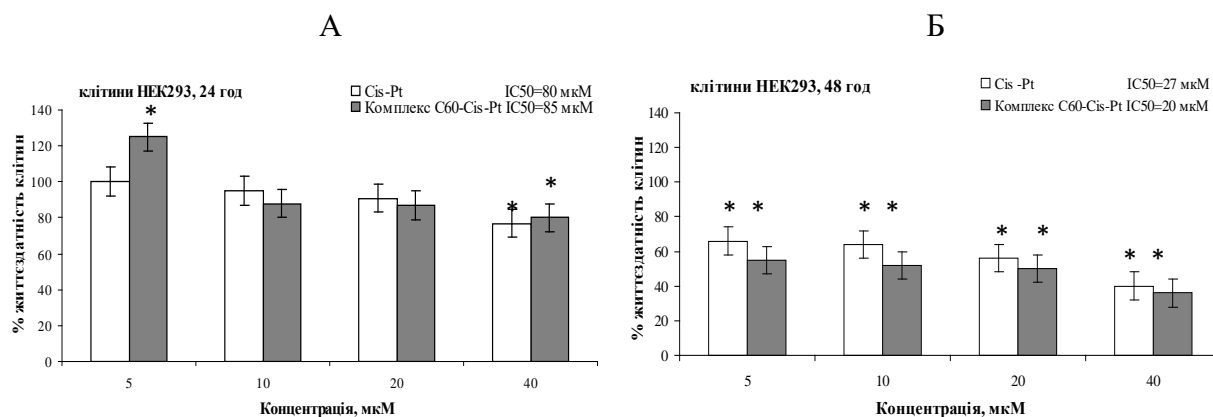


Рис. 9.1. Життєздатність клітин HEK294, інкубованих з C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом за еквівалентної концентрації цисплатину або з вільним цисплатином упродовж 24 та 48 год (M±m, n=6). *p<0.05 порівняно з контролем (необроблені клітини)

Життєздатність клітин HEK293 через 48 год після окремої дії цисплатину та у складі наноконкомплексу значно знижувалася (Рис. 9.1Б). Слід відмітити, що інгібуючий ефект наноконкомплексу був рівним такому як для цисплатину, про що також свідчили значення показника IC₅₀ як через 24 год - 85 та 80 мкМ, так і через 48 год - 20 та 27 мкМ відповідно (Рис. 9.1). Через 48 год інкубації зниження кількості життєздатних клітин HEK293 спостерігалось уже після дії 5 мкМ наноконкомплексу та вільного цисплатину на 45% та 34% відповідно відносно контролю. Із збільшенням концентрації цитотоксичний ефект досліджуваних сполук посилювався. Так, через 48 год після дії 40 мкМ наноконкомплексу та цисплатину кількість життєздатних клітин знижувалася на 64 та 60% відповідно.

Авторами [82] показано, що життєздатність клітин HEK293 після дії цисплатину у концентрації 50 мкМ через 12 та 24 год знижувалася на 25 та 43% відповідно відносно контролю, а після додавання в інкубаційне середовище 80 мкМ цисплатину токсичний ефект посилювався незначно порівняно із

50 мкМ цисплатином. Зниження кількості життєздатних клітин НЕК293 на 50% через 24 год спостерігалось після дії 80 мкМ цисплатину [82].

Про цитотоксичну дію наноконкомплексу і цисплатину за концентрації 5 мкМ через 48 год на клітини НЕК294 свідчили цитоморфологічні зміни (Рис. 9.2). Необроблені клітини НЕК294 (контроль) формували епітеліоподібні структури видовженої форми із відростками, спостерігалась велика кількість міжклітинних контактів, а в окремих ділянках клітини формували щільний моношар. 5 мкМ вільний цисплатин та комплексований з C_{60} фулереном індукували зниження кількості життєздатних клітин НЕК294, більшість клітин характеризувалися нетиповою морфологією та меншим розміром, спостерігалися скупчення клітин округлої форми і без відростків.

C_{60} фулерен у діапазоні концентрацій 2,5-25 мкМ не впливав на життєздатність та цитоморфологічні ознаки клітин НЕК294 (дані не наведено). Показник IC_{50} за дії C_{60} фулерену для клітин НЕК294 через 24 год інкубації становив 532,5 мкМ.

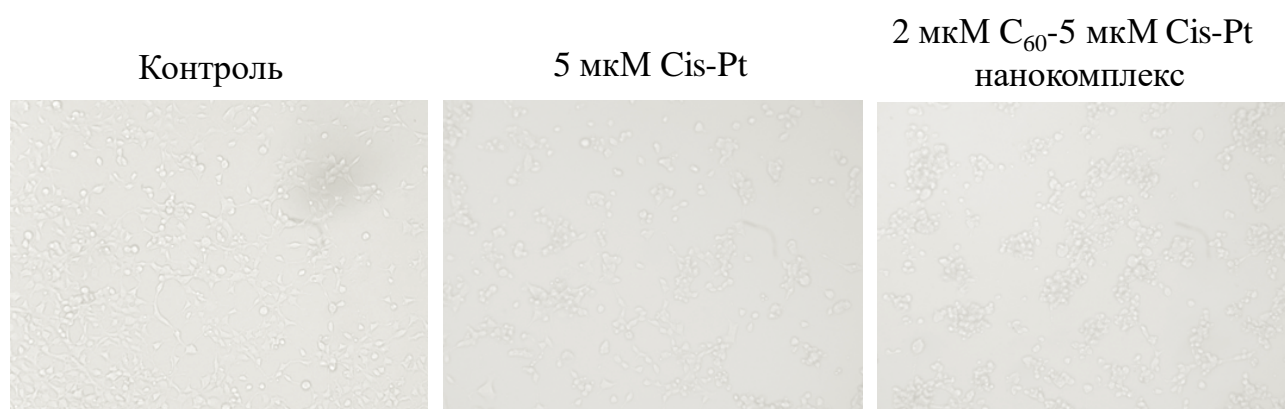


Рис. 9.2. Мікрофотографії клітин НЕК294 через 48 год інкубації у присутності цисплатину або C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу за еквівалентної концентрації цисплатину (фазово-контрастна мікроскопія, x400)

Отже, Cis-Pt та C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс у діапазоні концентрацій 5-40 мкМ через 24 год інкубації не впливали на життєздатність клітин НЕК294, а виявлений інгібуючий ефект C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу щодо проліферативної активності клітин НЕК294 через 48 год був рівним такому як для цисплатину, про що також свідчили значення показників IC_{50} .

9.2. Токсичність C₆₀-Cis-Pt наноконплексу щодо клітин LLC карциноми легені Льюїс

9.2.1. Життєздатність клітин LLC та їх цитоморфологічні особливості за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу

Цитотоксичну дію C₆₀-Cis-Pt наноконплексу щодо клітин LLC оцінювали у діапазоні концентрацій 1-25 мкМ через 24, 48 і 72 год інкубації у порівнянні з окремою дією Cis-Pt з використанням МТТ-тесту. Життєздатність клітин, інкубованих без додавання C₆₀ фулерену, Cis-Pt або C₆₀-Cis-Pt наноконплексу, приймали за 100% і використовували як контроль.

C₆₀ фулерен за окремої дії у діапазоні концентрацій 0,42-10,4 мкМ, еквівалентному як у складі наноконплексу, не впливав на життєздатність клітин LLC упродовж досліджуваних термінів (дані не представлено).

Цисплатин в діапазоні концентрацій 1-25 мкМ і C₆₀-Cis-Pt наноконплекс в еквівалентних концентраціях Cis-Pt упродовж досліджуваних термінів спричиняли часо- і дозозалежне зниження життєздатності клітин LLC (Рис. 9.3).

Життєздатність клітин LLC, інкубованих у присутності цисплатину через 24 год знижувалася на 26% і за концентрації препарату 25 мкМ. Розраховане значення показника IC₅₀ за дії Cis-Pt для клітин LLC становило 50 мкМ, що узгоджується з літературними даними. Так, показник IC₅₀, отриманий при вивченні токсичності Cis-Pt щодо клітин раку легені A549 становив 55 мкМ [428] і 64 мкМ [536], що свідчить про стійкість клітин LLC до токсичної дії Cis-Pt.

Комплексація Cis-Pt з C₆₀ фулереном дозволила прискорити і підвищити цитотоксичну активність цисплатину через 24 год, а також утричі знизити значення показника IC₅₀ (Рис. 9.3а). Подібний ефект, а саме C₆₀-Cis-Pt наноконплекс характеризувався вищою цитотоксичністю порівняно з окремою дією Cis-Pt, спостерігався через 48 год і 72 год (Рис. 9.3b,c). Так, через 72 год інкубації життєздатність клітин LLC, інкубованих з C₆₀-Cis-Pt наноконплексом, знижувалася на 82%, а значення показника IC₅₀ було меншим у 4,5 рази ніж при використанні вільного Cis-Pt (Рис. 9.3c).

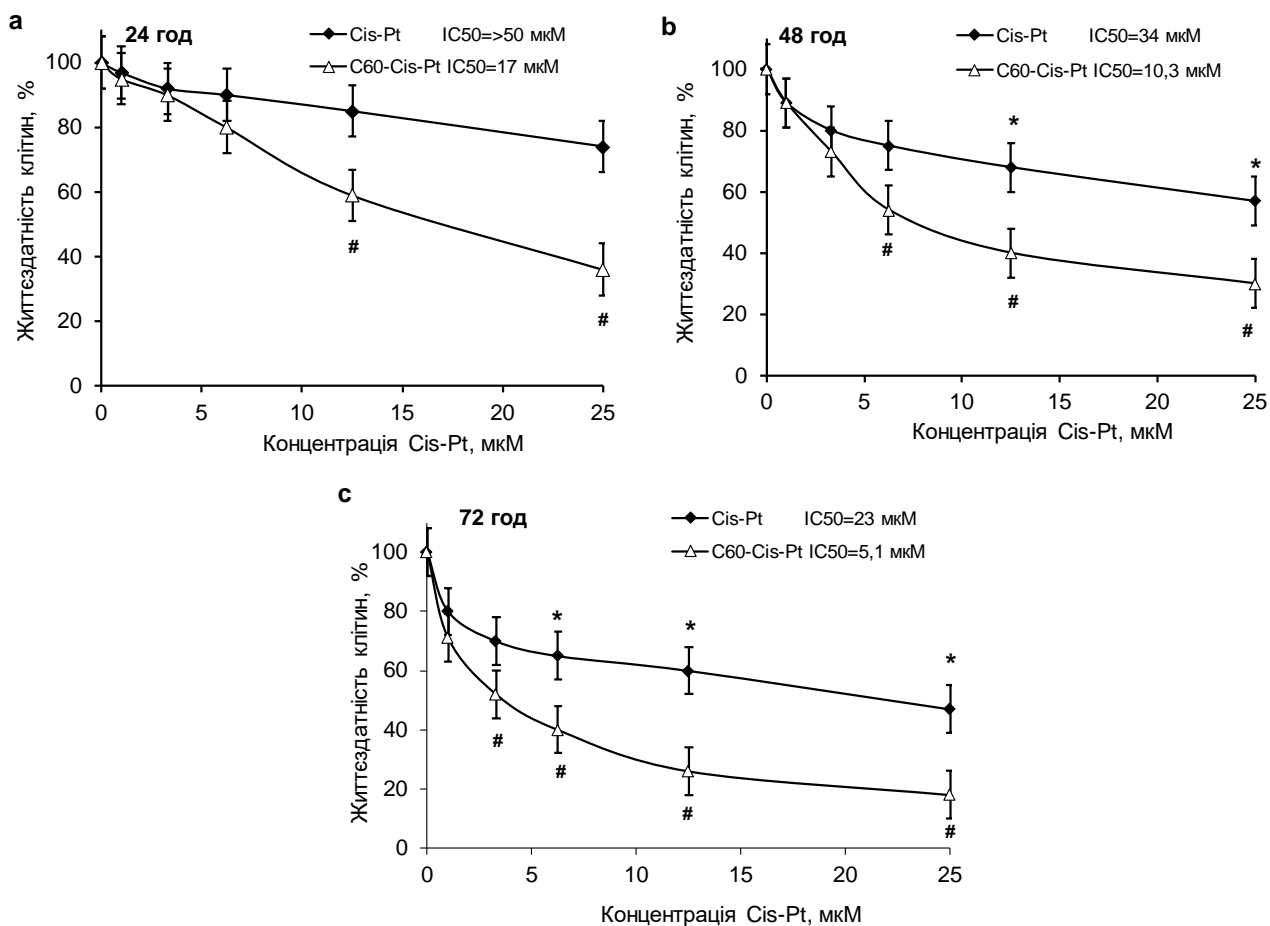


Рис. 9.3. Життєздатність клітин LLC, інкубованих з цисплатином або C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом у еквівалентній концентрації цисплатину упродовж 24, 48 та 72 год (M±m, n=6). *p<0,05 порівняно з контролем, #p<0,05 порівняно з дією цисплатину

Наші дані вказують на те, що C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс характеризується вищою цитотоксичністю і швидше індукує пошкодження клітин LLC порівняно з окремою дією цисплатину, в тому числі за низьких концентрацій Cis-Pt. Токсична дія наноконкомплексу на клітини LLC виявлялася за такої еквівалентної концентрації Cis-Pt, за якої вільний цисплатин не впливав на життєздатність клітин.

Виявлене нами посилення цитотоксичної активності цитостатиків C₆₀ фулереном узгоджується із літературними даними. Так, кон'югат фулеренол-цисплатин виявляв антипроліферативний ефект щодо клітин LLC [117], кон'югат фулерен-доксорубіцин виявляв цитотоксичну активність щодо клітин

раку молочної залози людини MCF-7 [310], а кон'югат фулерен-паклітаксель - щодо клітин епітеліальної карциноми легені людини A549 [533], раку молочної залози залози людини MCF-7 [375], а також меланоми A375M, раку сечового міхура T-24 та гепатоцелюлярної карциноми Hep3B [93].

У подальших експериментах клітини LLC інкубували упродовж 24 год за присутності C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу за еквівалентної концентрації цисплатину 12,5 мкМ. За окремої дії за цієї концентрації цисплатин не впливав на життєздатність клітин LLC, тоді як при комплексації з C_{60} фулереном спричиняв зниження життєздатності клітин на 41% (Рис. 9.3а).

Цитоморфологію клітин LLC через 24 год після дії C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу оцінювали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії (Рис. 9.4).

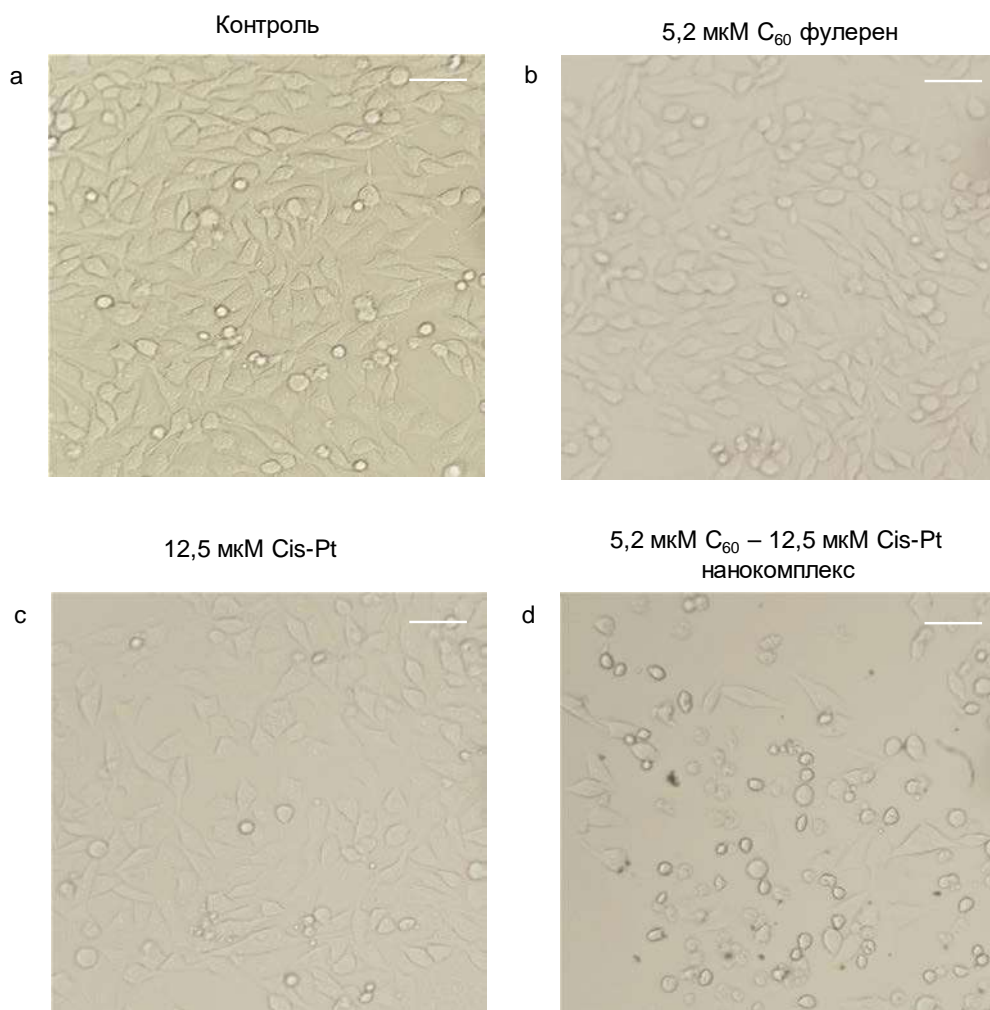


Рис. 9.4. Мікрофотографії клітин LLC через 24 год інкубації у присутності C_{60} фулерену або Cis-Pt окремо або C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу (фазово-контрастна мікроскопія, шкала 100 мкм)

Аналіз зображень показав, що більшість клітин LLC в контролі виглядали плоскими, витягнутими і щільно прилягали між собою (Рис. 9.4a). За дії цисплатину у концентрації 12,5 мкМ, а також C₆₀ фулерену у концентрації 5,2 мкМ не виявлено цитоморфологічних змін клітин LLC (Рис. 9.4b,c). Тоді як за інкубації з C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом у еквівалентній концентрації цисплатину 12,5 мкМ кількість клітин LLC зменшувалася, форма клітин змінювалася на більш округлу, клітини не формували відростків і легко відкріплювалися від субстрату (Рис. 9.4d).

Отримані дані вказують на те, що після інкубації з C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом знижувалася не лише життєздатність клітин LLC, але й змінювалися їх морфологічні особливості, які відіграють важливу роль у адгезії пухлинних клітин та їх міграційній поведінці.

9.2.2. Міграційна активність клітин LLC за дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу

Відомо, що клітини LLC є високоінвазивними і здатні швидко мігрувати в легеневу тканину та індукувати утворення численних метастазів [256]. Для оцінки міграційного потенціалу клітин LLC використовували метод закриття рани, який дозволяє моделювати міграційну поведінку клітин *in vitro*.

У необроблених (контрольних) клітин LLC через 24 год інкубації ширина подряпини у моношарі суттєво звужувалася (Рис. 9.5a), а ступінь заростання рани становив 28% (Рис. 9.5b).

Міграційна активність клітин LLC після дії C₆₀ фулерену у концентрації 5,2 мкМ, або цисплатину у концентрації 12,5 мкМ послаблювалася, в результаті чого ширина подряпини через 24 год незначно вкорочувалася (Рис. 9.5a), а ступінь заростання рани становив 16% і 11% відповідно (Рис. 9.5b). Найбільше пригнічення міграційної активності клітин LLC спостерігалось у разі обробки клітин C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом – ступінь заростання рани у моношарі клітин становив лише 6% (Рис. 9.5b).

Пригнічення міграційної активності високоінвазивних клітин LLC спричинений C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом може бути пов'язаний зі здатністю

карбонних наночастинок інгібувати експресію та активність матричних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 [252, 330], а також експресію адгезивної молекули ICAM-1 (CD54) [190] і кінази фокальної адгезії [466].

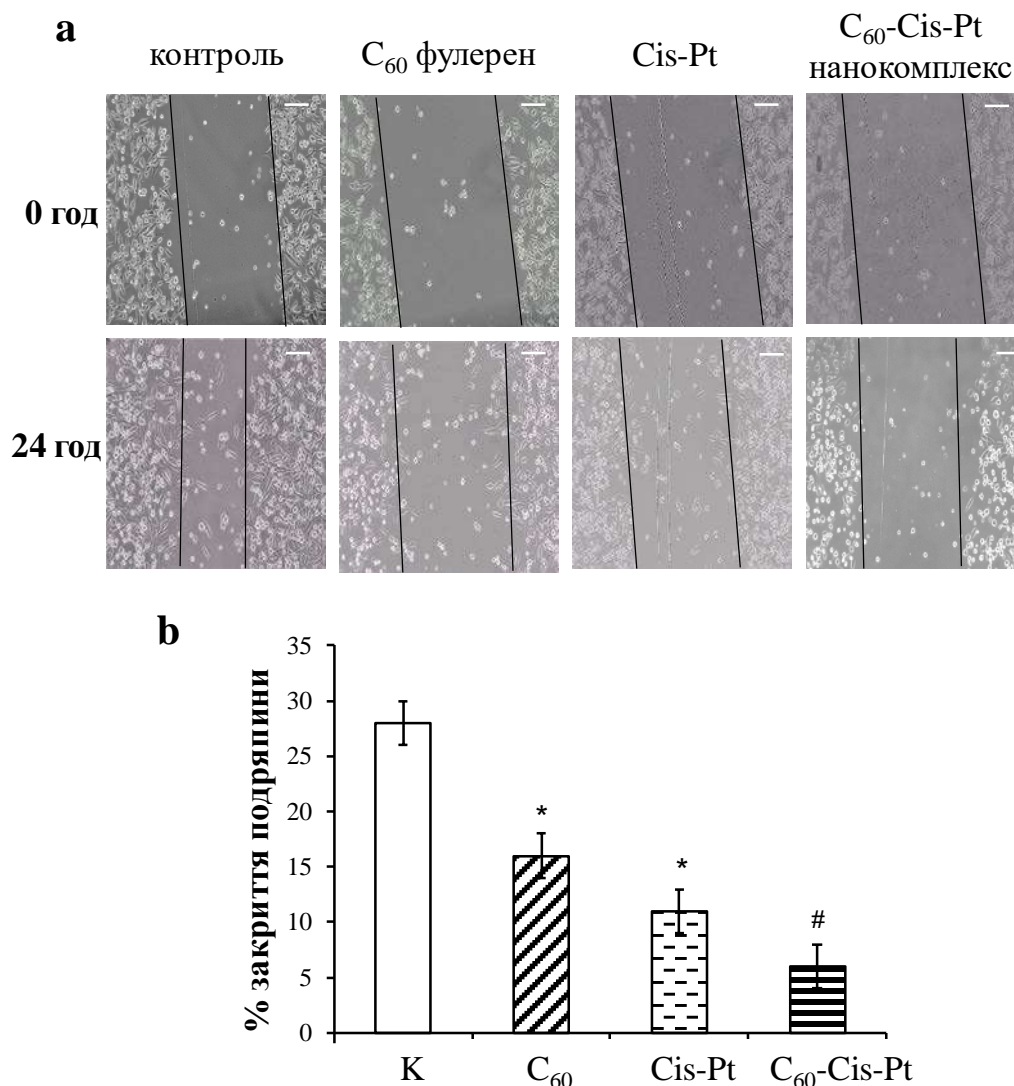


Рис. 9.5. Міграційна активність клітин LLC, інкубованих з C₆₀ фулереном або цисплатином окремо, або C₆₀-Cis-Pt нанокомплексом. Мікрофотографії заростання подряпины у моношарі клітин LLC одразу та через 24 год після зіскоблювання (фазово-контрастна мікроскопія, шкала 100 мкм) (а); Відсоток заростання подряпины у моношарі клітин (b) (M±m, n=4). *p<0,05 порівняно з контролем; #p <0,05 порівняно з дією цисплатину

Таким чином, комплексоутворення цисплатину з C₆₀ фулереном дозволило як знизити ефективну токсичну концентрацію щодо клітин LLC порівняно з окремою дією цисплатину, так і значно інгібувати їх міграційну активність.

9.2.3. Розподіл клітин LLC за фазами клітинного циклу за дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу

Розподіл клітин LLC за фазами клітинного циклу, який оцінювали за допомогою протокової цитофлуориметрії та пропідій йодиду, показав, що через 24 год інкубації більшість необроблених (контрольних) клітин ($44\pm 5\%$) знаходилися в G₀/G₁ фазі (Рис. 9.6а,b).

Злоякісно трансформовані клітини різного гістогенезу накопичуються в G₀/G₁ фазі клітинного циклу для того, щоб перейти із G₁ у S фазу і вступити у стадію мітотичного циклу та інтенсивної проліферації [225, 441].

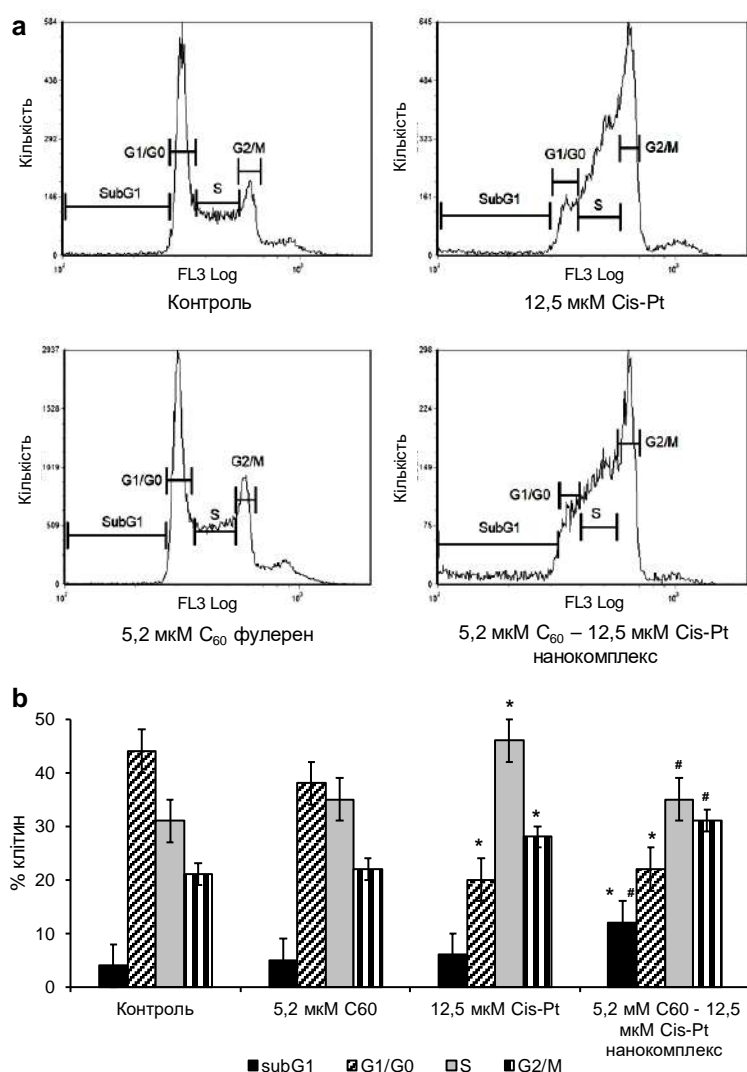


Рис. 9.6. Розподіл клітин LLC за фазами клітинного циклу через 24 год після інкубації з C₆₀ фулереном, або Cis-Pt, або C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом. Гістограми (a) і кількісний аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу (b) ($M\pm m$, $n=6$). * $p<0,05$ порівняно з контролем; # $p<0,05$ порівняно з дією цисплатину

C₆₀ фулерен за концентрації 5,2 мкМ істотно не впливав на проходження LLC клітин за фазами клітинного циклу, хоча кількість клітин дещо зростала у S-фазі (Рис. 9.6b). Cis-Pt за концентрації 12,5 мкМ виявляв цитостатичний ефект щодо клітин LLC, який полягав у прискореному переході до S-фази (46±4% відносно контролю 31±2%) при одночасному зниженні кількості клітин у G₀/G₁ фазі (20±3% відносно контролю 44±4%) та збільшенні кількості клітин у G₂/M фазі (28±2% відносно контролю 21±3%) (Рис. 9.6b). Автори [428] показали, що цисплатин за концентрації 11 мкМ спричиняв накопичення клітин раку легені A549 у G₂/M фазі клітинного циклу. Накопичення клітин у G₂/M фазі з подальшою індукцією загибелі клітин є характерним проявом дії протипухлинних препаратів [70, 283, 476].

Виявлений ефект цитостатика був незначним, що слід було і очікувати, оскільки за цієї концентрації він через 24 год не спричиняв токсичних ефектів щодо клітин LLC, життєздатність клітин знижувалася лише на 15% порівняно з контролем (Рис. 9.3a).

C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс спричиняв істотні зміни у розподілі клітин LLC за фазами клітинного циклу. Так, кількість клітин у S фазі зменшувалася, в той же час спостерігалось подальше накопичення клітин LLC у G₂/M фазі (Рис. 9.6). Перехід клітин у S-фазу після дії наноконкомплексу супроводжувався зниженням проліферативної активності карциномних клітин легені. Автори [251] припускають, що зниження життєздатності клітин A549 після дії рослинного алкалоїду HangAmDan-B може бути обумовлено арештом клітинного циклу у S фазі та індукцією апоптозу. Кон'югат фулеренол-доксорубіцин спричиняв апоптичну загибель клітин, про що свідчив арешт клітин B16-F10 у G₂/M фазі та збільшення у популяції клітин з ознаками апоптозу [117].

C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс спричиняв також затримку клітин у subG₁ фазі, що вважається маркером загибелі клітин шляхом апоптозу, індукованим протипухлинними препаратами, зокрема цисплатином [428, 491, 498].

Таким чином, токсичний ефект C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу супроводжувався не лише зниженням життєздатності клітин LLC та інгібуванням їх міграційної

активності, але й порушенням проходження клітинного циклу і збільшенням кількості клітин як у G2/M, так і у subG1 фазі.

Для з'ясування механізмів цитотоксичної дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу і чи вони пов'язані з індукцією апоптозу, було досліджено активність каспази 3/7 і транслокацію фосфатидилсерину на зовнішній ліпідний шар плазматичної мембрани.

9.2.4. Індукція апоптозу C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом у клітинах LLC

Каспаза 3/7 є фінальною пусковою ефекторною протеазою, яка активується в каспазозалежних шляхах апоптозу [104]. Cis-Pt за концентрації 12,5 мкМ через 4 год інкубації не впливав на активність каспази 3/7 у клітинах LLC. Незначне підвищення активності ферменту після дії цисплатину порівняно з контролем було виявлено через 8 і 24 год (Рис. 9.7а). Розщеплення каспази 3 було продемонстровано в експериментах на клітинах A549 раку легені після дії цисплатину за концентрації 25 мкМ [407].

C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс посилював активність каспази 3/7 у клітинах LLC в 2,1 рази (260±17% порівняно з цисплатином 124±11%) через 24 год інкубації. Це свідчить про те, що при комплексоутворенні цисплатину з C₆₀ фулереном апоптоз індукується за тривалих термінів інкубації.

Відомо, що оцінка транслокації залишків фосфатидилсерину на зовнішню поверхню плазматичної мембрани клітини використовується для визначення апоптозу, оскільки цілісність клітинної мембрани втрачається при ініціації апоптотичного процесу [348].

Подвійне фарбування клітин FITC-міченим анексином V як маркером екстерналізованого фосфатидилсерину та ДНК-зв'язуючим флуоресцентним барвником PI використовується для ідентифікації популяцій життєздатних (Анексин V-FITC негативні, PI негативні), з ознаками раннього апоптозу (Анексин V-FITC позитивні, PI негативні), з ознаками пізнього апоптозу (Анексин V-FITC позитивні, PI позитивні) і некротичних (Анексин V-FITC негативні, PI позитивні) клітин. Аналіз клітинних популяцій через 24 год після

інкубації клітин LLC з 12,5 мкМ Cis-Pt або C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом представлений на Рис. 9.7b,c.

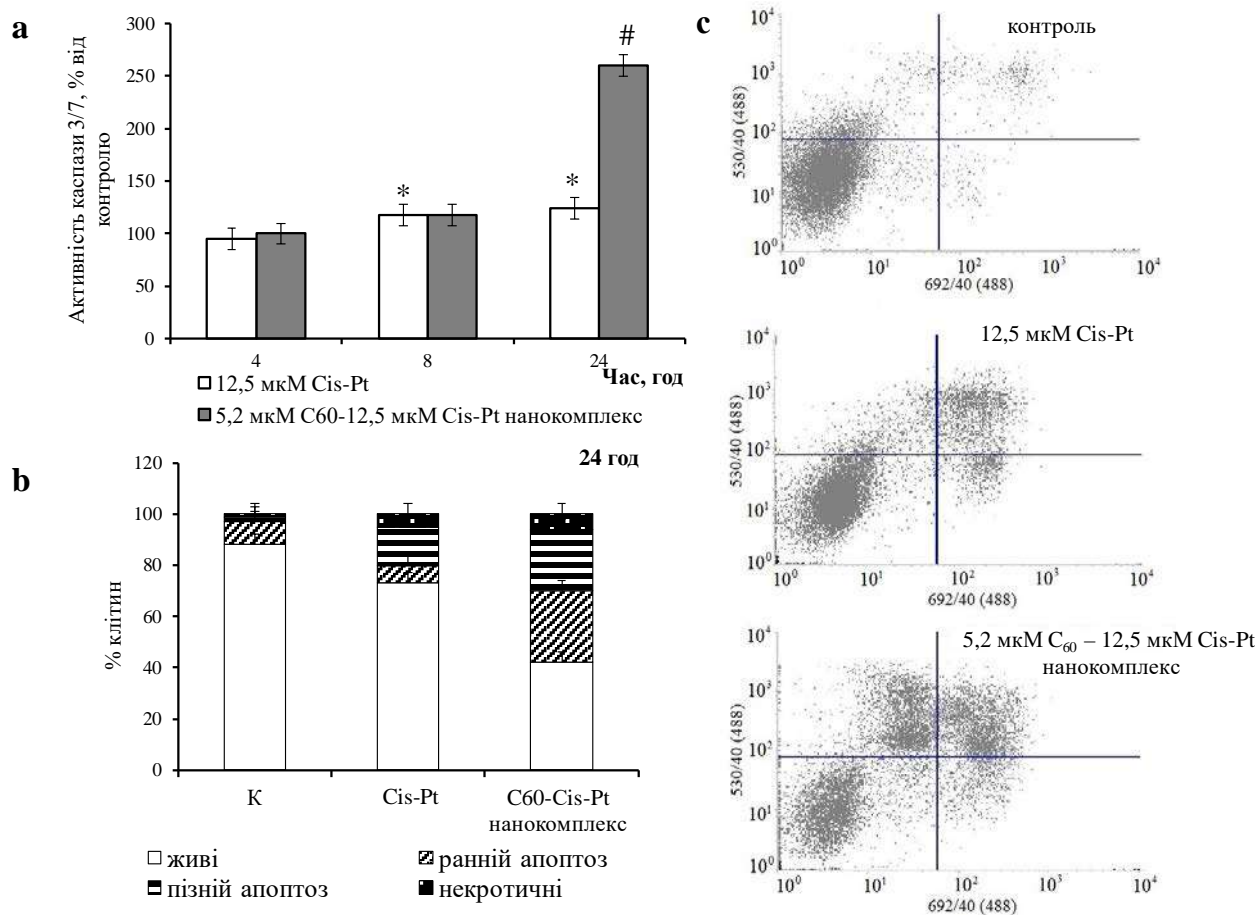


Рис. 9.7. Механізми токсичної дії цисплатину і C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу на клітини LLC. Активність каспази 3/7 у клітинах LLC (а) (M±m, n=4). *p<0,05 порівняно з контролем; #p<0,05 порівняно з дією цисплатину; Кількісний аналіз вмісту клітин LLC, диференційованих за фарбуванням Аннексином V-FITC/PI через 24 год інкубації (б); Гістограми клітин LLC пофарбованих Аннексином V-FITC/PI (у кожній панелі нижній лівий квадрат показує вміст життєздатних клітин, верхній лівий квадрат – клітини з ознаками раннього апоптозу, верхній правий квадрат - пізнього апоптозу, нижній правий квадрат - популяції некротичних клітин) (с)

Ми показали, що C₆₀ фулерен за концентрації 5,2 мкМ, еквівалентній як у складі C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу, не впливав на активність каспази 3/7 і вміст фосфатидилсерину на поверхні клітин LLC (дані не представлено).

12,5 мкМ Cis-Pt спричиняв збільшенням відсотка клітин LLC з ознаками пізнього апоптозу (15% порівняно з контролем 2%), тоді як C₆₀-Cis-Pt наноконплекс спричиняв підвищення кількості клітин з ознаками як раннього (28% порівняно з цисплатином 7%), так і пізнього (24% порівняно з цисплатином 15%) апоптозу, а також значне зниження кількості життєздатних клітин (58% порівняно з цисплатином 27%) (Рис. 9.7b,c). Ці дані підтверджують, що токсичний ефект C₆₀-Cis-Pt наноконплексу щодо клітин LLC реалізується шляхом розвитку апоптозу.

Таким чином, C₆₀-Cis-Pt наноконплекс характеризувався вищою і більш ранньою токсичною дією на клітини LLC порівняно з цисплатином. 12,5 мкМ C₆₀-Cis-Pt наноконплекс не лише знижував життєздатність клітин, але й порушував їх морфологію та адгезію, тоді як ні Cis-Pt, ні C₆₀ фулерен окремо не впливали ці показники. Наноконплекс також інгібував міграційну активність клітин LLC, порушував проходження клітинного циклу, що супроводжувалося збільшенням кількості клітин як у G2/M, так і у subG1 фазі. Виявлено, що механізмом цитотоксичної дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу є апоптоз, про що свідчили активація каспази 3/7 і транслокація фосфатидилсерину на зовнішню поверхню клітин LLC.

Отримані нами результати дозволяють зробити висновок, що ефективніша цитотоксична дія C₆₀-Cis-Pt наноконплексу на клітини LLC порівняно з окремою дією цисплатину визначається здатністю C₆₀ фулерену сприяти прискореному входженню препаратів через плазматичну мембрану та їх накопиченню всередині злоякісних клітин (Розділ 3). Як відомо, молекули Cis-Pt ефективно виводяться із злоякісно трансформованих клітин білками ABC-транспортерами, зокрема P-gp, ABCC1 (MRP1) і ABCC2 (MRP2) [102]. З використанням молекулярного докінгу ми показали, що молекули C₆₀ здатні взаємодіти з P-gp, MRP-1 і MRP-2 та індукувати їх конформаційні зміни (Розділ 6). Наступним завданням було з'ясувати чи посилиться токсична дія цисплатину за комплексації із C₆₀ фулерен на резистентні злоякісні клітини.

9.3. Токсичність C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу щодо клітин HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії людини різних за чутливістю до цитостатиків

9.3.1. Вживаність клітин HL-60 за дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу

Нами показано, що клітини промієлоцитарної лейкемії HL-60/wt дикого типу виявилися чутливими до токсичної дії цисплатину (Розділ 5), зокрема через 24 год після дії Cis-Pt за концентрації 0,5 мкМ виживаність клітин знижувалася на 40%, із збільшенням концентрації цитостатику в інкубаційному середовищі даний ефект посилювався. Тоді як резистентні клітини HL-60/vinc та HL-60/adr демонстрували стійкість до цисплатину, цитотоксична дія цисплатину спостерігалася у діапазоні концентрацій 15 мкМ і вище.

C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс через 24 год спричиняв концентраційно-залежне зниження виживаності клітин HL-60 як чутливих, так і резистентних до вінкристину та адриаміцину (Рис. 9.8).

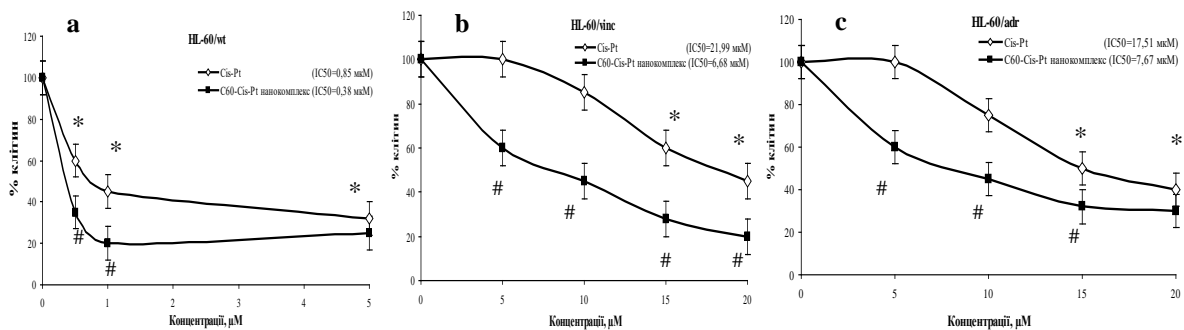


Рис. 9.8. Вживаність клітин HL-60/wt дикого типу (а) та резистентних субліній HL-60/vinc (надекспресія Р-глікопротеїну, резистентність до вінкристину) (b) і HL-60/adr (надекспресія MRP1, резистентність до адриаміцину) (c), інкубованих з цисплатином або C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом у еквівалентній концентрації цисплатину упродовж 24 год (M±m, n=6). *p<0,05 порівняно з контролем, #p<0,05 порівняно з дією цисплатину

Порівняльне дослідження токсичної дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу та вільного цисплатину за еквівалентної концентрації щодо клітин HL-60 чутливих та резистентних ліній виявило ряд особливостей. По-перше, наноконкомплекс був більш токсичним, про що свідчили значення IC₅₀ для

наноконплексу щодо клітин HL-60/wt ($IC_{50}=0,38$ мкМ), HL-60/vinc ($IC_{50}=6,68$ мкМ) та HL-60/adr ($IC_{50}=7,68$ мкМ), які були нижчими у 2,2, 3,3 та 2,3 рази відповідно порівняно з дією вільного цисплатину у еквівалентній концентрації. По-друге, токсична дія цисплатину виявлялася та посилювалася при комплексації з C_{60} фулереном, зокрема цисплатин окремо за концентрації 5 та 10 мкМ не впливав на виживаність резистентних клітин лейкемії, тоді як у складі наноконплексу за еквівалентної концентрації чутливість клітин до дії цитостатика зросла майже удвічі. Так, через 24 год після дії наноконплексу за концентрації 5 і 10 мкМ виживаність клітин HL-60/vinc знижувалася з 100 до 60% та з 85 до 45% відповідно, клітин HL-60/adr з 100 до 60% та з 75 до 45 % відповідно порівняно з вільним цисплатином (Рис. 9.8b,c).

Відомо, що ефективність протипухлинної терапії з використанням цитостатиків, зокрема цисплатину, є обмеженою у зв'язку з розвитком стійкості злякисних клітин до дії хіміопрепарату [327, 502]. ABC-транспортери функціонують не лише як мембранні помпи, але й попереджають у клітинах розвиток апоптозу після дії протипухлинних препаратів [422]. Розробка нових систем доставки лікарських препаратів, здатних підвищити їх протипухлинну активність, знизити їх терапевтичну концентрацію та побічну дію, а також підвищити чутливість резистентних клітин має велике значення у онкотерапії.

Клітини HL-60 промієлоцитарної лейкемії резистентних субліній з надекспресією білків-транспортерів були стійкими до токсичної дії цисплатину за концентрації 5 та 10 мкМ, тоді як при комплексації цитостатика з C_{60} фулереном резистентність досліджуваних клітин знижувалася.

Існують літературні дані про посилення похідними фулеренів токсичної дії цисплатину щодо злякисних клітин резистентних ліній. Так, наночастинки $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ спричиняли токсичний ефект цисплатину за низької концентрації 3,3 мкМ щодо резистентних клітин до цисплатину раку передміхурової залози людини лінії CP-r PC-3-luc, який супроводжувався зниженням виживаності клітин на 30% порівняно з окремою дією цисплатину [514]. Окрім того, карбонові наночастинки у попередньо оброблених трансферином (маркер ендцитозу) клітин CP-r PC-3 посилювали

внутрішньоклітинне накопичення цисплатину і формування платинових-ДНК адуктів. Автори, припускають, що виявлений ефект відбувався внаслідок реактивації фулереном дефектного ендоцитозу цитостатика.

C₆₀ фулерен, не зважаючи на підвищену активність АВС-транспортерів у резистентних клітинах, проникав та накопичувався у внутрішньоклітинному просторі пухлинних клітин. Так, немодифікований C₆₀ фулерен не розпізнавався Р-глікопротеїнами та з однаковою ефективністю накопичувався як чутливими K562S, так і резистентними K562R клітинами лейкемії [514].

Відновлений ендоцитоз карбоновими наночастинками може бути залучений у подолання набутої резистентності у пухлинних клітин шляхом посиленого поглинання цисплатину. Так, металопохідні фулеренів посилювали чутливість до цисплатину у резистентних клітин карциноми шийки матки лінії KB-3-1 та клітин гепатоми лінії BEL7404 людини, оскільки внутрішньоклітинне накопичення цисплатину є зниженим у резистентних клітин через плейотропний дефект, інші механізми, такі як зниження плинності плазматичної мембрани або зміненого цитоскелету, також можуть сприяти наночастинкам змінювати стійкість до цисплатину *in vitro* та *in vivo* [210, 296].

Згідно літературних даних та отриманих нами результатів дослідження *in vitro* та *in silico* молекули C₆₀ взаємодіють із білками АВС-транспортерами плазматичних мембран, які виводять протипухлинні препарати з клітини, а саме Р-глікопротеїном, MRP-1 і MRP-2 та можуть бути залученні до механізмів подолання стійкості до ліків у пухлинних клітин.

Отже, C₆₀-CisPt наноконкомплекс володіє здатністю до посилення чутливості клітин лейкемії резистентних до вінкрестину HL-60/vinc та адриаміцину HL-60/adr, з надекспресією білків Р-глікопротеїну та MRP1 відповідно. Окрім того, діапазон діючої концентрації C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу виявився нижчим порівняно з вільним цисплатином, що може свідчити про високу ефективність протипухлинної дії наноконкомплексу та низьку токсичність цитостатика у складі наноконкомплексу щодо резистентних клітин лейкемії.

З метою вивчення механізмів цитотоксичної дії та модуляції протипухлинної активності C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу у резистентних до

адриаміцину клітин HL-60/adr було оцінено його вплив на розподіл за фазами клітинного циклу та транслокацію фосфатидилсерину на зовнішній ліпідний шар плазматичної мембрани.

9.3.2. Розподіл клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу за дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу

Об'єктом дослідження механізмів цитотоксичної дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу було обрано резистентні клітини промієлоцитарної лейкемії лінії HL-60/adr до адриаміцину. Індукцію апоптозу у клітинах HL-60/adr досліджували після дії 10 мкМ C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу за еквівалентної концентрації цисплатину. За цієї концентрації наноконкомплекс спричиняв зниження виживаності клітин HL-60/adr на 55%, тоді як цисплатин - лише на 25% порівняно з контролем.

Аналіз розподілу клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу, який оцінювали за допомогою протокової цитофлуориметрії та пропідій йодиду, показав, що через 24 год інкубації більшість необроблених (контрольних) клітин (52±5%) знаходилися в G₀/G₁ фазі (Рис. 9.9), що є характерним для злоякісного росту. Раніше ми показали переважне накопичення клітин лейкемії чутливих L1210 і резистентних L1210/Cis-Pt до цисплатину у G₀/G₁ фазі [177, 390]. Подібну акумуляцію у різних за чутливістю до цисплатину клітин у G₀/G₁ фазі показано на клітинах раку яєчників лінії SKOV3 [521], а також клітин LLC [394].

C₆₀ фулерен за концентрації 5 мкМ не впливав на розподіл клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу (Рис. 9.9), спостерігалось незначне зростання вмісту клітин у S фазі (з 24 до 30%). Як показано нами раніше, C₆₀ фулерен за концентрації 5,2 мкМ не впливав на проходження циклу клітин LLC карциноми легені [394], клітин L1210 лейкемії [177] та клітин MCF-7 карциноми молочної залози [7], однак спричиняв збільшення кількості у SubG₁ фазі клітин лейкемії K562 (з 3,8±1,3 % до 11±3,89 %) [240] та резистентних до цисплатину L1210/Cis-Pt (з 2,7±1,5 % до 8,7±3,5 %) [177].

Після дії цисплатину за концентрації 10 мкМ збільшувалася кількість клітин у S (30% відносно контролю 24%) та G2/M фазах (20% відносно контролю 16%) на фоні зниження у G0/G1 фазі (40% відносно контролю 52%) (Рис. 9.9).

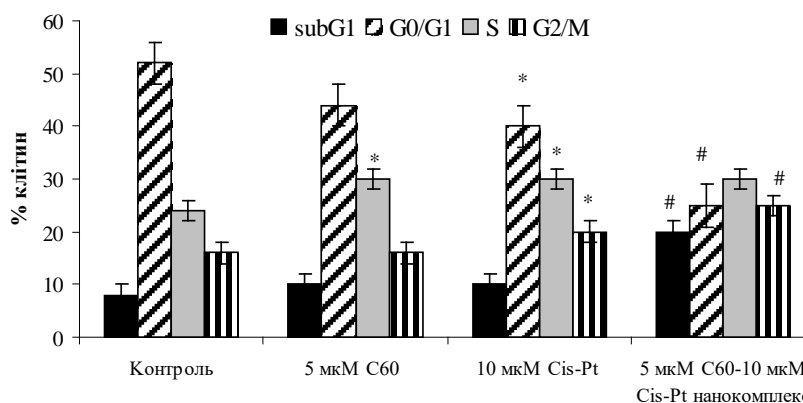


Рис. 9.9. Розподіл клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу через 24 год після інкубації з C₆₀ фулереном, або Cis-Pt, або C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом (M±m, n=5). *p<0,05 порівняно з контролем (клітини без добавок); #p<0,05 порівняно з дією цисплатину

Накопичення клітин у G2/M фазі є характерним проявом дії протипухлинних препаратів, що у подальшому супроводжується загибеллю клітин шляхом апоптозу [70, 283, 476].

Оскільки клітини HL-60/adr є резистентними до дії цисплатину, про що свідчило незначне зниження виживаності клітин (лише на 25%) тому і невиявлено значного впливу цитостатика на розподіл клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу.

C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс, за еквівалентної концентрації цисплатину 10 мкМ, впливав на проходження клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу, зокрема через 24 год зростала кількість клітин у subG1 та G2/M фазах, при одночасному зниженні кількості клітин у G1/G0 фазі. Виявлений ефект наноконкомплексу був більш виразним порівняно з окремою дією цисплатину.

Зростання кількості клітин у SubG1 фазі свідчить про порушення балансу між процесами проліферації клітин та їх загибелю [216], що

узгоджується із даними щодо зниження виживаності резистентних клітин HL-60/adr за дії 10 мкМ наноконплексу.

Отже, при комплексації цисплатину з C₆₀ фулереном токсичний ефект цитостатика щодо резистентних лейкозних клітин посилювався, тоді як за окремої дії цисплатин не виявляв цитотоксичної активності.

Оскільки накопичення клітин у SubG1 фазі клітинного циклу корелюється з фрагментацією ДНК та активацією апоптозу [499], ми припускаємо, що зниження виживаності резистентних клітин лейкемії після дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу є наслідком активації клітинної загибелі саме за механізмом апоптозу.

Виявлені зміни у клітинному циклі свідчать про значний внесок C₆₀-Cis-Pt наноконплексу в активацію сигнальних шляхів апоптичної загибелі лейкозних клітин. Щоб з'ясувати можливі механізми такої активації, розвиток апоптичних процесів оцінювали за екстерналізацією фосфатидилсерину у плазматичній мембрані.

9.3.3. Індукція апоптозу C₆₀-Cis-Pt наноконплексом у клітинах HL-60/adr

Детекцію кількості апоптичних/некротичних клітин HL-60/adr за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу оцінювали з використанням комбінованого фарбування FITC-міченим анексином V та пропідій йодидом і протокової цитофлуориметрії. Результати дослідження популяції клітин лейкемії резистентної сублінії до адриаміцину через 24 год після інкубації з C₆₀ фулереном, або цисплатином, або C₆₀-Cis-Pt наноконплексом представлено на Рис. 9.10. Переважна більшість клітин HL-60/adr у популяції через 24 год після інкубації із досліджуваними сполуками були життєздатними (Анексин V-FITC негативні, PI негативні) (Рис. 9.10).

C₆₀ фулерен за концентрації 5 мкМ, еквівалентній як у складі C₆₀-Cis-Pt наноконплексу, не спричиняв загибелі клітин HL-60/adr та змін у їх популяції (Рис. 9.10). За дії 10 мкМ цисплатину незначно зростав відсоток клітин HL-60/adr з ознаками раннього апоптозу (Анексин V-FITC позитивні, PI негативні)

(Рис. 9.10), тоді як C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс спричиняв підвищення вмісту клітин з ознаками пізнього апоптозу (16% порівняно з цисплатином 10%) на фоні незначного зниження вмісту життєздатних клітин (76% порівняно з цисплатином 82%) (Рис. 9.10). Отримані дані узгоджуються із цитотоксичною дією C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу щодо резистентних клітин лейкемії, яка реалізується шляхом апоптозу.

Як відомо, одним з механізмів протипухлинної активності цисплатину є апоптоз [172, 366]. Так, автори [491] показали, що цисплатин за низьких концентрацій (1-3 мкМ) часо- та дозозалежно індукував апоптоз у клітин промієлоцитарної лейкемії лінії HL-60, який відрізняється від механізму загибелі клітин резистентних субліній [242]. Тому з метою посилення протипухлинної дії цисплатину широко використання набули біологічно активні сполуки, наприклад, шіконін [218] або олідонін [312] тощо. Нами показано, що при комплексації цисплатину із C_{60} фулереном відбувається підвищення його цитотоксичної активності щодо резистентних клітин лейкемії, що супроводжувалося зростанням вмісту клітин HL-60/adr у subG1 і G2/M фазах клітинного циклу, транслокацією фосфатидилсерину на зовнішню поверхню плазматичної мембрани та загибеллю клітин шляхом апоптозу.

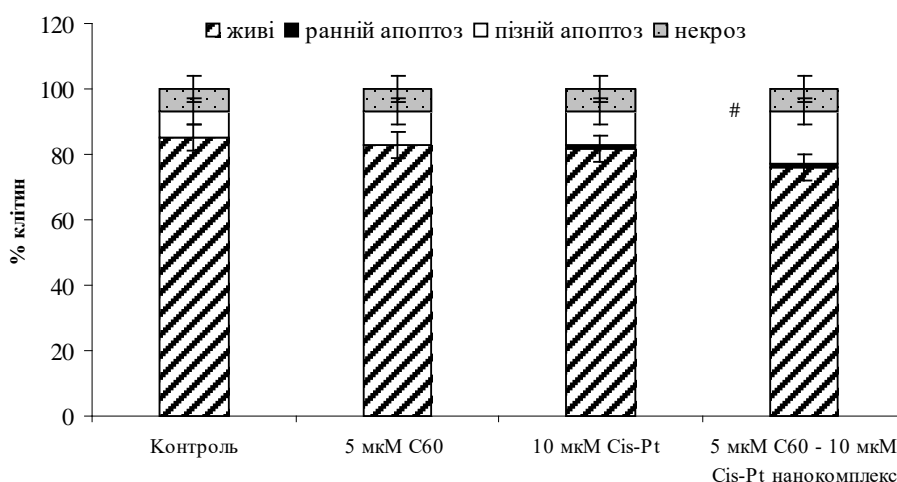


Рис. 9.10. Кількісний аналіз вмісту клітин HL-60/adr, пофарбованих анексином V-FITC/PI, через 24 год після інкубації з C_{60} фулереном, або Cis-Pt, або C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексом ($M \pm m$, $n=4$). # $p < 0,05$ порівняно з дією цисплатину

Отримані результати є доказом того, що C_{60} фулерен здатний модифікувати фенотип медикаментозної резистентності у злоякісних клітин, впливати на механізми проникнення та утримання цисплатину всередині клітини, блокуючи роботу АВС-транспортерів.

Наступним етапом роботи було дослідити вплив C_{60} -Cis-Pt наноконплексу на злоякісні клітини іншого походження, зокрема карциноми шийки матки людини.

9.4. Токсичність C_{60} -Cis-Pt наноконплексу щодо клітин карциноми шийки матки людини

9.4.1. Проникнення C_{60} -Cis-Pt наноконплексу у клітини HeLa

Ми (Розділ 3) та інші автори [81, 288, 291, 411, 413, 514] показали, що молекула C_{60} проникає крізь плазматичні мембрани та локалізується всередині злоякісних клітин. Оскільки C_{60} -Cis-Pt наноконплекс має більший розмір (1,1 нм), порівняно з молекулою C_{60} (0,72 нм) та виявляє токсичну активність щодо злоякісних клітин, знижує стійкість клітин лейкемії до хіміопрепаратів, не виключено, що посилення протипухлинної дії цитостатика відбувається за рахунок накопичення та утримання наноконплексу всередині клітин, тому було досліджено проникнення C_{60} -Cis-Pt наноконплексу у клітини карциноми шийки матки людини лінії HeLa.

Поглинання C_{60} -Cis-Pt наноконплексу (20 мкМ за цисплатином) клітинами HeLa оцінювали через 1 та 3 год інкубації з використанням флуоресцентної мікроскопії. Накопичення C_{60} -Cis-Pt наноконплексу у клітинах HeLa візуалізували за флуоресценцією синього кольору при $\lambda_{ex}=360$ нм та $\lambda_{em}=460$ нм (Рис. 11.11).

Через 1 та 3 год після інкубації з C_{60} -Cis-Pt наноконплексом забарвленими виявилися усі клітини HeLa, при цьому спостерігається інтенсивна внутрішньоклітинна флуоресценція (Рис. 9.11 B,D). Синій колір флуоресценції вказує про накопичення наноконплексу у клітинах HeLa. Дані про внутрішньоклітинну локалізацію кон'югатів фулерену узгоджуються з літературними. Так, автори [228] з використанням флуоресцентної мікроскопії

(при $\lambda_{\text{ex}}=380$ нм та $\lambda_{\text{em}}=458$ нм) показали швидке (через 2 год) проникнення кон'югатів C_{60} фулерену з α -фенілаланіном, α -аргініном та фолієвою кислотою крізь мембрани клітин раку шийки матки HeLa та тривале (упродовж 24 год) утримання їх всередині клітин.

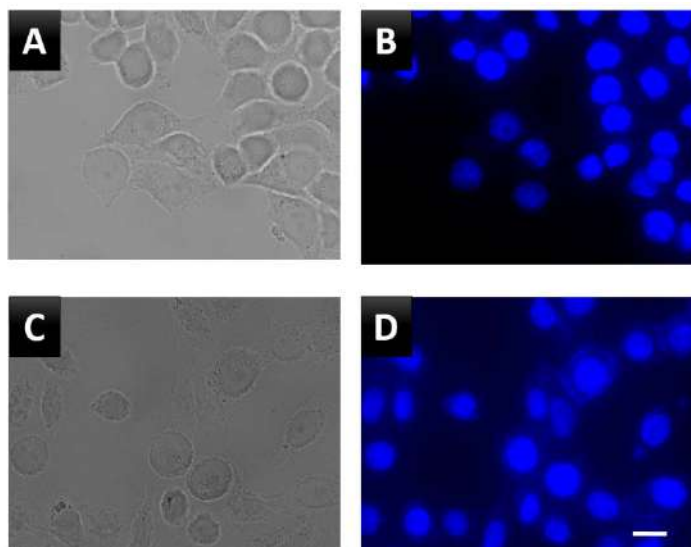


Рис. 9.11. Мікрофотографії клітин HeLa через 1 год (верхній рядок - А, В) і 3 год (нижній рядок - С, D) після інкубації з C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексом. Фазово-контрастна (А, С) та флуоресцентна (В, D) мікроскопії. Масштаб зображень 5 мкм

Аналіз зображень демонструє характерні морфологічні зміни клітин HeLa – утворення великої кількості пухирців на поверхні та всередині клітин, зморщення клітин та зміна їх форми (Рис. 9.11), що свідчить про цитотоксичну дію C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу за досліджуваної концентрації.

Автори [355] показали, що фулеренол у комбінації з цисплатиною знижував проліферативну активність клітин HeLa та спричиняв морфологічні зміни клітин – зменшення розміру, округлість, зморщення мембрани, конденсація хроматину, що є ознаками апоптозу [301] та узгоджується з нашими даними.

Виявлене нами раннє проникнення та швидке накопичення у клітинах HeLa C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу узгоджуються із літературними даними. Так, через 1 год інкубації кон'югат C_{60} -доксорубіцин розподілявся всередині MCF-7 клітин переважно в цитоплазмі, у ендосомах та лізосомах, а також

спостерігалася його слабка флуоресценція в ядрі [302], припускалося, що досліджуваний кон'югат C_{60} -доксорубіцин проникав всередину клітин шляхом ендоцитозу. Зафіксовано внутрішньолізосомальну локалізацію FITC-міченого кон'югату фулеренол-доксорубіцину у клітинах меланоми В16 і раку молочної залози MDA-MB-231 [117] та внутрішньоклітинну локалізацію міченого 6-амінофлуорисцеїном наноносія фулерен-паклітакселя через 18 год у ліпідних ділянках мембран клітин А431 епідермоїдної карциноми людини, а фулерену з 1,1'-діок-тадецил-3,3,3',3'-тетраметиліндокарбоціанін перхлоратом (Dil) у цитоплазмі макрофагів мишей, проникнення всередину клітин відбувалося шляхом ендоцитозу [375]. Виявлена нами внутрішньоклітинна локалізація та цитотоксичність C_{60} -Cis-Pt наноконструкції щодо клітин карциноми шийки матки людини лінії HeLa може вказувати на позаядерні механізми та індукцію апоптозу.

Отже, C_{60} фулерен посилює проникнення цисплатину в злоякісні клітини, припускається, що C_{60} -Cis-Pt наноконструкція проникає у клітини без механічного пошкодження мембран або шляхом пасивної дифузії, або шляхом ендоцитозу.

Таким чином, C_{60} -Cis-Pt наноконструкція проникає і утримується всередині клітин HeLa, а також викликає їх деструктивні зміни, що може призводити до їх загибелі, тому далі було досліджено його вплив на виживаність клітин карциноми шийки матки.

9.4.2. Виживаність клітин HeLa та KB-3-1 за дії C_{60} -Cis-Pt наноконструкції

Цитотоксичність C_{60} -Cis-Pt наноконструкції щодо клітин карциноми шийки матки людини ліній HeLa та KB-3-1 вивчали у порівнянні з окремою дією цисплатину. Цисплатин через 24 год дозозалежно впливав на виживаність клітин HeLa та KB-3-1, чутливість клітин досліджуваний ліній до цитотоксичної дії цитостатика була однаковою, про що також свідчили значення показників IC_{50} , які становили 18,6 та 16 мкМ відповідно (Рис. 9.12).

C_{60} фулерен за еквівалентної концентрації як у складі наноконструкції (2,5-7,5 мкМ) (дані не наведено), так і вищому діапазоні концентрацій (10-20

мкМ) не впливав на виживаність (Розділ 4, табл. 4.3) клітин ліній HeLa та KB-3-1, що узгоджується з літературними даними [524] згідно яких ди- та трималонатні водорозчинні похідні C₆₀ фулерену у діапазоні концентрацій 2-64 мкМ не спричиняють цитотоксичних ефектів щодо клітин HeLa.

C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс дозозалежно знижував життєздатність клітин карциноми шийки матки, цитотоксична дія якого була ефективнішою порівняно з окремою дією цисплатину за еквівалентних концентрацій (Рис. 9.12). Так, виживаність клітин HeLa та KB-3-1 через 24 год після дії наноконкомплексу у досліджуваному діапазоні концентрацій 5-15 мкМ за еквівалентної концентрації цисплатину знижувалася (в середньому на 20%) порівняно з окремою дією цитостатику. Про посилення цитотоксичної дії цисплатину щодо клітин досліджуваних ліній при комплексації із C₆₀ фулереном свідчили отримані значення показників IC₅₀, які для C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу щодо клітин HeLa та KB-3-1 були удвічі нижчими, ніж для вільного цисплатину (Рис. 9.12 А,В). Слід відмітити, що цисплатин за концентрації 5 мкМ не впливав на виживаність клітин HeLa, тоді як при комплексації з C₆₀ фулереном даний показник становив 42% та був на 22% нижчим порівняно з окремою дією цисплатину (Рис. 9.12 А).

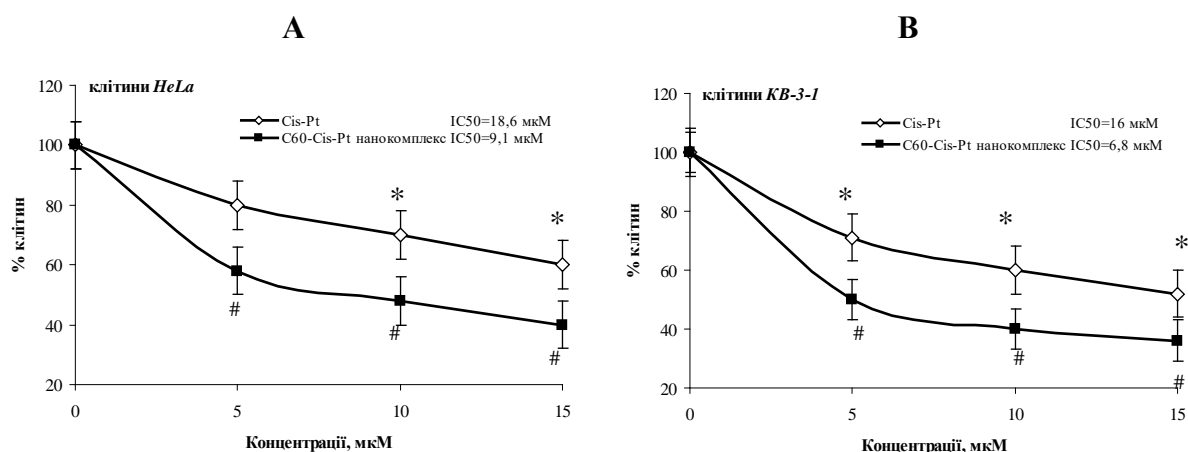


Рис. 9.12. Виживаність клітин карциноми шийки матки лінії HeLa (А) та KB-3-1 (В), інкубованих з цисплатином або C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом у еквівалентній концентрації цисплатину упродовж 24 год (M±m, n=6). *p<0.05 порівняно з контролем, #p<0,05 порівняно з дією цисплатину

Авторами [355] також показано посилення токсичної дії цисплатину фулереном щодо клітин HeLa, яке через 24, 48 та 72 год супроводжувалося морфологічними змінами клітин та пригніченням їх проліферативної активності, що узгоджується з нашими даними.

Отже, C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс виявляє цитотоксичну активність щодо клітин HeLa та KB-3-1, яка є вищою порівняно з окремою дією цисплатину. З метою підтвердження цитотоксичної активності C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу щодо клітин карциноми шийки матки та визначення механізму його пошкоджуючої дії було вивчено структурний стан хроматину зазначених клітин.

9.4.3. Стан структури хроматину клітин KB-3-1 за дії наноконкомплексу C₆₀-Cis-Pt

Як відомо, гіперконденсація хроматину та розпад ядра на окремі фрагменти є однією з типових ознак апоптозу [6]. Морфологічні зміни в ядрі клітин KB-3-1 карциноми шийки матки людини спричинені дією C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу вивчали за допомогою флуоресцентного барвника DAPI.

Внаслідок змін проникності плазматичної мембрани апоптичні клітини накопичують барвники значно швидше, ніж інтактні. Тому останні, зазвичай, мають слабку флуоресценцію в ядрі, тоді як апоптичні характеризуються яскравим світінням конденсованого хроматину і фрагментацією ядра [543].

2,5 мкМ C₆₀ фулерен за еквівалентної концентрації як у складі C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу не впливав на структуру хроматину клітин KB-3-1 (Рис. 9.13с), що угоджується з відсутністю його цитотоксичного впливу.

Цисплатин за концентрації 5 мкМ (Рис. 9.13 b) та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс за еквівалентної концентрації цисплатину (Рис. 9.13 d) через 24 год інкубації спричиняли структурні зміни хроматину у клітин KB-3-1. На мікрофотографіях (Рис. 9.13 b,d) спостерігаються клітини округлої форми із зморщуванням цитоплазми, вип'ячуванням мембрани, втратою нормальної архітекtonіки ядра, неоднорідністю його структури та гіперконденсованими ділянками, що вказує на апоптичну загибель клітин. Після дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу у клітин KB-3-1 спостерігалися більш виражені апоптичні зміни.

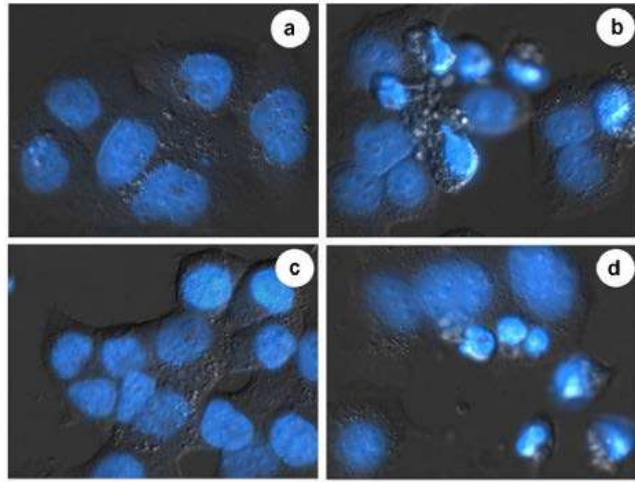


Рис. 9.13. Структурний стан хроматину клітин KB-3-1 через 24 год після інкубації без добавок - контроль (a), за присутності 5 мкМ Cis-Pt (b), 2,5 мкМ C₆₀ фулерену (c), 5 мкМ C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс (d). Флуоресцентна мікроскопія з використанням барвника DAPI

C₆₀ фулерен посилював токсичну дію цисплатину та доксорубіцину щодо клітин HeLa та MCF-7, про що свідчило зниження виживаності клітин та зростання клітин у SubG1 фазі порівняно з дією препаратів окремо [535], з використанням інгібітора z-VAD-FMK через 24 год виявлено каспазо-залежний механізм загибелі вище згаданих ліній клітин.

Отже, цисплатин та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс у клітинах KB-3-1 спричиняли структурні зміни, характерними ознаками були конденсація хроматину та фрагментація ядра. За дії наноконкомплексу апоптотичні зміни були більш виразними. C₆₀ фулерен не впливав на морфологію ядра.

Таким чином, C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс проникає у клітини карциноми шийки матки людини, знижує їх виживаність та спричиняє зміни у структурі ядерного хроматину, що свідчить про апоптотичний механізм загибелі клітин за дії наноконкомплексу. Завдяки комплексоутворенню цисплатину із C₆₀ фулереном цитотоксична дія цисплатину посилювалася.

Згідно отриманих нами результатів C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс посилював чутливість злоякісних клітин як чутливих, так резистентних ліній до дії цитостатика, окрім того діапазон діючих концентрацій C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу є нижчим порівняно з окремою дією цисплатину, що свідчить

про високу ефективність протипухлинної дії C_{60} -Cis-Pt наноконплексу *in vitro* та низьку токсичність цитостатика у його складі.

Наші результати дозволяють зробити висновок, що потужніший цитотоксичний ефект C_{60} -Cis-Pt наноконплексу у порівнянні з вільним цисплатином за еквівалентної концентрації визначається здатністю C_{60} фулерену сприяти входженню через плазматичну мембрану та накопиченню препарату в злоякісних клітинах [179, 198, 401].

Відомо, що основним механізмом входу Cis-Pt у клітини є пасивна дифузія [115], тоді як C_{60} фулерен здатен проникати всередину клітини різними шляхами - пасивним транспортом через канали або пори [405], активним транспортом клатрин-залежним [174, 291], або кавеол-опосередкованим [295, Russ 424] ендцитозом і фагоцитозом [81]. Ми припускаємо, що C_{60} фулерен при комплексації з Cis-Pt полегшує входження препарату у пухлинні клітини.

Cis-Pt ефективно виводиться із злоякісно трансформованих клітин білками ABC-транспортерами: P-gp, ABCC1 (MRP1) і ABCC2 (MRP2) [102, 321]. Останні експериментальні результати показали, що P-глікопротеїн не розпізнається C_{60} фулереном [514], тоді як дослідження молекулярного докінгу показали, що молекули C_{60} взаємодіють з MRP-1 і MRP-2 і пригнічують активність цих транспортерів [397].

Ми припускаємо, що посилення C_{60} фулереном цитотоксичної дії Cis-Pt у складі наноконплексу щодо злоякісних клітин визначається синергічною дією обох сполук. C_{60} фулерен сприяв проникненню і внутрішньоклітинному накопиченню Cis-Pt, що супроводжувалося ефективною дією цитостатика як на рівні цитоплазми, так і на рівні ядра.

Висновки до РОЗДІЛУ 9:

1. C_{60} -Cis-Pt наноконплекс у діапазоні концентрацій 5-40 мкМ через 24 год інкубації не спричиняв токсичної дії на клітини НЕК294.

2. Цисплатин та C_{60} -Cis-Pt наноконплекс часо- та додозалежно впливали на життєздатність клітин LLC. C_{60} -Cis-Pt наноконплекс був більш токсичним щодо клітин LLC порівняно з окремою дією цисплатину. Так, показник IC_{50} для

наноконплексу через 24 год становив 17 мкМ, 48 год - 10,3 мкМ та 72 год - 5,1 мкМ для клітин LLC та був нижчим в 3,5, 3,3 та 4,5 рази порівняно з вільним цисплатином у еквівалентній концентрації. Окрім того, 12,5 мкМ Cis-Pt через 24 год не впливав на життєздатність і морфологію клітин LLC, тоді як C₆₀-Cis-Pt наноконплекс в еквівалентній концентрації цисплатину суттєво знижував життєздатність клітин, порушував їх форму і адгезію, пригнічував міграційну активність і індукував накопичення клітин в проапоптотичній subG1 фазі. Індукцію апоптозу C₆₀-Cis-Pt наноконплексом було підтверджено активацією каспази 3/7 і екстерналізацією фосфатидилсерину на зовнішню поверхню клітин LLC, пофарбованих анексином V-FITC/PI.

3. Токсична дія C₆₀-Cis-Pt наноконплексу щодо клітин лейкемії HL-60 як чутливих, так і резистентних до вінкрістину та адриаміцину була концентраційно-залежною та ефективнішою порівняно з окремою дією цисплатину. C₆₀-Cis-Pt наноконплекс відновлював чутливість резистентних клітин HL-60/adr і HL-60/vinc до дії цисплатину у низьких концентрації та посилював їх чутливість за високих концентрацій цисплатину. Показник IC₅₀ для C₆₀-Cis-Pt наноконплексу через 24 год для клітин HL-60/wt (IC₅₀=0,38 мкМ), HL-60/vinc (IC₅₀=6,68 мкМ) та HL-60/adr (IC₅₀=7,68 мкМ) був нижчим у 2,2, 3,3 та 2,3 рази відповідно порівняно з окремою дією цисплатину. C₆₀-Cis-Pt наноконплекс за еквівалентної концентрації цисплатину 10 мкМ через 24 год впливав на розподіл клітин HL-60/adr за фазами клітинного циклу та посилював накопичення клітин у subG1 та G2/M фазах, а також підвищував вміст пофарбованих анексином V-FITC/PI клітин з ознаками пізнього апоптозу, що свідчить про індукцію апоптозу у резистентних клітинах лейкемії.

4. Виявлено раннє проникнення та швидке накопичення (через 1-3 год) C₆₀-Cis-Pt наноконплексу у клітинах HeLa карциноми шийки матки, що супроводжувалося зниженням їх життєздатності та морфологічними змінами. Цитотоксичність цисплатину щодо клітин карциноми шийки матки ліній HeLa та KB-3-1 при комплексації із C₆₀ фулереном посилювалася. Показник IC₅₀ для C₆₀-Cis-Pt наноконплексу через 24 год для клітин HeLa (9,1 мкМ) та KB-3-1 (9,1 мкМ) був удвічі нижчим, ніж для вільного цисплатину. Про апоптичний

механізм загибелі клітин KB-3-1 спричинений наноккомплексом свідчили структурні зміни хроматину у ядрі.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [111, 370, 394].

РОЗДІЛ 10

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ C₆₀-Cis-Pt НАНОКОМПЛЕКСУ У СИСТЕМІ *IN VIVO*

Необхідною умовою застосування C₆₀-Cis-Pt наноконплексу у біомедичних цілях є вивчення токсичності *in vivo*. З цією метою необхідно було дослідити гостру токсичність C₆₀-Cis-Pt наноконплексу та його складових окремо, а саме C₆₀ фулерену та цисплатину та визначити напівлетальну дозу (LD₅₀) кожної сполуки.

Як відомо, токсичність сполуки, її біорозподіл та накопичення всередині організму залежить від способів введення. Внутрішньочеревне введення сполук використовується для швидкої та ефективної оцінки генотоксичності, ембріотоксичності та мутагенних властивостей наночастинок. Окрім того, внутрішньочеревне введення препаратів має декілька переваг порівняно з іншими способами введення. Так, у черевну порожнину можна вводити препарати у вищих концентраціях, які будуть швидше накопичуватися в органах черевної порожнини, ніж після внутрішньовенного введення, а також препарати не піддаються дії ферментів і соків органів ШКТ, як після ентерального введення [306].

Гостру токсичність сполук досліджували упродовж 14 днів після їх разового внутрішньочеревного введення мишам інбредної лінії чоловічої статі [131, 445].

10.1. Дослідження гострої токсичності C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконплексу

10.1.1. Визначення показника LD₅₀, гематотоксичності та впливу на морфологічний стан органів C₆₀ фулерену

Токсичність C₆₀ фулерену визначали у діапазоні зростаючих доз (75, 150, 300, 600, 1200, 1800 мг/кг) базуючись на літературних даних щодо токсичності

похідних фулеренів [155, 191, 343]. Було оцінено такі показники як поведінка та виживаність тварин, споживання ними їжі та води, маса тіла тварин і органів, гематологічний аналіз, макроскопічні та гістологічні дослідження органів.

За експериментальними тваринами спостерігали щоденно, а у перший день через одну, три, шість та дванадцять годин після введення сполук.

Виживаність мишей та визначення показника LD_{50} для C_{60} фулерену. Поведінкові реакції та зовнішній вигляд тварин за умови внутрішньочеревного введення C_{60} фулерену за низьких доз (75 і 150 мг/кг) не змінювалися. За середніх доз (300 і 600 мг/кг) незначно підвищувалася активність тварин, тоді як за високих доз (1200 і 1800 мг/кг) дихання прискорювалося, активність тварин знижувалася та спостерігалися м'язеві судоми і тремор. Канібалізму упродовж експерименту не відбувалося. Миші вільно рухалися, за потребою споживали воду та їжу.

C_{60} фулерен за внутрішньочеревного введення за доз 75 та 150 мг/кг упродовж експерименту не спричиняв загибелі мишей, тоді як за доз 300 та 600 мг/кг загинула 1 (16,7%) та 2 тварини (33,3 %) відповідно (Табл. 10.1).

Таблиця 10.1

Виживаність мишей на 14 день після внутрішньочеревного введення C_{60} фулерену за різних доз ($M \pm m$, $n=6$)

Дози (мг/кг)	Lg C	% загиблих тварин	*відкорегований %	Пробіт
75	1,9	0	4,2	2,2
150	2,2	0	4,2	2,7
300	2,5	16,7	16,7	3,7
600	2,8	33,3	33,3	4,7
1200	3,1	66,7	66,7	5,6
1800	3,3	100,0	95,8	6,6

Після дії 1200 мг/кг C_{60} фулерену на 14 день експерименту залишилося 2 живі тварини, тоді як у дослідній групі тварин, яким вводили 1800 мг/кг C_{60} усі миші померли. Першу загибель мишей зафіксовано через 30 хв після введення C_{60} фулерену в дозі 1800 мг/кг, всі тварини цієї групи померли упродовж

першого дня експерименту. Крім того, через 2 години було зафіксовано загибель одієї миші після введення C_{60} фулерену за дози 1200 мг/кг. Загибель тварин у різних групах реєстрували до 7 дня експерименту.

Загибель мишей у групах з 0% (після введення C_{60} фулерену у дозі 75 мг/кг) і 100% (після введення C_{60} фулерену в дозі 1800 мг/кг) було скореговано за формулою [192]: $100 \times (0,25/n)$ для 0% і $100 \times (n-0,25/n)$ для 100% померлих. Відсоток загиблих тварин для всіх досліджуваних груп переводили у пробіт. Згідно отриманих значень пробіту, яке становило 5 (Табл. 10.1), в залежності від логарифмічних значень доз (LgC), напівлетальна доза (LD_{50}) для C_{60} фулерену за умови внутрішньочеревного введення мишам становила 721 мг/кг.

Як відомо, природа замісників та розчинників впливає на токсичність C_{60} фулерену. Згідно літературних даних, показник LD_{50} для фулерену коливався у широкому діапазоні концентрацій та залежав від способу модифікації поверхні молекули C_{60} . Так, значення LD_{50} за умови одноразового введення тваринам поліалкісульфонатного C_{60} фулерену ($C_{60}((CH_2)_4SO_3Na)_{4-6}$) становило 0,6 г/кг [121], оксигідроксильованого похідного фулерену $C_{60}O_5(OH)_{18}$ - 1,2 г/кг [487], а C_{60} фулерену солюбілізованого у ПВП - 7,8 г/кг [155]. А авторами [191, 343] показано, що C_{60} фулерен за внутрішньочеревного введення мишам лінії Swiss у діапазоні концентрацій 2,5-5 г/кг не спричиняв летальності тварин, а також гострої та субгострої токсичності.

Маса тіла та органів мишей після дії C_{60} . Миші, яким вводили C_{60} фулерен не відрізнялися споживанням їжі та води від контрольних тварин.

Таблиця 10.2

Маса тіла (г) мишей, яким внутрішньочеревно вводили C_{60} фулерен
($M \pm m$, $n=6$)

Групи мишей	Дні після введення		
	0	7	14
Контроль (без C_{60})	21,2±1,6	23,8±1,8	26,2±1,5
75 мг/кг C_{60}	21,0±1,2	23,8±1,7	24,8±0,9
150 мг/кг C_{60}	22,2±1,7	25,3±1,9	27,2±1,3
300 мг/кг C_{60}	22,5±2,2	26,4±1,9	27,6±2,4
600 мг/кг C_{60}	21,0±1,2	23,4±1,0	26,5±1,1
1200 мг/кг C_{60}	22,5±1,9	23,5±0,5	24,0±1,0
1800 мг/кг C_{60}	22,7±1,9	-	-

Не було виявлено помітних змін маси тіла (Таблиця 10.2) та внутрішніх органів (дані не наведено) після внутрішньочеревного введення мишам досліджуваних доз C_{60} фулерену порівняно з контрольною групою мишей.

Аналіз крові є універсальним клініко-діагностичним показником фізіологічного стану мишей як за нормальних умов, так і після внутрішньочеревного введення C_{60} фулерену.

Вплив C_{60} фулерену на показники гемограми мишей.
Морфофункціональний стан еритроцитів у мишей оцінювали через 14 днів після одноразового внутрішньочеревного введення C_{60} фулерену в діапазоні зростаючих доз 75, 150, 300, 600, 1200, 1800 мг/кг за такими показниками,

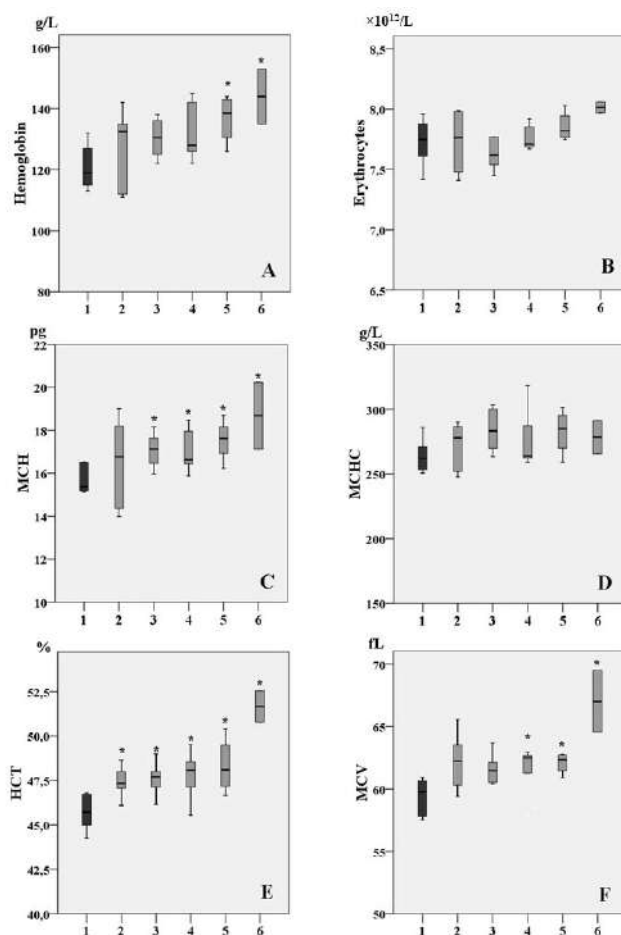


Рис. 10.1. Морфофункціональний стан еритроцитів мишей через 14 днів після разового внутрішньочеревного введення C_{60} фулерену: 1 – контроль; 2 - 75 мг/кг C_{60} ; 3 - 150 мг/кг C_{60} ; 4 - 300 мг/кг C_{60} ; 5 - 600 мг/кг C_{60} ; 6 - 1200 мг/кг C_{60} . А - концентрація гемоглобіну; В - кількість еритроцитів; С - показник МСН; D - показник МСНС; Е - НСТ; F - показник МСV. ($M \pm m$, $n=6$) * $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою мишей

як кількість еритроцитів, концентрація гемоглобіну (Hgb) в крові, гематокрит (НСТ), середній об'єм еритроциту (MCV), середня концентрація гемоглобіну (MCH) і середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC) (Рис. 10.1).

C₆₀ фулерен у досліджуваному діапазоні концентрацій не впливав на кількість еритроцитів (Рис. 10.1В). Рівень Hgb і MCHC були в межах норми (Рис. 10.1 А, D). Однак, показники еритроцитів асоційовані з середньою концентрацією гемоглобіну (MCH) і середнім об'ємом еритроциту (MCV) (Рис. 10.1 С, F), а також також кількість ретикулоцитів (Рис. 10.2А) були значно вищими в крові мишей, яким вводили розчин C₆₀ фулерену, порівняно з контрольною групою мишей. Після внутрішньочеревного введення 1200 мг/кг C₆₀ фулерену у крові мишей зростали показники НСТ, MCV і MCH на 13%, 12% і 22%, відповідно (Рис. 10.1 Е, F, С), вміст Hgb на 28% (Рис. 10.1А) та кількість ретикулоцитів на 90% (Рис. 10.2А) порівняно з контролем.

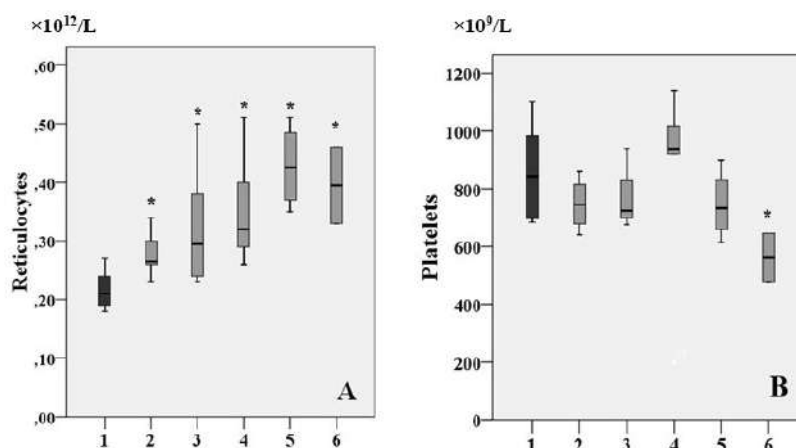


Рис. 10.2. Кількість ретикулоцитів (А) і тромбоцитів (В) у крові мишей через 14 днів після разового внутрішньочеревного введення C₆₀ фулерену: 1 – контроль; 2 - 75 мг/кг C₆₀; 3 - 150 мг/кг C₆₀; 4 - 300 мг/кг C₆₀; 5 - 600 мг/кг C₆₀; 6 - 1200 мг/кг C₆₀. (M±m, n=6) *p<0,05 порівняно з контрольною групою мишей

Таким чином, C₆₀ фулерен за високих доз впливав на морфофункціональний стан еритроцитів, про що свідчить зростання значень таких показників, як Hgb, НСТ, MCV і MCH, а також кількість ретикулоцитів у крові мишей. Збільшення кількості ретикулоцитів і середнього об'єму еритроцитів (MCV) та зростанням гематокриту, свідчить про активацію

еритропоезу в гемопоетичних органах у відповідь на високі дози C₆₀ фулерену, тоді як збільшення кількості гемоглобіну на еритроцит (МСН) свідчить про те, що C₆₀ фулерен не інгібував синтез гемоглобіну.

C₆₀ фулерен за доз 75-300 мг/кг на 14-й день після одноразового внутрішньочеревного введення не впливав на загальну кількість і склад лейкоцитів. Тоді як при підвищенні дози C₆₀ фулерену до 600 мг/кг виявлено збільшення кількості лейкоцитів у крові на 82%, лімфоцитів на 95%, моноцитів на 94%, нейтрофілів сегментноядерних на 62% і паличкоядерних на 83% (Табл. 10.3), що свідчить про розвиток запалення. Нейтрофіліоз та зміна морфології нейтрофілів, підвищений вміст паличкоядерних і сегментноядерних нейтрофілів, є характерними ознаками запальних процесів, а також деяких неопластичних захворювань гемопоетичної системи [255].

Таблиця 10.3

Лейкограма мишей на 14 день після разового внутрішньочеревного введення C₆₀ фулерену (медіана, [25 і 75 процентилі])

Групи мишей Кількість лейкоцитів, x10 ⁹ /л	Контроль, n=6	C ₆₀ фулерен, мг/кг				
		75 n=6	150 n=6	300 n=5	600 n=4	1200 n=2
Загальна кількість лейкоцитів	5,50 [4,2;6,75]	4,1 [3,37;5,08]	5,6 [4,83;7,03]	5,50 [4,05;9,35]	10,00 [5,8;13,68]	2,05 [2,03;ND]
Еозінофільні гранулоцити	0 [0;0,05]	0,02 [0;0,05]	0 [0;0,05]	0,04 [0;0,08]	0,13 [0,01;0,25]	0,01 [0; ND]
Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити	0,06 [0,03;0,16]	0,13 [0,09;0,21]	0,09 [0,04;0,14]	0,04 [0;0,26]	0,15 [0,03;0,25]	0,05 [0,02; ND]
Сегментноядерні нейтрофільні гранулоцити	1,23 [0,93;1,63]	1,07 [0,81;2,09]	1,19 [1,08;2,3]	1,96 [1,22;5,19]	1,99 [1,37;2,29]	0,46 [0,34; ND]
Лімфоцити	3,46 [2,63;4,64]	2,86 [2,23;3,68]	3,54 [3,27;4,45]	2,3 [1,55;3,91]	6,76 [3,68;9,36]	1,38 [1,24; ND]
Моноцити	0,51 [0,40;0,59]	0,34 [0,23;0,44]	0,53 [0,43;0,65]	0,30 [0,21;0,74]	0,99 [0,50;1,72]	0,16 [0,14;ND]

*p<0,05 порівняно з контрольною групою мишей (без C₆₀)

ND – не визначено (not defined)

Показано, що C₆₀ фулерен у найвищій дозі 1200 мг/кг пригнічував лейкопоез і тромбоцитопоез, знижуючи загальну кількість лейкоцитів і тромбоцитів на 63% і 34% відповідно, порівняно з контролем (Рис. 10.2 В,

Табл. 10.3). Зменшення кількості мієлокаріоцитів і мегакаріоцитів у кістковому мозку на 46% і 35%, відповідно (Рис. 10.3 А, В) було виявлено у відповідь на дію C_{60} фулерену за дози 600 мг/кг. Зменшення кількості тромбоцитів і лейкоцитів після дії 1200 мг/кг C_{60} фулерену було пов'язано зі зменшенням загальної кількості мієлокаріоцитів і мегакаріоцитів у кістковому мозку на 63% і 65% відповідно (Рис. 10.3 А, В), а також кількості всіх типів лейкоцитів, а саме нейтрофільних гранулоцитів, лімфоцитів і моноцитів на 63%, 60% і 69% відповідно, порівняно з контролем (Табл. 10.3).

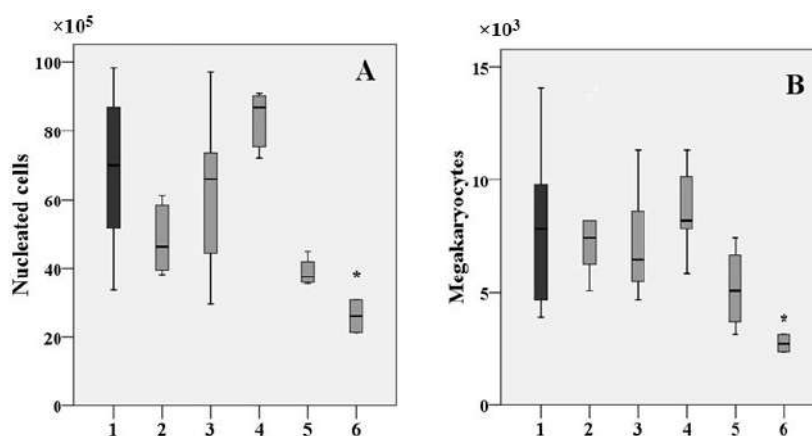


Рис. 10.3. Загальна кількість мієлокаріоцитів (А) і мегакаріоцитів (В) у кістковому мозку мишей через 14 днів після разового внутрішньочеревного введення C_{60} фулерену: 1 – контроль; 2 - 75 мг/кг C_{60} ; 3 - 150 мг/кг C_{60} ; 4 - 300 мг/кг C_{60} ; 5 - 600 мг/кг C_{60} ; 6 - 1200 мг/кг C_{60} . ($M \pm m$, $n=6$) * $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою мишей

C_{60} фулерен не виявляв гематотоксичності за умови внутрішньочеревного введення мишам за доз 75 та 150 мг/кг. Гематологічні показники змінювалися після введення C_{60} фулерену у дозі 300 мг/кг і вище. У відповідь на дію C_{60} фулерену за високих доз у кістковому мозку активувався еритропоез, незрілі еритроцити (ретикулоцити) вивільнялися в кров, пригнічувалися лейкопоез і тромбоцитопоез, а також в організмі тварин розвивався запальний процес.

Згідно літературних даних гематотоксичний ефект C_{60} фулерену виявлявся за дози 10 мг/кг після внутрішньошлункового введення щурам через 28 днів, що супроводжувалося збільшенням кількості моноцитів, еозинофілів, нейтрофілів, а також показників НСТ, MCV і MCH [453]. Після 10-денного

інгаляційного введення наночастинок C_{60} фулерену в концентрації $2,22 \text{ мг/м}^3$ значно знижувалися такі показники як кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну і гематокрит у щурів [84]. Можна припустити, що гематотоксична активність C_{60} фулерену після перорального, інгаляційного та внутрішньочеревного шляхів введення тваринам виявляється за високих доз (більше 300 мг/кг) і супроводжується змінами кількості і морфології клітин крові.

Здатність молекул C_{60} накопичуватися в організмі [244] призводить до його пролонгованої дії, що супроводжується більш значними змінами морфологічного стану еритроцитів за високих доз цієї карбонової наноструктури.

Морфологічний стан органів мишей після дії C_{60} фулерену. Макроскопічно не спостерігалось істотних аномалій в органах мишей, яким вводили низькі або середні дози C_{60} фулерену. Розмір, форма і колір органів не змінювалися, не виявлено також наростів на тканинах органів. C_{60} фулерен, який внутрішньочеревно вводили мишам в дозах 1200 і 1800 мг/кг , накопичувався у вигляді включень коричневого кольору в брижі, печінці і селезінці (дані частково представлені на Рис. 10.4), а також мозку (дані не представлено).

Раніше нами не виявлено нейротоксичної дії C_{60} фулерену *in vitro*. Так, $1,4 \text{ мкМ}$ C_{60} фулерен часозалежно посилював проліферацію астроцитів людини [334].

Згідно літературних даних відомості щодо долання гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) молекулами C_{60} є суперечливими. Одні автори припускають, що завдяки малій молекулярній масі, високій ліпофільності, гідрофобності молекули C_{60} можуть проникати через ГЕБ і шляхом ендцитозу накопичуватися у структурах мозку, що дає підставу використовувати їх при різноманітних паталогічних станах структур мозку та порушеннях ЦНС [300, 509]. Так, завдяки своїм антиоксидантним властивостям C_{60} фулерен попереджав апоптоз індуковане ушкодження нейрональних клітин *in vitro* токсинами [96, 124, 154, 297, 298].

Водночас, після введення водної суспензії C_{60} фулерену з максимальним розміром частинок 200 нм і 450 нм у гіпокамп (частина лімбічної системи головного мозку, яка відповідає за пам'ять та просторову локалізацію) щурам Wistar виявлено значне зниження рівня білка BDNF гіпокампа, а з використанням тесту Морісса - порушення просторової пам'яті у експериментальних тварин, тоді як біохімічні показники тканин мозку, а саме вміст ТБК-активних продуктів, рівень глутамат-цистеїнової лігази і глутатіону, не змінювалися та спостерігалася посилена антиоксидантна здатність, що супроводжувалася зниженням рівня АФК [270].

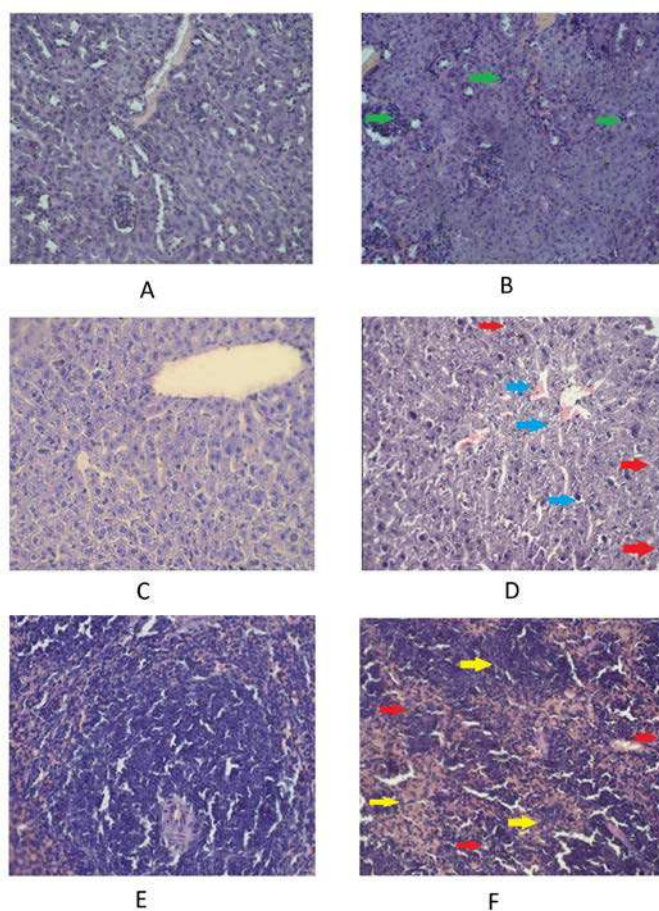


Рис. 10.4. Гістологічні зрізи нирок (А, В), печінки (С, D) і селезінки (Е, F) мишей, яким внутрішньочеревно вводили 1200 мг/кг C_{60} фулерен (В, D, F) і в контрольній групі, (А, С, Е). Запалення в нирках (В), фіброзні і дистрофічні зміни у тканині печінки (D), збільшення площі червоної пульпи і зменшення площі білої пульпи в селезінці (F). (пофарбовано гематоксилінеозином, $\times 200$). Червоними стрілочками позначено накопичення молекули C_{60}

Іншими авторами [244] не виявлено міченого похідного $^{125}\text{I-C}_{60}(\text{OH})_x$ у мозку через 3 дні після внутрішньовенного введення мишам, яке повністю через 7 днів виводилося із організму. Ці дані свідчать про те, що C_{60} фулерен не проникає через ГЕБ.

За результатами наших досліджень, C_{60} фулерен у дозі 25 мг/кг через 2 год після внутрішньочеревного введення накопичувався у печінці мишей-пухлиноносіїв, а через 13 днів повністю виводився з мінімальним накопиченням у селезінці, легенях і м'язах [393]. За низьких нетоксичних доз C_{60} накопичується в органах у короткий термін після введення, але з часом виводиться, тоді як за високих доз спостерігається тривале утримання в органах.

При морфологічному дослідженні органів спостерігалися дозозалежні зміни у печінці і селезінці, починаючи з дози 150 мг/кг C_{60} фулерену, а у нирках - вище 300 мг/кг C_{60} . C_{60} фулерен на 14-й день після одноразового внутрішньочеревного введення за доз 300 мг/кг і вище викликав фіброзні і дистрофічні зміни в тканинах нирки, печінки і селезінки мишей.

За найвищих доз (1200 і 1800 мг/кг) молекули C_{60} накопичувалися в нирках і печінці тварин і викликали нефрит, фіброз і дистрофічні зміни у печінці (Рис. 10.4 В, D). Так, у нирках вивлено порушення гемодинаміки у вигляді набряку, корковий шар та вивідний відділ були заповнені кров'ю, локально спостерігалися крововиливи, збільшення розміру клубочків, розширення кровоносних капілярів, а також дистрофія в епітелії звивистих каналців (Рис. 10.4 В). У печінці була порушена балкова структура органу, судини були розширеними, частина яких виповнена кров'ю, спостерігалися дистрофічні зміни у гепатоцитах, цитоплазма яких була спустошеною (Рис. 10.4 D). У селезінці спостерігалось збільшення площі червоної пульпи та зменшення зони білої пульпи (Рис. 10.4 F).

Гістопатологічні зміни у нирках, печінці і селезінці свідчать про розвиток запальних процесів у мишей, які отримували 1200 мг/кг C_{60} фулерену, що підтверджується інфільтрацією лейкоцитів в органах.

У інших органах – серці, шлунку, тонкому і товстому кишечнику мишей, яким вводили C_{60} фулерен, не було виявлено аномалій (дані не представлено).

Патоморфологічні зміни у селезінці (збільшення площі червоної пульпи, а також зменшення площі білої пульпи) у мишей, яким внутрішньочеревно вводили C_{60} фулерен (600 мг/кг і більші дози) корелювали з гематологічним ефектом карбонової наноструктури. Це дозволяє зробити припущення, що ретикулоцитоз в крові, а також збільшена площа червоної пульпи в селезінці, є результатом накопичення еритроцитів після дії C_{60} фулерену за високих доз.

Як було показано авторами [121] $C_{60}((CH_2)_4SO_3Na)_{4-6}$, який внутрішньовенно вводили щурам в дозі 100 мг/кг, накопичувався в селезінці і печінці й індукував подібні зміни в органах тканин. Гістопатологічні зміни в нирках, а саме розвиток нефропатії, були виявлені на 14-й день після внутрішньочеревного введення $C_{60}((CH_2)_4SO_3Na)_{4-6}$: в печінці, селезінці і тимусі мертвих тварин спостерігалася велика кількість світло-коричневих включень.

Таким чином, C_{60} фулерен в діапазоні доз 75-150 мг/кг не спричиняв токсичних ефектів у експериментальних тварин. Показник LD_{50} для C_{60} фулерену за умови внутрішньочеревного введення становив 721 мг/кг. Токсичний ефект C_{60} фулерену спостерігався за концентрацій 300 мг/кг і більше, який супроводжувався порушенням поведінки мишей, гематотоксичністю і патоморфологічними змінами в тканинах селезінки, печінки і нирок. Одним з основних механізмів токсичної дії C_{60} фулерену можна вважати індукцію запального процесу, а за високих доз (1200 мг/кг) – пригнічення гемопоезу. Таким чином, водний колоїдний розчин C_{60} фулерену в діапазоні доз 75-150 мг/кг є нетоксичним і може бути використаний для біомедичних цілей.

10.1.2. Визначення показника LD_{50} , гемато- та органоспецифічна токсичність C_{60} -Cis-Pt наноконплексу

Оскільки токсичні ефекти цисплатину *in vivo* виявляються у широкому діапазоні доз 6,6-32,7 мг/кг та залежать від способу введення [264, 379], тому токсичність C_{60} -Cis-Pt наноконплексу вивчали у діапазоні зростаючих доз 7,5,

15, 22,5, 30, 37,5 та 45 мг/кг еквівалентних цисплатину. Концентрація C₆₀ фулерену та Cis-Pt у створеному наноконкомплексі C₆₀-Cis-Pt за вагою становить 1:1, тому концентрація Cis-Pt є рівною концентрації C₆₀ фулерену.

Гостру токсичність C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу (у співвідношенні сполук по масі 1:1) у діапазоні доз 7,5+7,5, 15+15, 22,5+22,5, 30+30, 37,5+37,5 та 45+45 мг/кг вивчали у порівнянні з окремою дією цисплатину за доз 7,5, 15,0 та 22,5 мг/кг. Упродовж 14 діб після внутрішньочеревного введення мишам досліджуваних сполук проводили спостереження за їх виживаністю, масою тіла та органів, поведінкою та загальним станом тварин, станом їх покривів, прийомом корму і води та проявом симптомів інтоксикації організму. Показники гострої токсичності C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу, а саме величину LD₅₀, гематологічні показники та морфологію органів визначали на 14 день після внутрішньочеревного введення сполуки за різних доз.

Виживаність мишей та визначення показника LD₅₀ для C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу. Поведінкові реакції та зовнішній вигляд тварин за умови внутрішньочеревного введення C₆₀-Cis-Pt (1:1) наноконкомплексу за доз 7,5+7,5 і 15+15 мг/кг не змінювалися, за дози 22,5+22,5 мг/кг активність тварин була незначно знижена і відмічалися зміни у стані покривів. За високих доз C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу 30+30, 37,5+37,5 і 45+45 мг/кг фіксувалися зміни у поведінці та у зовнішньому вигляді тварин. Миші були гіпоактивні, мали скуйовджений шерстяний покрив, з часом у тварин спостерігали діарею, ознаки болю (згорблена постава, летаргія, звуження орбіти ока), порушення координації рухів та тремор.

Тоді як за окремої дії цисплатину за досліджуваних доз у мишей спостерігалися зміни поведінкових реакцій. Так, після дії 7,5 та 15,0 мг/кг цисплатину на 3 день експерименту миші були дещо знервовані та менш активні, ніж контрольні, а за дози 22,5 мг/кг цисплатину уже на 2 день експерименту знижувалася активність мишей, у тварин був скуйовджений шерстяний покрив, проявлялися ознаки болю (згорблена постава, летаргія, звуження орбіти ока, здуття ніздрів та щік), втрата координації рухів і тремор, а також зневоднення організму і діарея.

C₆₀-Cis-Pt (1:1) наноконплексу за внутрішньочеревного введення за доз 7,5+7,5 та 15+15 мг/кг упродовж експерименту не спричиняв загибелі мишей, тоді як за дози 22,5+22,5 мг/кг загинула 1 тварина із шести (16,7%) на 4 добу експерименту, а за дози 30+30 мг/кг загинуло 2 тварини із шести (33,3%) на 4 і 6 добу досліду (Табл. 10.4). Після дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу за доз 37,5+37,5 та 45+45 мг/кг у групах загинуло по 4 тварини із шести (66,7%), загибель тварин мала місце до 7 дня експерименту.

Таблиця 10.4

Вживаність мишей на 14 день після внутрішньочеревного введення C₆₀-Cis-Pt (1:1) наноконплексу за різних доз (M±m, n=6)

Дози C ₆₀ -Cis-Pt (1:1) наноконплексу, мг/кг	LgC	% загиблих тварин	відкорегований %	Пробіт
7,5 C ₆₀ + 7,5 Cis-Pt	1,2	0	4,2	2,2
15 C ₆₀ + 15 Cis-Pt	1,5	0	4,2	2,6
22,5 C ₆₀ + 22,5 Cis-Pt	1,7	16,7	16,7	3,7
30 C ₆₀ + 30 Cis-Pt	1,8	33,3	33,3	4,4
37,5 C ₆₀ + 37,5 Cis-Pt	1,9	66,7	66,7	5,2
45 C ₆₀ + 45 Cis-Pt	2,0	66,7	66,7	5,8

Загибель мишей у групах з 0% (після введення C₆₀-Cis-Pt наноконплексу у дозі 7,5 мг/кг еквівалентній цисплатину) було скореговано за формулою [192]: $100 \times (0,25/n)$ для 0% померлих. Відсоток загиблих тварин для всіх досліджуваних груп переводили у пробіт (Табл. 10.4). Напівлетальну дозу (LD₅₀) для C₆₀-Cis-Pt наноконплексу розраховували за допомогою StatPlus програми згідно отриманих результатів за Пробіт аналізом (Табл. 10.4). Значення LD₅₀ для C₆₀-Cis-Pt наноконплексу за умови внутрішньочеревного введення становив 36,1 мг/кг за еквівалентної концентрації цисплатину.

Цисплатин спричиняв загибель за доз 15 мг/кг і вище. На 14 день експерименту після дії цисплатину за доз 15,0 та 22,5 мг/кг загинуло 2 (33,3%) та 6 тварин (100,0%) відповідно (Табл. 10.5). Розраховане значення LD₅₀ для

цисплатину за умови внутрішньочеревного введення мишам становило 15,6 мг/кг.

Згідно літературних даних величина LD_{50} для цисплатину за одноразового внутрішньочеревного введення коливається у широкому діапазоні концентрацій від 10 до 17 мг/кг. Так, цисплатин спричиняв 50% загибелі мишей інбредної лінії C_3H за дози 10 мг/кг [449] та мишей чоловічої статті лінії *ddy* за дози 16,9 мг/кг [264], що узгоджується з отриманою нами величиною LD_{50} для цисплатину.

Таблиця 10.5

Вживаність мишей на 14 день після внутрішньочеревного введення цисплатину за різних доз ($M \pm m$, $n=6$)

Доза Cis-Pt, мг/кг	Lg C	% загиблих тварин	відкорегований %	Пробіт
7,5	0,9	0	4,2	1,8
15,0	1,2	33,3	33,3	4,7
22,5	1,4	100,0	95,8	7,9

Маса тіла та органів мишей після дії C_{60} -Cis-Pt наноконплексу. Миші, яким вводили C_{60} -Cis-Pt наноконплекс не відрізнялися споживанням їжі та води від контрольних тварин. Через 7 та 14 днів після внутрішньочеревного введення мишам C_{60} -Cis-Pt наноконплексу за досліджуваних доз не виявлено змін маси тіла і внутрішніх органів (дані не наведено) порівняно з контрольною групою тварин. У мишей, які отримували цисплатин знижувався апетит та їх маса тіла була меншою порівняно з контрольною групою (Табл. 10.6).

Таблиця 10.6

Маса тіла (г) мишей, яким внутрішньочеревно вводили цисплатин ($M \pm m$, $n=6$)

Групи мишей	Дні після введення		
	0	7	14
Контроль	24,3±2,2	26,3±2,8	27,8±2,1
7,5 мг/кг	24,0±2,0	26,3±2,5	27,7±2,1
15,0 мг/кг	24,2±1,9	20,1±2,1*	22,3±2,4*
22,5 мг/кг	24,0±2,4	-	-

* $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою мишей

Так, після дії 15,0 мг/кг цисплатину через 7 та 14 днів маса тіла мишей була меншою на 22% і 20% відповідно порівняно з контрольною групою тварин.

Таким чином, C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс впливав на поведінкові реакції та виживаність за дози еквівалентній цисплатину 22,5 мг/кг, тоді як цисплатин за окремої дії – за дози 15 мг/кг. Згідно показника LD₅₀ токсична доза цисплатину при комплексації із C₆₀ фулереном знижувалася.

Вплив C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу на показники гемограми мишей.
Результати клінічного аналізу крові мишей, проведеного через 14 днів після разового внутрішньочеревного введення C₆₀-Cis-Pt (1:1) наноконкомплексу або цисплатину, представлено в Табл. 10.7.

Таблиця 10.7

Показники крові мишей через 14 днів після внутрішньочеревного введення C₆₀-Cis-Pt (1:1) наноконкомплексу або цисплатину

Групи тварин Показники	Контроль n=6	C ₆₀ -Cis наноконкомплекс, мг/кг						Cis, мг/кг	
		7,5+7,5 n=6	15+15 n=6	22,5+22,5 n=5	30+30 n=4	37,5+37,5 n=2	45+45 n=2	7,5 n=6	15 n=4
Гемоглобін, г/л	150,73 ± 2,52	144,41 ± 5,62	143,62 ± 3,39	151,6 ± 5,45	143,02 ± 9,78	143,82 ± 7,78	153,79 ± 0,6	137,77 ± 2,31*	126,76 ± 2,37*
Еритроцити, x10 ¹² /л	7,58 ± 0,07	7,72 ± 0,32	7,79 ± 0,19	7,99 ± 0,15	7,43 ± 0,37	7,9 ± 0,06	7,74 ± 0,13	7,6 ± 0,13	7,03 ± 0,1*
Гематокрит, %	45,06 ± 0,65	46,17 ± 1,81	46,1 ± 1,23	48,44 ± 1,31	46,45 ± 2,16	47,83 ± 0,03	47,67 ± 0,36	45,92 ± 0,94	42,83 ± 0,3*
MCV, фл	59,42 ± 0,57	59,81 ± 0,47	59,38 ± 0,56	60,59 ± 0,58	62,56 ± 0,92	60,55 ± 0,42	61,6 ± 0,57	60,43 ± 0,66	60,99 ± 0,4
МСН, пг	19,88 ± 0,21	18,73 ± 0,4	18,1 ± 0,31	18,97 ± 0,49	19,2 ± 0,57	18,21 ± 1,12	19,88 ± 0,41	18,14 ± 0,28*	18,05 ± 0,31*
МСНС, г/л	334,7 ± 5,25	313,11 ± 5,36	304,68 ± 2,55	312,98 ± 7,07	306,91 ± 7,83*	300,66 ± 16,44	302,64 ± 3,68	300,36 ± 5,17*	295,93 ± 4,75*
Ретикулоцити, x10 ¹² /л	0,19 ± 0,02	0,3 ± 0,03*	0,4 ± 0,04*#	0,36 ± 0,06*	0,48 ± 0,05*	0,40 ± 0,01	0,38 ± 0,07	0,33 ± 0,06*	0,28 ± 0,03*
Лейкоцити, x10 ⁹ /л	7,44 ± 0,47	5,98 ± 1,06#	6,08 ± 0,35#	5,82 ± 0,71	4,6 ± 0,4*	4,5 ± 3,4	4,3 ± 0,4	5,25 ± 1,12*	4,43 ± 2,19*
Тромбоцити, x10 ⁹ /л	706,86 ± 50,12	702,65 ± 86,31#	885,4 ± 61,46*#	1086,14 ± 141,33*	993,49 ± 119,49*	1186,8 ± 246	1353,43 ± 189,09	1106,4 ± 99,32*	1029,19 ± 118,87*

*p<0,05 порівняно з контрольною групою мишей, #p<0,05 порівняно з групою мишей, яким внутрішньочеревно вводили 15,0 мг/кг Cis-Pt

C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс у досліджуваному діапазоні доз через 14 днів після введення не впливав на концентрацію гемоглобіну в крові, кількість еритроцитів та гематокрит, значення цих показників знаходилися в межах норми (Табл. 10.7). Після дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу за дози 30+30 мг/кг і

вище знижувався еритроцитарний індекс - середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (МСНС) (Табл. 10.7). Кількість ретикулоцитів була значно вищою в крові мишей, яким внутрішньочеревно вводили розчин C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу у досліджуваних дозах, порівняно з контрольною групою мишей (Табл. 10.7). Про спричинену C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом активацію гемопоезу свідчили не лише збільшення кількості ретикулоцитів, але і збільшення кількості тромбоцитів у крові і мієлокаріоцитів у кістковому мозку (Табл. 10.7, 10.8).

Показано, що C₆₀-Cis-Pt (1:1) наноконкомплекс за доз 22,5+22,5, 30+30, 37,5+37,5 та 45+45 мг/кг пригнічував лейкопоз, дозозалежно знижуючи загальну кількість лейкоцитів на 22, 38, 40 та 42% відповідно, порівняно з контролем (Табл. 10.7). Спричинена C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексом лейкопенія супроводжувалася зниженням відсотка лімфоцитів із одночасним збільшенням еозінофілів, сегментоядерних і паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів та моноцитів у крові відносно контролю (Табл. 10.8).

Таблиця 10.8

Кількість лейкоцитів у крові та мієлокаріоцитів у кістковому мозку мишей через 14 днів після внутрішньочеревного введення C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу (1:1) або цисплатину

Групи тварин	Контроль n=6	C ₆₀ -Cis наноконкомплекс, мг/кг						Cis, мг/кг	
		7,5+7,5 n=6	15+15 n=6	22,5+22,5 n=5	30+30 n=4	37,5+37,5 n=2	45+45 n=2	7,5 n=6	15 n=4
Показники, %									
Еозінофільні гранулоцити	0,17 ± 0,17	1,67 ± 0,56*	1,67 ± 0,71*	2,17 ± 0,4*	1,5 ± 0,29*	2,4 ± 1,1	2,1 ± 1,2	0,67 ± 0,33*	1,75 ± 1,44*
Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити	2,5 ± 0,56	5,83 ± 1,14*	6,67 ± 1,56*	5,17 ± 1,4*	5,5 ± 0,87*	5,3 ± 1	5,5 ± 0,5	1 ± 0,34	2 ± 0,41
Сегментоядерні і нейтрофільні гранулоцити	20 ± 1,53	27,67 ± 4,86	28,33 ± 3,31*	31,67 ± 5,16*	33,25 ± 1,49*	34,5 ± 0,5	35,5 ± 0,5	19,17 ± 3,29	24,25 ± 4,01*
Лімфоцити	70,83 ± 1,89	55,33 ± 4,16*	50,67 ± 3,2*	53,67 ± 6,22*	51,75 ± 2,32*	56,5 ± 0,5	55,5 ± 2,5	67 ± 2,89	58,25 ± 2,06*
Моноцити	6,5 ± 0,92	9,5 ± 1,15*#	12,67 ± 1,91*#	10,33 ± 1,28*	11 ± 1,91*	12 ± 1	12,5 ± 4,5	11,67 ± 2,09*	13,75 ± 2,53*
Мієлокаріоцити кісткового мозку	65,33 ± 7,37	133,42 ± 6,34*#	98,92 ± 7,61*#	83,08 ± 4,93	87,56 ± 9,82	92,1 ± 3,9	99,38 ± 10,88	83,75 ± 11,1	59,44 ± 5,08

*p < 0,05 порівняно з контрольною групою мишей,

#p < 0,05 порівняно з групою мишей, яким внутрішньочеревно вводили 15 мг/кг Cis-Pt

Збільшення кількості еозинофілів, нейтрофілів і моноцитів після дії C_{60} -Cis-Pt наноконплексу пов'язане із відновленням гемопоезу, а також із участю цих клітин крові у відновленні тканин, які були ушкоджені цисплатином. Гематотоксичність C_{60} фулерену виключається, яка за його окремої дії виявлялася за доз 300 мг/кг і вище (Розділ 10.1.1).

Таким чином, виявлені зміни показників крові можуть бути наслідком компенсаторної відповіді організму на токсичну дію цисплатину, як складового компоненту наноконплексу. Так, цисплатин за окремої дії у дозі 15 мг/кг на 14 день після внутрішньочеревного введення спричиняв анемію у мишей, яка супроводжувалася зниженням концентрації гемоглобіну (на 16%) та показника МСНС (на 12%). Окрім того, за дії цисплатину у дозах 7,5 та 15 мг/кг у крові підвищувалася кількість ретикулоцитів (на 74 та 47% відповідно), тромбоцитів (на 57 та 46% відповідно), моноцитів (у 1,8 та 2,1 рази відповідно), еозинофілів (у 3,9 та 10,3 рази відповідно) на фоні зниження кількості лейкоцитів (лейкопенія).

Отримані нами результати щодо гематотоксичності цисплатину узгоджуються із літературними даними, згідно яких традиційні протипухлинні препарати пригнічували процеси кровотворення і спричиняли токсичну дію на клітини крові [29, 36]. Так, Cis-Pt виявляв гематотоксичність як за низьких (10^{-8} - 10^{-12} г/мл на щура) [317], так і за високих (4-16 мг/кг) концентрацій [305, 322, 361, 488, 508], яка супроводжувалася змінами показників крові та розвитком анемічних станів у експериментальних тварин.

Виявлено, що C_{60} фулерен, по-перше, попереджав спричинене цисплатином пригнічення процесів кровотворення (зниження концентрації гемоглобіну в крові) активуючи утворення еритроцитів і ретикулоцитів у крові, а також мієлокаріоцитів у кістковому мозку, та, по-друге, запобігав розвитку Cis-Pt-індукованого тромбоцитозу, про що свідчило зниження тромбоцитів у 1,6 та 1,2 рази після дії 7,5+7,5 та 15+15 мг/кг C_{60} -Cis-Pt наноконплексу порівняно з окремою дією цисплатину за цієї ж концентрації.

Отже, гематотоксичність цисплатину за умови внутрішньочеревного введення мишам спостерігалася за дози 7,5 мг/кг і вище, яка знижувалася за

комплексації із C_{60} фулереном і виявлялася за дози 22,5 мг/кг і вище, що узгоджується як із токсикологічними, так і гістологічними даними.

Морфологічний стан органів мишей після дії C_{60} -Cis-Pt наноконплексу. У мишей, які внутрішньочеревно отримували C_{60} -Cis-Pt (1:1) наноконплекс у діапазоні досліджуваних доз макроскопічно не виявлено істотних аномалій в органах (розмір, форма і колір вірогідно не змінювались, наростів на тканинах органів не було). Після дії цисплатину також не виявлено змін форми органів та наростів на тканинах органів, проте органи були темнішого кольору, меншого розміру та маси, зокрема нирки, селезінки і печінки (дані не представлено) порівняно з органами у контрольній групі мишей.

Гістологічні дослідження органів мишей за дії C_{60} -Cis-Pt (1:1) наноконплексу виявили дозозалежні зміни. C_{60} -Cis-Pt наноконплекс за доз 7,5+7,5 і 15+15 мг/кг спричиняв незначні морфо-функціональні зміни у тканинах досліджуваних органів (дані не представлено), а за дози 22,5+22,5 мг/кг (Рис. 10.5 В) у нирках спостерігалася інфільтрація лейкоцитами, розширення, вакуолізація і набряк каналців; у тканині серця - нерівномірне кровонаповнення з локальними ішемічними змінами, нерівномірне забарвлення кардіоміоцитів, поодинокі кардіоміоцити були фрагментовані, у деяких не проглядалась поперечна посмугованість; у печінці спостерігали повнокрів'я вен, деякі мали розширений просвіт, клітини печінки мали дистрофічні зміни з різним ступенем вираженості; селезінка була повнокрівна, з нечіткими межами фолікул, не завжди проглядалися реактивні центри; у тонкому кишківнику спостерігали судини підслизової оболонки, які мали нерівномірне кровонаповнення, мали місце інфільтрація і набряк строми та ворсинок. Найбільш виразні патоморфологічні зміни у органах спостерігалися при застосуванні найбільшої дози 45+45 мг/кг C_{60} -Cis-Pt наноконплексу.

При гістологічному дослідженні органів після дії цисплатину спостерігалися подібні зміни, що були спричинені C_{60} -Cis-Pt (1:1) наноконплексом. Однак цисплатин за окремої дії викликав патоморфологічні зміни органів за дози 7,5 мг/кг, тоді як при комплексації із C_{60} фулереном за дози 22,5 мг/кг і вище. Так, цисплатин за дози 22,5 мг/кг (Рис. 10.5 Б) спричиняв

зміни у міокарді, що свідчить про початок розвитку серцевої недостатності, яка підтверджується повнокрів'ям у інших органах, а також змінами у тонкому кишківнику і у інших органах, які корелюються з показниками крові про побічні ефекти при застосуванні хіміопрепарату.

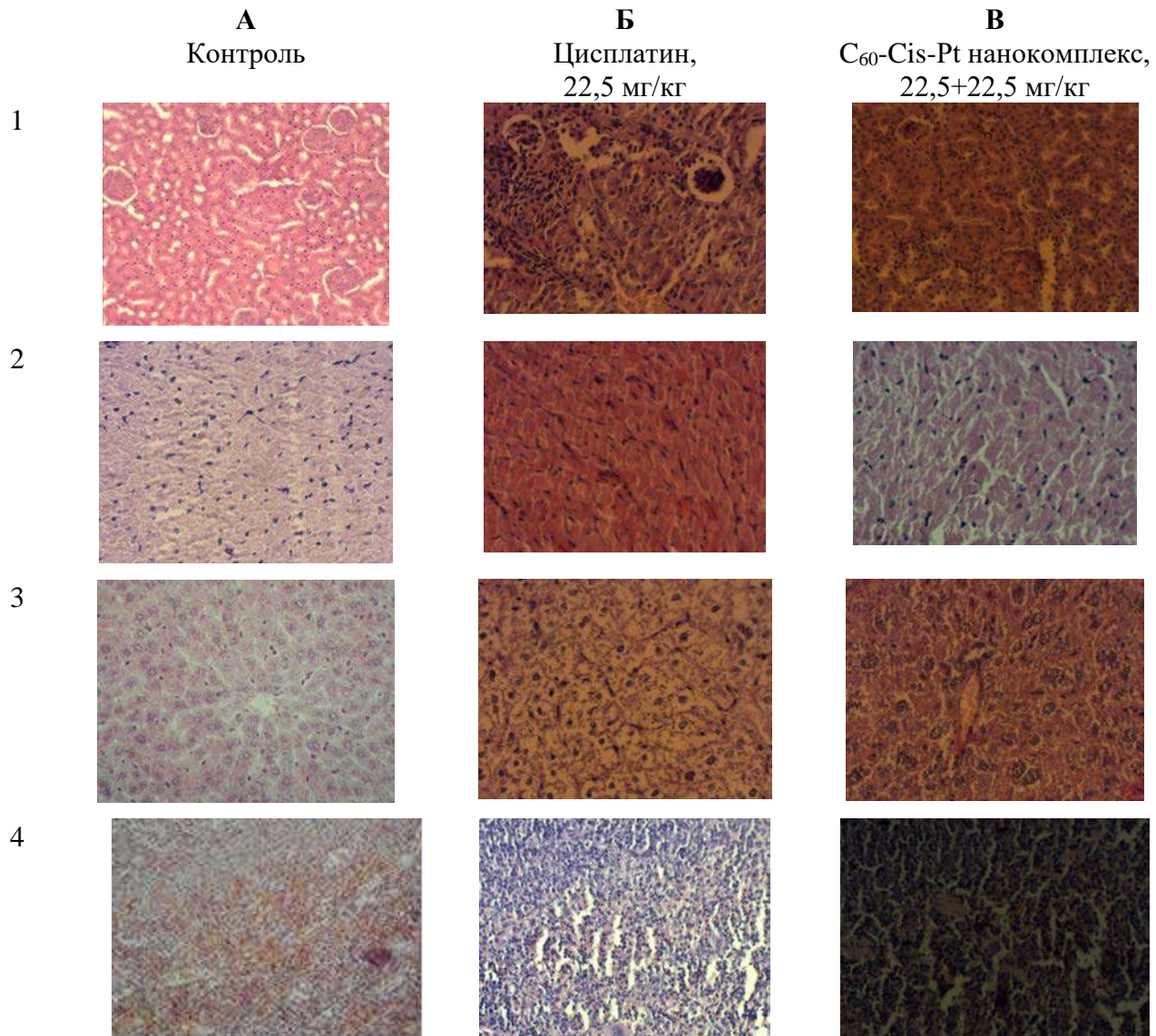


Рис. 10.5. Гістологічні зрізи нирок (1), серця (2), печінки (3) та селезінки (4) мишей у контрольній групі (А) та яким внутрішньочеревно вводили Cis-Pt (Б) або C₆₀-Cis-Pt наноконплекс (В) (пофарбовано гематоксилін еозином, ×200)

Таким чином, за умови внутрішньочеревного введення мишам C₆₀-Cis-Pt наноконплексу (1:1) токсичні ефекти виявлялися за дози 22,5+22,5 мг/кг, а цисплатину – за дози 15 мг/кг, що супроводжувалося зниженням активності та

виживаності тварин, порушенням процесів кровотворення та гістопатологічними змінами у печінці, серці та нирках. Токсичність цисплатину ($LD_{50}=15,6$ мг/кг) при комплексації із C_{60} фулереном ($LD_{50}=36,1$ мг/кг) удвічі знижувалася.

Оскільки цисплатин ($LD_{50}=15,6$ мг/кг) та C_{60} фулерен ($LD_{50}=721$ мг/кг) як за окремої дії, так і у складі C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу (1:1) ($LD_{50}=36,1$ мг/кг за еквівалентної концентрації Cis-Pt) після внутрішньочеревного введення мишам у дозі 3,75 мг/кг не спричиняли токсичних ефектів, гематологічних та гістопатологічних змін у печінці, нирках та селезінці, тому протипухлинну активність C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу вивчали за доз 3,5 мг/кг його складових.

10.2. Протипухлинний ефект C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс

При вивченні протипухлинної активності хіміопрепаратів використовується багато перещеплювальних моделей пухлинного росту, зокрема, аденокарцинома Ерліха, лейкози L1210 і P-388, карцинома легені Льюїс, меланома B-16 тощо, які відрізняються за етіологією та способом трансплантації пухлинних клітин – внутрішньочеревно, внутрішньом'язево та підшкірно відповідно [38, 58, 63].

Для дослідження протипухлинної активності C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу *in vivo* у роботі як модель пухлинного росту було використано карциному легені Льюїс мишей, яку перещеплювали внутрішньом'язево у задню кінцівку тварини. Дана модель є зручним об'єктом дослідження протипухлинної активності *in vivo*, оскільки перещеплена пухлина не індукує реакцій трансплантаційного імунітету у мишей лінії C57Bl/6, характеризується швидким збільшенням розмірів пухлинного вузла, із 100% ймовірністю спонтанно метастазує у тканину легені, що дозволяє оцінити достатню кількість показників протипухлинної та антиметастатичної дії досліджуваного препарату (розмір та об'єм пухлини, кількість метастазів тощо) [325].

Високий показник смертності тварин за токсичної дії хіміопрепаратів ускладнює тривалу оцінку їх протипухлинних ефектів, тому введення

цисплатину за низьких доз є більш ефективним. У експериментах *in vivo* ми використали схему багаторазових внутрішньочеревних введень (5 разів із інтервалом через 1 день) C₆₀-Cis-Pt наноконплексу за загальної дози 7,5 мг/кг (3,75 мг/кг C₆₀ фулерену та 3,75 мг/кг Cis-Pt). Введення препаратів мишам-пухлиноносійм розпочинали на 2 день після трансплантації пухлинних клітин. Цисплатин та C₆₀ фулерен за внутрішньочеревного введення мишам у дозі 3,75 мг/кг як окремо, так і при комплексації не спричиняли токсичних ефектів, гематологічних та гістопатологічних змін у тканинах мозку, печінки, нирки та селезінки (Розділ 10.1).

Протипухлинну активність C₆₀-Cis-Pt наноконплексу *in vivo* досліджували у порівнянні з окремою дією його складових за еквівалентних доз. У попередніх дослідженнях *in vitro* (Розділ 9) нами показано, що C₆₀-Cis-Pt наноконплекс є більш токсичним щодо різних ліній злоякісних клітин людини і мишей порівняно з вільним цисплатином за еквівалентної концентрації, тому важливо було з'ясувати чи виявиться терапевтична ефективність цисплатину у низькій дозі за комплексації з C₆₀ фулереном *in vivo*.

10.2.1. Вживаність мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу

Тривалість життя мишей-пухлиноносійм оцінювали в усіх експериментальних групах щоденно з моменту перещеплення карциноми легені Льюїс до загибелі останньої експериментальної тварини.

Першу загибель двох мишей у контрольній групі та однієї миші у групі, яким вводили C₆₀ фулерен було зафіксовано на 22-гу добу після перещеплення пухлини (Рис. 10.6, Табл. 10.9). Загибель останньої миші у контрольній групі пухлиноносійм було виявлено на 30-ту добу після трансплантації клітин LLC. Показник середньої тривалості життя мишей-пухлиноносійм у контрольній групі становив 25 діб (Табл. 10.10).

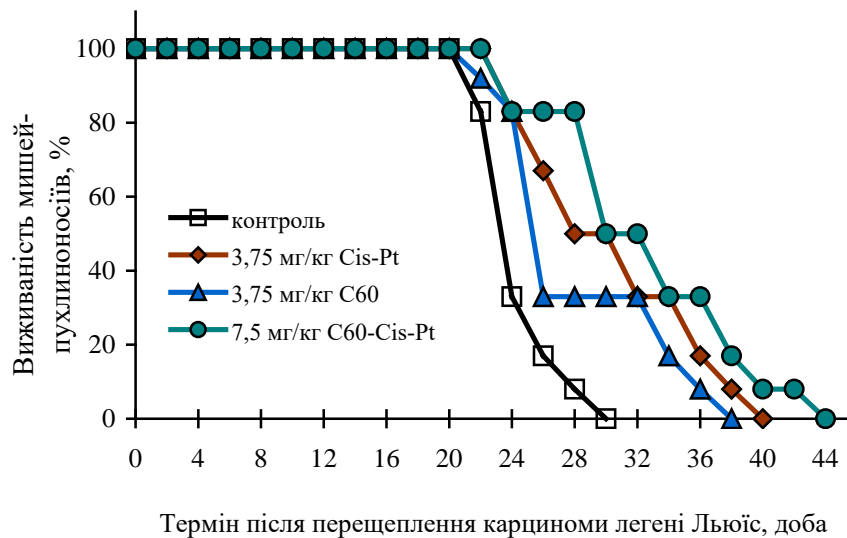


Рис. 10.6. Вживаність (%) мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс після внутрішньочеревного введення цисплатину, C₆₀ фулерену або C₆₀-Cis-Pt нанокмплексу (M±m, n=12)

За дії цисплатину вживаність та середня тривалість життя мишей-пухлиноносіїв зростала порівняно з контролем. Загибель останньої миші у групі, яким вводили цисплатин було зафіксовано на 40-ву добу після перещеплення карциноми, а показник середньої тривалості життя становив 31-ну добу (Рис. 10.6, Табл. 10.9). C₆₀ фулерен також підвищував показники вживаності мишей-пухлиноносіїв (Рис. 10.6, Табл. 10.9), а саме загибель останньої тварини у цій групі було виявлено на 38-му добу, а середня тривалість життя становила 29 діб.

Останні дослідження показали, що металофулерен Gd@C₈₂(OH)₂₂ за дози 3,8 мг/кг після внутрішньочеревного введення (1 раз на добу упродовж 7 днів) не спричиняв вираженої побічної дії у мишей з перещепленою пухлиною молочної залози людини MCF-7 - жодна тварина-пухлиноносій не загинула, маса тіла тварин відповідала показникам у нормі, тоді як загибель тварин-пухлиноносіїв спостерігалася в контрольній групі та у групі, яким вводили паклітаксель по 10 мг/кг (4 рази з інтервалом через 3 дні) [330].

За дії C₆₀-Cis-Pt нанокмплексу вживаність мишей-пухлиноносіїв збільшувалася до 44 діб порівняно з показником у контрольній групі мишей-пухлиноносіїв (30 діб). Середня тривалість життя мишей-пухлиноносіїв у групі,

яким вводили C₆₀-Cis-Pt нанокмплекс становила 33 доби, тоді як у контрольній групі показник становив 25 діб (Табл. 10.10).

Таблиця 10.9

Вживаність мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс після внутрішньо-черевного введення цисплатину, C₆₀ фулерену або C₆₀-Cis-Pt нанокмплексу

Термін, після перещеплення пухлини, доба	Групи мишей-пухлиноносіїв			
	Контроль, n=12	+ Cis-Pt, n=12	+ C ₆₀ фулерен, n=12	+ C ₆₀ -Cis-Pt нанокмплекс, n=12
20	12	12	12	12
22	10	12	11	12
24	4	10	10	10
26	2	8	4	10
28	1	6	4	10
30	0	4	4	6
32		4	4	6
34		4	2	4
36		2	1	4
38		1	0	2
40		0		1
42				1
44				0

Подовження тривалості життя тварин-пухлиноносіїв на 25% і вище за дії хіміопрепарату порівняно з контрольною групою тварин-пухлиноносіїв є критерієм ефективності протипухлинної дії [116].

Значення показника подовження тривалості життя мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс у експериментальних групах свідчать про ефективну дію цисплатину як окремо, так і при комплексації із C₆₀ фулереном (Табл. 10.10). C₆₀-Cis-Pt нанокмплекс виявляв більш ефективну протипухлинну дію, оскільки коефіцієнт подовження тривалості життя мишей-пухлиноносіїв у цій групі є вищим порівняно з окремим введенням цисплатину та C₆₀ фулерену за еквівалентних концентрацій у 1,3 та 2 рази відповідно.

Показники середньої тривалості життя (СТЖ) та подовження тривалості життя (ПТЖ) мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс після внутрішньо-черевного введення цисплатину, C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконплексу (M±m, n=12)

Групи мишей-пухлиноносіїв	СТЖ, дні	ПТЖ, %
Контроль	25±2	-
+ Cis-Pt	31±3	24±4*
+ C ₆₀ фулерен	29±2	16±4
+ C ₆₀ -Cis-Pt наноконплекс	33±3	32±5*

*p<0,05 відносно контрольних мишей-пухлиноносіїв

Виявлена нами здатність цисплатину подовжувати тривалість життя мишей-пухлиноносіїв добре узгоджується з літературними даними. Так, цисплатин подовжував тривалість тварин з перещепленою гліомою мозку (штам 101.8), показник СТЖ становив 20±3,1 діб, тоді як у контрольній групі тварини - 16±1,7 діб [54], на 48,1% - з асцитною пухлиною яєчника [25] та удвічі - з асцитною лімфомою Далтона [305] порівняно з контрольною групою тварин.

Оскільки за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу ефективно подовжувалася тривалість життя мишей-пухлиноносіїв, тому не виключається протипухлинна та антиметастатична дія сполуки, що було наступним завданням нашої роботи.

10.2.2. Вплив C₆₀-Cis-Pt наноконплексу на ріст перещепленої карциноми легені Льюїс у мишей

Протипухлинну активність досліджуваних препаратів *in vivo* оцінювали за їх впливом на ріст перещепленої карциноми легені Льюїс за такими критеріями як об'єм первинного пухлинного вузла та маса пухлини у експериментальних тварин.

Об'єм пухлинного вузла оцінювали в усіх експериментальних групах мишей з моменту внутрішньочеревного введення препаратів по 22-й день

включно після трансплантації клітин LLC. Середній об'єм пухлинного вузла в досліджуваних групах: (1 - контроль, 2 - Cis-Pt, 3 - C₆₀ фулерен, 4 - C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс) значно збільшувався з 10-ї по 22-гу добу після перещеплення пухлини (Рис. 10.7).

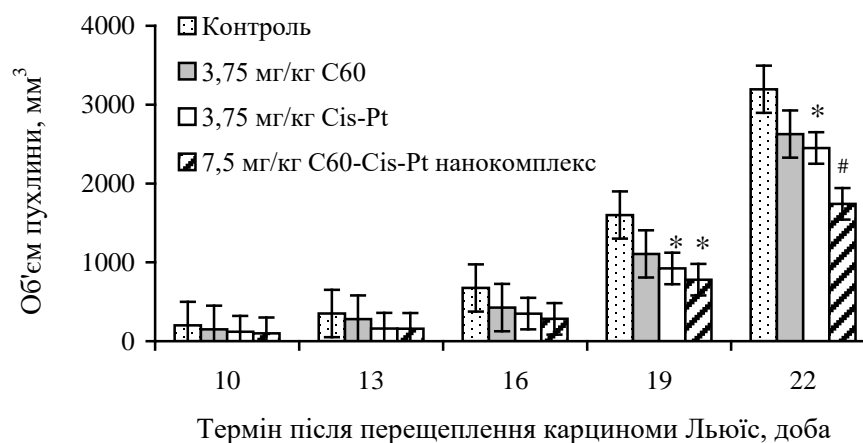


Рис. 10.7. Динаміка зміни об'єму перещепленої карциноми легені Льюїс у мишей. (M±m, n=8). *p<0,05 відносно контрольних мишей-пухлиноносіїв, #p<0,05 відносно мишей-пухлиноносіїв мишей, яким вводили цисплатин

Об'єм пухлини прогресивно збільшувався у контрольній групі мишей-пухлиноносіїв. Введення цисплатину та C₆₀ фулерену у сумарній дозі по 3,75 мг/кг, як окремо, так і за їх комплексації спричиняло пригнічення росту пухлини, порівняно з контрольною групою мишей-пухлиноносіїв. Виразні протипухлинні ефекти спостерігалися на 22-гу добу після перещеплення пухлини (Рис. 10.7). Так, об'єм пухлини у мишей, яким вводили цисплатин, був меншим у 1,3 рази, а після введення C₆₀ фулерену – у 1,2 рази порівняно з контрольною групою тварин-пухлиноносіїв. Комплексування C₆₀ фулерену з Cis-Pt посилювало пухлиногальмівну дію цитостатика, про що свідчило зменшення об'єму пухлинного вузла на 22-гу добу у 1,8 та 1,4 рази порівняно з контрольною групою мишей та групою мишей, які отримували цисплатин відповідно.

Аналіз кількісного показника протипухлинної дії (індекс гальмування пухлинного росту, ГПР %) виявив відмінності у динаміці пухлиногальмівної дії досліджуваних сполук (Рис. 10.8).

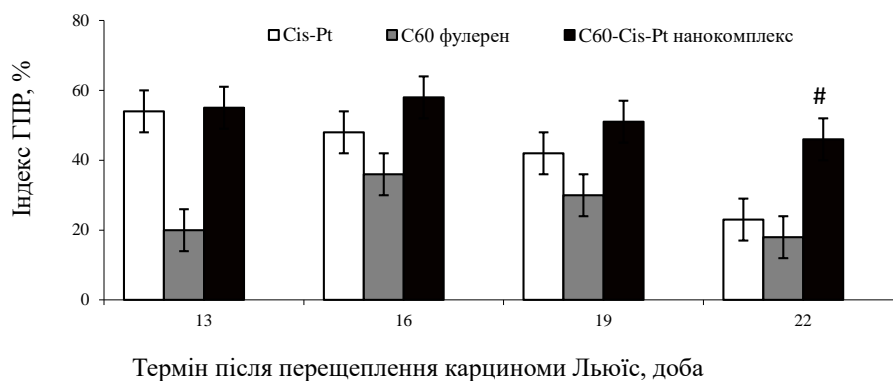


Рис. 10.8. Індекс гальмування пухлинного росту у мишей з карциномою легені Льюїс за умови внутрішньочеревного введення цисплатину, C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу. Сумарна доза: C₆₀ – 3,75 мг/кг, Cis-Pt – 3,75 мг/кг, C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу 7,5 мг/кг. (M±m, n=8). #p<0,05 відносно мишей-пухлиноносіїв, яким вводили цисплатин

Гальмування росту карциноми легені Льюїс цисплатином за окремої дії було найбільш виразним на початкових етапах пухлинного росту і значно знижувалося на пізніх термінах. Інгібуючий вплив C₆₀ фулерену на ріст карциноми вірогідно не змінювався у часі, показник був нижчим порівняно з дією цисплатину та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу. Гальмівний вплив C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу був стабільним у часі. Індекс ГПР у тварин, які отримували C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс, був достовірно вищим за такий у групі мишей, які отримували Cis-Pt на пізніх термінах росту пухлини (22-га доба після трансплантації пухлинних клітин).

Збільшення об'єму перещепленої карциноми легені Льюїс в процесі росту супроводжувалося також збільшенням маси пухлинного вузла. Середня вага пухлини на 22-гу добу після перещеплення у мишей, яким вводили цисплатин та C₆₀ фулерен була нижчою у 1,36 та 1,23 рази відповідно порівняно з контрольною групою тварин (Табл. 10.11). На момент завершення

експерименту виразне зниження маси пухлини спостерігалось за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу порівняно як з контрольною групою мишей-пухлиноносіїв (у 1,6 рази), так і з групою мишей-пухлиноносіїв, що отримували цисплатин (1,2 рази).

Таблиця 10.11

Маса (г) пухлини та легень мишей на 22 день після перещеплення карциноми легені Льюїс, яким внутрішньочеревно вводили цисплатин, C₆₀ фулерен та C₆₀-Cis-Pt наноконплекс (M±m, n=8)

Експериментальні групи	Маса пухлини, г	Маса легень, г
Миші-пухлиноносії (контроль)	7,6 ± 0,9	0,210 ± 0,10
Миші-пухлиноносії, яким вводили Cis-Pt	5,6 ± 0,5*	0,199 ± 0,20
Миші-пухлиноносії, яким вводили C ₆₀ фулерен	6,2 ± 0,5*	0,175 ± 0,15
Миші-пухлиноносії, яким вводили C ₆₀ -Cis-Pt наноконплекс	4,9 ± 0,4*	0,166 ± 0,18*

Сумарна доза: 3,75 мг/кг C₆₀, 3,75 мг/кг Cis-Pt, 7,5 мг/кг C₆₀-Cis-Pt наноконплексу. *p<0,05 відносно контрольних мишей-пухлиноносіїв

Отже, протипухлинна активність цисплатину за комплексації з C₆₀ посилювалася - ріст карциноми легені Льюїс пригнічувався, маса пухлинного вузла знижувалася порівняно як з контролем, так із дією вільного цисплатину за еквівалентної дози.

Отримані нами результати щодо протипухлинної активності цисплатину узгоджуються з літературними даними. Так, цисплатин у діапазоні доз 2,1 - 8 мг/кг за різних способів введення пригнічував ріст та розвиток перещеплюваних пухлин різного гістогенезу. Так, після внутрішньовенного введення мишам з пухлиною цисплатину за дози 8 мг/кг гальмувався ріст та зменшувалися удвічі об'єми карциноми легені Льюїс, меланоми В-16, саркоми S-37 і лімфоцитарної лейкемії Р-388 [23]. За внутрішньочеревного введення тваринам-пухлиноносіям цисплатину за дози 2,1 мкг/кг пригнічувався ріст, об'єм (на 13,5%) та маса (на 60%) карциноми Герена Т8 (спонтанна

аденокарцинома матки) [9], за дози 3 мг/кг удвічі зменшувалася вага карциноми легень Льюїс та меланоми В-16 [165, 496].

Крім того, існують літературні дані щодо протипухлинної активності C_{60} фулерену *in vivo*. Так, за умови внутрішньочеревного введення металопохідне $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ (72 мкг/кг) [119] та фулерол $C_{60}(OH)_x$ (3,4 мг/кг) [541] інгібували ріст перещепленої мишам гепатокарциноми Н22, метано-похідне C_{60} фулерену (167 мг/кг) - лейкоз Р388 миші [266], фулереновий диадукт маленової кислоти DMA- C_{60} /DTX-МС (15 мг/кг) після внутрішньовенного введення - саркому S180 [208]. Металофулерен $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ (3,8 мг/кг) на рівні паклітакселя (10 мг/кг) пригнічував ріст карциноми молочної залози MCF-7, про що свідчило зниження маси 14-денної пухлини на 48,8% та 45,1% відповідно відносно контролю [330].

Протипухлинну активність C_{60} фулерену можна пояснити вибірковістю накопичення у пухлинній тканині. Так, дослідження біорозподілу C_{60} фулерену та його похідних в організмі тварин-пухлиноносіїв показали, що мічений фулеренол $^{125}I-C_{60}(OH)_x$ (10 мкг) за умови внутрішньовенного введення через 24 год переважно накопичувався у пухлині порівняно з нормальною м'язовою тканиною (Т/Н), зокрема при гепатокарциномі мишей Н22 (3,41 Т/Н), остеосаркомі людини OS732 (1,21 Т/Н), карциномі легень людини PD (2,46 Т/Н), раку ободової кишки людини НСТ-8 (3,41 Т/Н) і раку шлунка людини MGC803 (6,26 Т/Н) [244]. Виявлено вищий рівень накопичення у пухлині міченого кон'югата $^{125}I-C_{60}$ -ПЕГ (424 мкг/кг) після внутрішньовенного введення мишам з фібросаркомою MethA [472], $^{125}I-C_{60}$ (3,88 мг/кг) після внутрішньочеревного введення мишам з меланою В16 [544], кон'югата C_{60} -ser-PF після внутрішньовенного введення мишам з гепатокарциномою Нер3В [413], фулеренового диадукту маленової кислоти DMA- C_{60} /DTX-МС (15 мг/кг) після внутрішньовенного введення мишам з саркомою S180 [208].

Однією з причин вибіркового накопичення C_{60} фулеренів у пухлинній тканині може бути їх здатність зв'язуватися з Toll-рецепторами [484], які надекспресуються більшістю пухлинних клітин [374] і регулюють ендоцитоз [326].

Відомо також, що C_{60} фулерен посилював протипухлинну активність різних цитостатиків. Так, за комбінованої дії цисплатину (загальна доза 80 мг/кг) та металофулерену $C_{60}[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ (загальна доза 28 мкМ/кг) зменшувалися розмір та вага перещепленої пухлини простати PC-3-лус людини як чутливої CP-s, так і резистентної CP-r ліній до цисплатину порівняно з окремою дією цитостатика [295]. Кон'югат фулеренол-доксорубіцин пригнічував ріст перещепленої меланоми B16/B10 у мишей [117] та пухлини молочної залози мишей 4T1 і запобігав розвитку токсичних ефектів спричинених доксорубіцином [448]. Кон'югат паклітаксель- C_{60} фулерен виявляв потужний цитотоксичний ефект і протипухлинну дію щодо гепатоцелюлярної карциноми Hep3B [93].

Таким чином, цисплатин за низької дози 3,5 мг/кг та C_{60} фулерен пригнічували ріст перещепленої карциноми легені Льюїс, найбільш інгібуючий ефект спостерігався на 22-гу добу експерименту за дії C_{60} -Cis-Pt нанокон'югату.

Для більш повної інформації щодо виявлених протипухлинних ефектів C_{60} -Cis-Pt нанокон'югату у мишей, нами було досліджено морфологічні зміни у тканині карциноми легені Льюїс.

10.2.3. Цитоморфологічні зміни у тканині карциноми легені Льюїс за дії C_{60} -Cis-Pt нанокон'югату

Гістологічне дослідження пухлинних вузлів проводили на 22-гу добу після трансплантації клітин LLC в усіх експериментальних групах мишей-пухлиноносіїв. На гістологічних зрізах карциноми легені Льюїс виявлено значну кількість клітин з великим ядром у центрі цитоплазми та великим ядерцем, конденсованими зернами хроматину і світлими ділянками каріоплазми (Рис. 10.9). У стромі пухлинної тканини виявлено некротичні ділянки з перифокальними запальними інфільтратами, що обумовлено недостатнім кровопостачанням ділянок росту пухлини. По периферії пухлини щільно розташовувалися клітини без некротичних змін, серед яких виявлялися клітини з ознаками мітозу. Тканина пухлинного вузла контрольної групи

мишей-пухлиноносіїв формувалася з угруповання гігантських поліморфних та атипових клітин (Рис. 10.9 а).

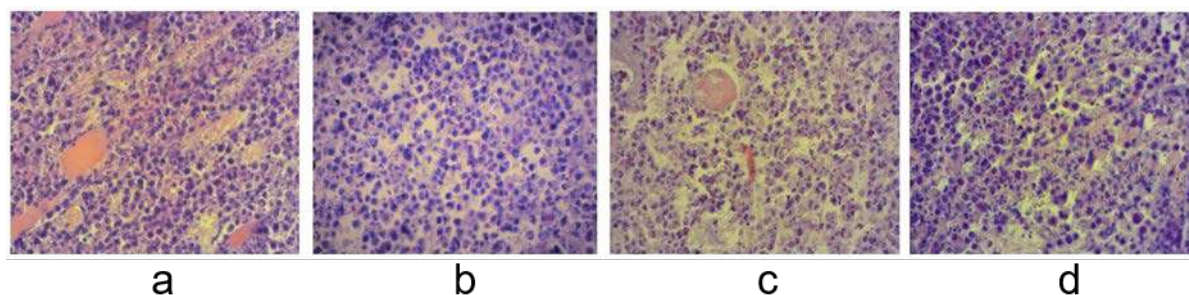


Рис. 10.9. Гістологічні зрізи тканин карциноми легені Льюїс (збільшення $\times 400$) профарбовані гематоксилін-еозином: контрольна група мишей-пухлиноносіїв (а), група мишей-пухлиноносіїв, яким вводили Cis-Pt (b), група мишей-пухлиноносіїв, яким вводили C_{60} фулерен (c), група мишей-пухлиноносіїв, яким вводили C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс (d). Сумарна доза: C_{60} – 3,75 мг/кг, Cis-Pt – 3,75 мг/кг, C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу 7,5 мг/кг

У пухлинній тканині мишей, яким внутрішньочеревно вводили цисплатин, у певних ділянках пухлинні клітини розташовувалися менш щільно, характеризувалися виразними порушеннями цитоархітектоніки та поліморфізмом ядра (Рис. 10.9 b). Поява великої кількості ядер різних за величиною, формою та кількістю обумовлена механізмом дії цисплатину, оскільки мішенню дії цього цитостатика є ДНК. Виявлені морфологічні зміни у ядрах пухлинних клітинах могли виникнути внаслідок структурно-функціональних порушень ДНК і змін як у клітинному циклі, так і у процесах поділу клітин. У певних ділянках росту пухлини виявлено зони некрозу.

Гістологічний аналіз пухлини групи мишей, яким вводили C_{60} фулерен, показав зниження кількості карциномних клітин з ознаками поліморфізму, які були переважно округло-овальної форми, малі за розміром, зустрічалися також клітини з фрагментованим ядром (Рис. 10.9 c). Слід відмітити, що пухлинні клітини розташовувалися окремо (рихло). Крім того, у пухлинній тканині виявлено накопичення молекул C_{60} у вигляді включень коричневого кольору.

У стромі пухлинної тканини групи мишей, яким вводили C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс, виявлено великі ділянки з ознаками некрозу та помірно виразними перифокальними запальними інфільтратами (Рис. 10.9 d).

При мікроскопічному дослідженні пухлинного вузла у контрольній групі тварин-пухлиноносіїв у пухлинних клітинах спостерігався мітоз, що свідчить про їх високу проліферативну активність (Рис. 10.10). У групі мишей з карциномою, яким вводили Cis-Pt, у пухлині зменшувалася на 65% кількість мітотичних клітин і збільшувалася на 50% кількість апоптотичних клітин (Рис. 10.10).

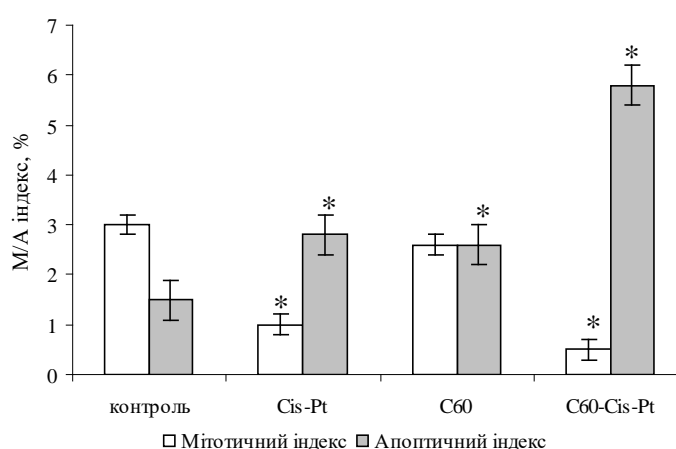


Рис. 10.10. Мітотичний та апоптотичний індекси клітин тканини карциноми легені Льюїс після внутрішньочеревного введення мишам Cis-Pt, C_{60} фулерену або C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу ($M \pm m$, $n=4$). $*p < 0,05$ відносно контрольних мишей-пухлиноносіїв

У групі мишей з карциномою, яким вводили C_{60} фулерен, мітотичний індекс пухлинних клітин був таким же, як і в контрольній групі, але кількість апоптотичних клітин була удвічі більшою, ніж у контрольній групі (Рис. 12.10). За дії C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у порівнянні з іншими експериментальними групами тварин у пухлині значно знижувалася кількість мітотичних та зростала кількість апоптотичних клітин. Так, C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс порівняно з контролем знижував мітотичний індекс пухлинних клітин на 78% і підвищував апоптотичний індекс на 75% (Рис. 10.10).

Зменшення кількості у тканині пухлини мітотичних клітин та збільшення кількості апоптичних клітин, спричинене дією C₆₀-Cis-Pt наноконплексу, може бути одним з механізмів його протипухлинної активності.

Одним з важливих механізмів протипухлинної дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу є регуляція мікрооточення пухлини та/або активація протипухлинної імунної відповіді. Так, в експериментах *in vitro* нами показана здатність C₆₀ фулерену за окремої дії та при комплексації з Cis-Pt викликати прозапальну активацію мононуклеарних фагоцитів [146]. Крім того, комплексування Cis-Pt з C₆₀ фулереном мінімізувало негативний вплив цистостатика на імунну реактивність. Зокрема, C₆₀ фулерен пригнічував Cis-Pt індуковане внутрішньоклітинне продукування АФК і вільних радикалів азоту у фагоцитах периферичної крові людини [457].

Карцинома Льюїс характеризується здатністю метастазувати в легені [256]. Відомо, що процеси пухлиноутворення та метастазування є взаємопов'язаними, і тому наступним завданням було вивчити антиметастатичну дію C₆₀-Cis-Pt наноконплексу.

10.3. Вплив C₆₀-Cis-Pt наноконплексу на метастазування карциноми легені Льюїс у мишей

Антиметастатичну дію C₆₀-Cis-Pt наноконплексу було оцінено за такими показниками, як кількість, розмір і загальний об'єм метастазів у легенях експериментальних тварин через 22-і доби після трансплантації клітин LLC.

Маса легень (0,21±0,10 г), уражених метастазами, мишей з перещепленою карциною Льюїс у контрольній групі тварин була збільшеною на 40% порівняно із масою легень (0,15±0,12 г) у інтактних мишей. Після дії C₆₀ фулерену маса легень була меншою на 17% порівняно з групою контрольних мишей-пухлиносіїв, тоді як цисплатин не впливав на даний показник. У мишей-пухлиносіїв, яким вводили C₆₀-Cis-Pt наноконплекс, даний показник був нижчим порівняно з контрольною групою на 21% (Табл. 10.11) та був наближеним до середнього значення як у інтактних тварин.

Раніше ми показали, що C₆₀ фулерен за дози 7,5 мг/кг виявляв антиметастатичну і протипухлинну активності щодо карциноми легені Льюїс, про що свідчило зменшення розміру пухлини та зниження кількості метастазів у легенях [386]. Крім того, C₆₀ фулерен за удвічі нижчої дози (3,75 мг/кг) також виявляв антиметастатичний ефект, про що свідчило як зниження маси легень (Табл. 10.12), так і зменшення удвічі кількості метастазів та середнього об'єму метастатичного вузла, а також у 3,7 рази - загального об'єму метастазів у легенях мишей-пухлиноносіїв порівняно з контрольною групою (Табл. 10.12).

Таблиця 10.12

Показники метастазування у мишей на 22 добу після перещеплення карциноми легені Льюїс за умови внутрішньочеревного введення цисплатину, C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу (M±m, n=8)

Експериментальні групи мишей-пухлиноносіїв	Середня кількість метастазів на мишу	Загальний об'єм метастазів у легенях (мм ³) на мишу	Середній об'єм поодинокого метастатичного вузла (мм ³)
Контроль	13±4	112±8	8,6±0,6
+ Cis-Pt	12±2	48±3*	4,0±0,3*
+ C ₆₀ фулерен	7±1*	30±2*	4,3±0,3*
+ C ₆₀ -Cis-Pt наноконкомплекс	9±3*.#	28±2*.#	3,1±0,2*.#

Сумарна доза: 3,75 мг/кг C₆₀, 3,75 мг/кг Cis-Pt, 7,5 мг/кг C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс. *p<0,05 відносно показника контрольних мишей-пухлиноносіїв; #p<0,05 відносно показника мишей-пухлиноносіїв, яким вводили цисплатин

Одним з механізмів антиметастатичної дії C₆₀ фулеренів може бути їх негативний вплив на пухлинний неоангіогенез. Відомо, що ріст первинних пухлин і метастазів залежить від розгалужень кровоносних судин, через які новоутворення отримують поживні речовини і кисень [147, 362, 504]. Пухлинно-асоційований ангіогенез характеризується проростанням нових судин всередину пухлини, що є необхідною умовою для росту солідних пухлин та їх метастазування, з часом такий процес стає неконтрольованим [175]. Немодифікований C₆₀ фулерен (100 мкг) на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчат виявляв антиангіогенні ефекти, інгібуючи індукований синтез

фактору росту ендотелію судин (VEGF) і фактору росту фібробластів (FGF2) на 49,6 та 20,2 % відповідно, і не впливаючи на спонтанний ангиогенез [346].

Авторами [247] показано, що фулеренол $C_{60}(OH)_{20}$ у діапазоні низьких доз (0,08-0,4 мг/мл) виявляв протипухлинну і антиметастатичну активність щодо раку молочної залози ЕМТ-6, внаслідок чого знижувалася експресія факторів ангиогенезу в пухлинній тканині та експресія CD-31, припускалося, що інгібування росту пухлини і метастазів відбувається через пригнічення сигнальних шляхів за участі тирозинових кіназ.

Ще одним механізмом антиметастатичних ефектів C_{60} фулеренів може бути їх вплив на метаболічний профіль пухлинно-асоційованих макрофагів (ПАМ). Макрофаги, які накопичуються у пухлинній тканині, характеризуються високим рівнем експресії матриксної металопротеїнази (ММР-9), яка руйнує колагеновий бар'єр та сприяє міграції пухлинних клітин [132]. У такий спосіб ПАМ полегшують метастазування пухлинних клітин та забезпечують проникнення пухлинних клітин до метастатичної ніші. Наночастинки $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ у мишей з раком молочної залози MCF-7 інгібували експресію матриксних металопротеїназ (ММР-9 та ММР-2) у пухлинній тканині та попереджали інвазію пухлинних клітин [330].

Отже, C_{60} фулерен виявляє ефективну антиангіогенну дію, запобігає інвазивності та метастазуванню пухлинних клітин у нормальні тканини, що і пояснює антиметастатичну дію карбонової наноструктури.

У наших дослідженнях за дії цисплатину не зменшувалася кількість метастазів у легнях, однак загальний об'єм метастазів та розміри метастатичних вузлів були удвічі меншими порівняно з контрольними тваринами-пухлиноносіями (Табл. 10.12), що також свідчить про пригнічення процесів метастазування. Найбільш виразні антиметастатичні ефекти спостерігалися після дії C_{60} -Cis-Pt нанокомплексу, про що свідчило зменшення кількості метастазів у легнях, а також їх загального об'єму (у 4 та 1,7 рази) та середнього розміру метастатичних вузлів (у 2,8 та 1,3 рази) порівняно з контролем та окремою дією цисплатину, відповідно.

Отже, C₆₀ фулерен та цисплатин за низької дози 3,75 мг/кг виявляли антиметастатичну дію, яка посилювалася за їх комплексації. Антиметастатична активність C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу виявлена у наших дослідженнях *in vivo* узгоджується з отриманими даними *in vitro* (Розділ 9.2.2) щодо здатності наноконкомплексу гальмувати міграційну активність клітин LLC.

Одним з механізмів посилення протипухлинної та антиметастатичної дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу порівняно з вільним цисплатином за еквівалентної концентрації може бути здатність молекули C₆₀ сприяти проходженню цитостатика крізь плазматичні мембрани та накопичуватися всередині пухлинних клітин. Як відомо з літературних даних, похідні фулерену C₆₀-ПЕГ і C₆₀(ОН)_n накопичуються переважно і довше утримуються у пухлинних, ніж у нормальних тканинах тварин [81, 244, 372, 541]. ¹²⁵I-C₆₀(ОН)_x після внутрішньовенного введення мишам з гепатокарциною H22 накопичувався у тканині пухлини внаслідок посиленої проникності, окрім того, карбонові наночастинки захоплювалися і утримувалися системою мононуклеарних фагоцитів, у тому числі локалізованих у пухлинній тканині [244]. Натомість, кон'югат C₆₀-ser-PromoFluor-633 після внутрішньовенного введення мишам з раком печінки проникав через змінену судинну систему пухлини, уникаючи передчасної утилізації клітинами ретикуло-ендотеліальної системи [413].

Отже, в експериментах *in vivo* показано, що протипухлинний та антиметастатичний ефекти C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу щодо карциноми легені Льюїс є вищими, порівняно з окремою дією цисплатину. Окрім того використання наноконкомплексу дозволило підвищити протипухлинну активність цисплатину за низької дози.

Ріст злоякісного новоутворення супроводжується розвитком симптомного комплексу, пов'язаного з продукцією пухлинними клітинами біологічно активних речовин та порушенням метаболічних процесів у віддалених від локалізації пухлини тканинах і органах [160]. Системна дія пухлини на організм супроводжується, зокрема, кахексією, анемією, астеноїєю, лихоманкою, загальною імунодепресією та розвитком паранеопластичного синдрому [324].

Наступним завданням було з'ясувати чи позначилися протипухлинні та антиметастатичні ефекти C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу на фізіологічному стані мишей-пухлиноносіїв.

10.4. Вплив C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу на фізіологічний стан мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс

Фізіологічний стан мишей-пухлиноносіїв за дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу оцінювали у порівнянні з окремою дією його складових (цисплатином та C₆₀ фулереном) у еквівалентних концентраціях за такими показниками як маса тварин, аналіз крові та вагові індекси лімфатичних органів. Дані показники дозволять оцінити не лише загальний стан організму мишей-пухлиноносіїв, але й ефективність протипухлинної терапії. Як контроль було використано інтактні миші.

10.4.1. Маса тіла мишей з карциномою легені Льюїс за дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу

Важливим показником фізіологічного стану мишей є маса їх тіла, зміна якої є першим індикатором порушень метаболічних процесів в організмі тварини. Маса тіла мишей визначали на момент завершення експерименту після видалення пухлини. Вага мишей, після видалення пухлини, була меншою в усіх експериментальних групах порівняно з інтактними тваринами. Так, маса мишей у контрольній групі пухлиноносіїв була на 38% нижчою порівняно з інтактними мишами (Табл. 10.13). Біологічно активні молекули, що продукуються пухлиною впливають на обмін речовин внаслідок чого може змінюватися маса тварин.

За дії цисплатину вага мишей-пухлиноносіїв знижувалася ще більшою мірою на 44% порівняно з інтактними тваринами та на 9% порівняно з контрольною групою мишей-пухлиноносіїв (Табл. 10.13). Це може бути наслідком токсичної дії цисплатину та інтоксикації при розпаді пухлини на останній стадії.

Маса (г) мишей на 22 день після перещеплення карциноми легені Льюїс за внутрішньочеревного введення цисплатину, C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконплексу (M±m, n=8)

Групи тварин	Загальна маса, г	Маса без пухлини, г
Інтактні миші	22,6±1,9	22,6±1,9
Миші-пухлиноносії (контроль)	21,6±2,0	14,0±1,1§
Миші-пухлиноносії, яким вводили Cis-Pt	18,3±1,3	12,7±0,8§
Миші-пухлиноносії, яким вводили C ₆₀ фулерен	21,4±1,5	15,2±1,0§
Миші-пухлиноносії, яким вводили C ₆₀ -Cis-Pt наноконплекс	21,2±1,5	16,3±1,1§#

§ p<0,05 відносно показника інтактних мишей; # p<0,05 відносно показника мишей-пухлиноносіїв мишей, яким вводили цисплатин

Миші-пухлиноносії, яким вводили C₆₀ фулерен або C₆₀-Cis-Pt наноконплекс мали меншу масу тіла ніж інтактні миші, проте втрата маси тіла знижувалася порівняно з контрольними тваринами-пухлиноносіями (Табл. 10.13). Тварини у цих експериментальних групах мали більшу вагу, ніж у контрольній та Cis-Pt групах. Маса мишей-пухлиноносіїв, яким вводили C₆₀ фулерен була більшою на 9% і 20%, а C₆₀-Cis-Pt наноконплексу - на 16% і 28% відносно показника у контрольній групі мишей-пухлиноносіїв і у групі, яким вводили Cis-Pt відповідно. Отже, що C₆₀-Cis-Pt наноконплекс запобігав зниженню ваги у мишей-пухлиноносіїв.

Зміни в тканинах, які не залученні у пухлинний процес, зокрема, кровотворної системи, можуть також свідчити про загальний фізіологічний стан організму тварин-пухлиноносіїв [141]. Індикатором розвитку патологічного процесу в організмі є зміна показників крові. З використанням показників крові можна прогнозувати перебіг захворювання та ефективність протипухлинного лікування. Крім того, зміни гематологічних показників можуть бути маркерами розвитку гематологічного паранеопластичного синдрому.

10.4.2. Показники крові мишей з карциною легені Льюїс за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу

Результати клінічного аналізу крові мишей, проведеного на 22-гу добу після перещеплення карциноми легені Льюїс представлено в Табл. 10.14.

Таблиця 10.14

Гематологічні показники у мишей з карциною легені Льюїс, яким внутрішньочеревно вводили цисплатин і C₆₀ фулерен окремо, або C₆₀-Cis-Pt наноконплекс (M±m, n=8)

Показники	Групи мишей				
	Інтактні	Пухлино-носії, яким вводили фізіологічний розчин (контроль)	Пухлиноносії, яким вводили C ₆₀ фулерен	Пухлиноносії, яким вводили Cis-Pt	Пухлиноносії, яким вводили C ₆₀ -Cis-Pt наноконплекс
Гемоглобін, г/л	107±11	95±7	108±10	75±8§*	100±6#
Гематокрит, %	38±4	30±3§	31±8	25±4§	31±8
Еритроцити, 10 ¹² /л	9,23±0,9	5,7±0,48§	7,5±1,9*	4,6±1,2§*	6,8±0,8*#
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	7,0±1,2	9,9±0,6§	8,9±1,4§	13,0±2,1§*	9,4±1,3#
Лімфоцити, 10 ⁹ /л	4,0±0,3	2,8±0,1§	3,8±0,2*	1,8±0,1§*	3,0±0,2#
Тромбоцити 10 ⁹ /л	400±21	282±21§	360±39*	320±22§	356±33*

§p<0,05 відносно показника інтактних мишей, *p<0,05 відносно показника контрольних мишей-пухлиноносіїв, #p<0,05 відносно показника мишей-пухлиноносіїв мишей, яким вводили цисплатин

Виявлено, що показники крові у мишей з карциною легені Льюїс суттєво відрізняються від показників крові у інтактних тварин та підтверджують розвиток патологічних процесів в організмі. Зниження вмісту гемоглобіну (на 11%) та гематокриту (на 21%), а також зниження кількості еритроцитів на 38% (еритропенія), лімфоцитів на 30% (лімфоцитопенія) та тромбоцитів на 30% (тромбоцитопенія) на 22-гу добу після перещеплення пухлини порівняно з відповідними показниками у інтактних тварин (Табл. 10.14) свідчили про розвиток анемії у мишей. Про пухлинно-асоційоване

запальне захворювання свідчив лейкоцитоз, кількість лейкоцитів зростала у 1,4 рази. Лейкемоїдна реакція у тварин з карциномою легені Льюїс супроводжувалася значним збільшенням кількості моноцитів [166].

Отримані нами результати гемограми мишей-пухлиноносіїв свідчать про те, що ріст карциноми легені Льюїс супроводжується розвитком анемічного синдрому та системного запалення.

Системна дія пухлини на організм проявляється рядом неспецифічних реакцій різних органів і систем, внаслідок чого розвивається паранеопластичний синдром (ПНС) [33, 160]. Симптоми ПНС можуть виявлятися на рівні ендокринної, імунної, нервової, серцево-судинної, шлунково-кишкової, видільної та кровотворної систем тощо [90, 189, 215, 276].

Клінічними проявами змін кровотворної тканини і системи гемостазу у хворих із злякисними пухлинами “некровотворної” локалізації (так званий гематологічний паранеопластичний синдром (ПНС)) є: анемії, еритроцитози, тромбоцитопенії, еозинофілія, гіперкоагуляційний синдром, гіперлейкоцитоз, тромбоцитоз і плазмоцитоз кісткового мозку [24]. Гематологічні ПНС найчастіше зустрічаються за наявності злякисних пухлин легень, шлунку, кишечника, щитоподібної залози, яєчників, підшлункової і передміхурової залоз. Отже, перещеплена карцинома легені Льюїс у мишей спричиняла розвиток паранеопластичного синдрому, який супроводжувався зниженням маси тіла, анемією, тромбоцитопенією та лейкоцитозом.

Цисплатин за сумарної дози 3,75 мг/кг посилював розвиток анемії у мишей з карциномою легені Льюїс, про що свідчило зниження вмісту гемоглобіну та кількості еритроцитів на 21 та 20% відповідно, а також спостерігалися виражені лімфоцитопенія (зниження кількості лімфоцитів на 36%) та лейкоцитоз (підвищення кількості лейкоцитів на 31%) порівняно з контрольною групою мишей-пухлиноносіїв (Табл. 10.14).

Характерною ознакою побічної дії цисплатину є гематоксичність [305, 322, 361, 488, 508], яка супроводжується змінами показників крові та розвитком анемічних станів як у інтактних тварин, так і у пухлиноносіїв. З метою попередження анемічних станів під час і після хіміотерапії у лікарській

практиці широкого застосування набули вітаміни, білогічно-активні речовини, антиоксиданти тощо. Побічну дію хіміотерапії, зокрема, цисплатин-індуковану анемію у тварин-пухлиноносіїв, запобігали комбінованим лікуванням з такими антиоксидантами, як селен Se та аскорбінова кислота [305, 322]. Припускається, що Cis-Pt-індукована токсичність у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс може бути знижена за рахунок комплексації цитостатика з C₆₀ фулереном.

Потужні антиоксидантні властивості немодифікованого C₆₀ фулерену підтверджено у експериментах *in vitro* та *in vivo* [176, 191, 203, 393, 492]. Раніше ми показали, що C₆₀ фулерен захищав тимоцити від ушкоджувальної дії 100 мкМ пероксиду водню та Cis-Pt (3,3 і 16,7 мкМ). У клітин оброблених 10 мкМ C₆₀ фулереном знижувався рівень АФК, індукований H₂O₂ або Cis-Pt в тимоцитах, а також попереджався гемоліз еритроцитів, індукований Cis-Pt (Розділ 4.1.2) [176, 203, 392]. Крім того, було показано, що C₆₀ фулерен запобігав доксорубіцин-залежному окисному ушкодженню печінки та серця у мишей з LLC [393].

C₆₀ фулерен (3,75 мг/кг) запобігав розвитку анемії у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс, про що свідчило підвищення вмісту гемоглобіну (на 11%), кількості еритроцитів (на 31%), лімфоцитів (на 35%) і тромбоцитів (на 29%) порівняно з відповідними показниками у контрольних мишей-пухлиноносіїв, які були наближеними до показників у інтактних тварин (Табл. 10.14).

C₆₀-Cis-Pt наноконплекс знижував гематотоксичність у мишей-пухлиноносіїв спричинену ростом пухлини та токсичною дією цитостатика. Після дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу показники крові у мишей з карциномою легені Льюїс нормалізувалися. Так, вміст гемоглобіну підвищувався до 100 г/л, а виражені показники еритропенії, тромбоцитопенії та лейкоцитозу знижувалися порівняно з показниками крові у контрольній групі тварин-пухлиноносіїв та у групі тварин-пухлиноносіїв, яким вводили Cis-Pt (Табл. 10.14).

Отже, C₆₀ фулерен як окремо, так і при комплексації із цисплатином запобігав розвитку пухлинно- та цисплатин-індукованої анемії, зниженню маси тіла у мишей з карциномою легені Льюїс, а також подовжував їх тривалість життя, що також свідчить про його терапевтичний ефект. Припускається, що C₆₀ фулерен знижує гематотоксичність цисплатину саме за рахунок своїх антиоксидантних властивостей. Оскільки антиоксидантні властивості C₆₀ фулеренів відіграють важливу роль при їх біологічному застосуванні та обумовлені здатністю молекули C₆₀ вловлювати вільні радикали, тому не виключено їх використання як захисних та терапевтичних агентів при багатьох захворювань, а також з метою профілактики побічних ефектів, викликаних хіміопрепаратами.

Дані про покращення фізіологічного стану мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс після введення C₆₀-Cis-Pt наноконплексу узгоджуються з виявленими протипухлинним та антиметастатичним ефектами *in vivo*, згідно яких C₆₀-Cis-Pt наноконплекс значно гальмував ріст карциноми та її метастазування в легені порівняно з окремою дією циплатину.

Важливу роль у контролі та регуляції пухлинного процесу відіграє імунна система. Генералізована реакція імунної системи на пухлинний ріст проявляється зміною вагових показників лімфатичних органів. Крім того, мішенями цитотоксичної дії хіміопрепаратів є не лише пухлинні клітини, а й клітини імунної системи, яким властива висока проліферативна активність [29-30, 280]. Одним з наслідків впливу хіміотерапевтичних препаратів на життєздатність та проліферативний потенціал імуноцитів також є зміна вагових показників лімфатичних органів.

Тому наступним завданням було оцінити стан імунної системи мишей з карциномою легені Льюїс після дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу за ваговим індексом лімфоїдних органів.

10.4.3. Вагові індекси селезінки і тимусу мишей з карциномою легені Льюїс за дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу

Тимус та селезінка відіграють важливу роль у протипухлинному імунному захисті [13, 307]. Вагові показники селезінки і тимусу (відношення маси органу до загальної маси тварини, г) у мишей оцінювали на 22-гу добу після перещеплення пухлини [269]. Отримані результати представлено у табл. 10.15.

Таблиця 10.15

Загальна маса лімфоїдних органів (г) та вагові індекси тимусу і селезінки у мишей з карциномою легені Льюїс після внутрішньочеревного введення цисплатину, C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt наноконплексу (M±m, n=8)

Групи тварин	Загальна маса селезінки, г	Індекс селезінки	Загальна маса тимусу, г	Індекс тимусу
Інтактні миші	0,091±0,007	4,0±0,1	0,038±0,003	1,68±0,20
Миші-пухлиноносії (контроль)	0,155±0,010 [§]	7,18±0,40 [§]	0,039±0,004	1,81±0,23
Миші-пухлиноносії, яким вводили Cis-Pt	0,112±0,009 ^{§*}	6,12±0,30 ^{§*}	0,028±0,002 [*]	1,53±0,21 [*]
Миші-пухлиноносії, яким вводили C ₆₀	0,111±0,009 ^{§*}	5,19±0,20 ^{§*}	0,011±0,001 ^{§*}	0,514±0,014 ^{§*}
Миші-пухлиноносії, яким вводили C ₆₀ -Cis-Pt наноконплек	0,117±0,008 ^{§*}	5,52±0,20 ^{§*}	0,020±0,001 [*]	0,94±0,08 ^{§*}

[§]p<0,05 відносно показника інтактних мишей; ^{*}p<0,05 відносно показника контрольних мишей-пухлиноносіїв

Порівняльний аналіз вагових показників лімфоїдних органів показав збільшення маси селезінки у тварин з пухлиною, тоді як маса їх тимусу відповідала значенням інтактних тварин (Табл. 10.15). Відомо, що ріст карциноми легені Льюїс супроводжується розвитком помірної спленомегалії та проявом гематологічного паранеопластичного синдрому [166], внаслідок чого може зростати і ваговий індекс селезінки у мишей-пухлиноносіїв.

Маса селезінки і її ваговий індекс у мишей-пухлиноносіїв, яким вводили цисплатин, C₆₀ фулерен та C₆₀-Cis-Pt наноконплексу були більшими порівняно з інтактними тваринами, однак меншими відносно контрольної групи тварин з пухлинами. Реакція селезінки у мишей-пухлиноносіїв за дії цисплатину, C₆₀ фулерену та наноконплексу проявлялася зменшенням загальної маси органу (у

1,38, 1,4 та 1,3 рази відповідно) та її вагового індексу (1,17, 1,38 та 1,3 рази відповідно) порівняно з контрольними мишами-пухлиносіями. Однією з причин такого результату може бути гальмування екстрамедулярного гемопоезу з одночасною нормалізацією медулярного кровотворення.

За результатами досліджень у мишей з карциномою легені Льюїс за дії цисплатину, C_{60} фулерену та C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу вагові показники тимусу знижувалися як відносно інтактних тварин, так і контрольних пухлиноносіїв (Табл. 10.15). Так, ваговий індекс тимусу за дії цисплатину, C_{60} фулерену та C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у мишей-пухлиноносіїв знижувався у 1,18, 3,52 та 1,92 рази відносно контрольних мишей з пухлиною.

Отже, у мишей з карциномою легені Льюїс на тлі спленомегалії розвивалася атрофія тимусу, що узгоджується із даним інших дослідників, які продемонстрували, що за рахунок високого рівня циркулюючого ендотеліального фактору росту судин (VEGF) відбувається прогресивна дегенерація/інволюція тимусу у тварин-пухлиноносіїв шляхом пригнічення постійного оновлення пулу клітин-попередників з кісткового мозку [360, 479]. Тимус регулює як клітинний, так і гуморальний імунітет експортуючи на периферію ефекторні та регуляторні клітини. Тому, виявлені зниження вагових показників тимусу за дії цисплатину та C_{60} фулерену, як окремо, так і за їх комплексації у мишей з пухлиною можуть бути результатом посилення транслокації тимоцитів з органу на периферію, а також внаслідок активації Т-клітинних реакцій протипухлинної імунної відповіді.

За дії C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у мишей з карциномою легені Льюїс спостерігалася тенденція до нормалізації маси селезінки та тимусу порівняно з контрольними мишами-пухлиносіями. Припускається, що C_{60} фулерен індукує клітинно-опосередковану імунну відповідь, яка може бути однією з потенційних причин зменшення ваги лімфоїдних органів. C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс виявляв протипухлинну активність щодо карциноми легені Льюїс, тому не виключено, що механізм виявленої дії залежав не тільки від антиоксидантних властивостей молекул C_{60} , але й від імунномодулюючих. Раніше ми показали, що C_{60} фулерен не впливав на життєздатність лімфоцитів

селезінки та перитонеальних макрофагів [389], однак посилював їх цитотоксичну активність щодо клітин LLC [146, 399]. Автори [170] також не виявили впливу C₆₀ фулерен на активність макрофагів J774 мишей та моноцитів периферійної крові людини.

Існує низка літературних даних про імунологічні властивості C₆₀ фулерену та його похідних у експериментах *in vitro* та *in vivo*. Так, після імунізації мишей C₆₀ фулереном кон'югованим з тиреоглобуліном отримано популяцію фулерен-специфічних антитіл ізотипу IgG [118], крім того, фулерени регулювали секрецію цитокінів [83, 170, 482, 505-506] і пригнічували запальні та алергічній реакції [425].

Імунномодулюючу активність C₆₀ фулерену при пухлинному процесі продемонстровано у роботі [541]. Так, C₆₀(OH)_x пригнічував ріст перещепленої мишам H22 гепатокарциноми і інфільтрацію у сусідню нормальну м'язову тканину, а також підвищував вроджений імунітет мишей-пухлиноносіїв посилюючи фагоцитоз перитонеальних макрофагів і активність аргінази та кислотної фосфатази *in vivo*, продукцію α-TNF у макрофагів *in vitro*. Отже, C₆₀ стимулює клітинну імунну систему, пригнічуючи розвиток новоутворень та активує протипухлинний захист.

Оцінка результатів власних досліджень у сукупності з аналізом літературних даних дозволяють припустити, що характер модулюючого впливу C₆₀ фулерену та його комплексів з протипухлинними препаратами, зокрема з цисплатином, на імунну реактивність тварин з пухлинами залежить від біологічних характеристик пухлини та вихідного стану імунної системи.

Висновки до РОЗДІЛУ 10:

1. Токсичні ефекти C₆₀ фулерену за внутрішньочеревного введення спостерігалися за доз 300 мг/кг і більше, цисплатину – за дози 15 мг/кг та C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу (1:1) - за дози 22,5+22,5 мг/кг, які супроводжувалися порушенням поведінкових реакцій мишей, гематотоксичністю і патоморфологічними змінами в тканинах селезінки, печінки і нирок. Показник LD₅₀ для C₆₀ фулерену становив 721 мг/кг. Токсичність цисплатину (LD₅₀=15,6

мг/кг) за внутрішньочеревного введення при комплексації із C₆₀ фулереном (LD₅₀=36,1 мг/кг) удвічі знижувалася.

2. При внутрішньочеревному введенні C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу (сумарна доза 7,5 мг/кг) мишам з перещепленою карциномою легені Льюїс посилювалися протипухлинний та антиметастатичний ефект цисплатину. На 22 добу експерименту, у мишей, які отримували наноконкомплекс, порівняно з дією цисплатину були меншими об'єм (у 1,4 рази) і маса (у 1,2 рази) пухлини, у тканині карциноми удвічі зменшувалася кількість мітотичних клітин та збільшувалася кількість апоптотичних клітин, зменшувалися кількість (на 25%) та розмір (на 23%) метастазів у легенях мишей-пухлиноносіїв. За дії наноконкомплексу подовжувалася тривалість життя мишей з карциномою легені Льюїс (на 32% порівняно з контрольною групою мишей-пухлиноносіїв).

3. C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс запобігав пухлинноасоційованим та цисплатин-індукованим зниженню маси тіла та гематотоксичності у мишей з карциномою легені Льюїс. Маса мишей-пухлиноносіїв, яким вводили наноконкомплекс була на 16% більшою порівняно з контрольними мишами-пухлиноносіями. Показники крові у мишей-пухлиноносіїв, які отримували наноконкомплекс були кращими порівняно з тими, що отримували цисплатин - зростав вміст гемоглобіну (до 100 г/л), кількість еритроцитів (до $6,8 \pm 0,8 \times 10^{12}/л$) та лімфоцитів (до $3,0 \pm 0,2 \times 10^9/л$), а також знижувалася кількість лейкоцитів (до $9,4 \pm 1,3 \times 10^9/л$).

4. За дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу нормалізувалися вагові показники лімфоїдних органів селезінки та тимусу – загальна маса органів була нижчою у 1,3 та 2 рази відповідно порівняно з контрольними мишами-пухлиноносіями.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [146, 386, 387, 389, 391, 393, 396, 397, 399].

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні актуальним є розробка технологій застосування наноматеріалів з метою цілеспрямованої доставки ліків, а також модифікації терапевтичної ефективності протипухлинних препаратів. Застосування протипухлинних препаратів є обмеженим внаслідок низької селективності, розвитком у пухлинних клітин стійкості до лікарських препаратів, високої токсичності щодо органів і тканин, не уражених пухлиною [171-172]. Для оптимізації протипухлинної терапії пропонується використання цитостатиків у комбінації або у комплексі зі наночастинками, які, з одного боку, виявляють біологічну активність та здатні модифікувати регуляторні сигнали у злоякісно трансформованих клітинах, а з іншого - не є токсичними для нормальних клітин [14, 294].

Серед таких наночастинок у цьому напрямку перспективним є представник карбонових наноструктур C_{60} фулерен. Наявність π -кон'югованої системи подвійних зв'язків на поверхні молекули C_{60} зумовлює подвійний характер його біологічних ефектів: у незбудженому стані виявляти антиоксидантні, а за умови фотоактивації – прооксидантні властивості [11, 345, 364]. Крім того, наноструктура здатна утворювати комплекси з хіміопрепаратами [14], що може бути використано для оптимізації їх дії. Такі властивості немодифікованого C_{60} фулерену можуть бути використані для посилення ефективності протипухлинних препаратів, зокрема цисплатину як у складі комплексу із C_{60} фулереном, так і за комбінованої дії з фотоактивованим C_{60} фулереном.

У роботі досліджено біологічну активність C_{60} фулерену *in vitro* та *in vivo*, ефективність комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину у різних за чутливістю до препарату лейкемічних клітинах, створено нанокomплекс C_{60} фулерену з цисплатином (C_{60} -Cis-Pt) та оцінено його

протипухлинну дію *in vitro* та *in vivo* порівняно з окремою дією хіміопрепарату. Об'єктом дослідження було обрано нормальні клітини – тимоцити, еритроцити і клітини ембріональної нирки людини лінії HEK293 та злоякісні клітини різного гістогенезу – клітини Jurkat гострої Т-лейкемії людини, клітини CCRF-CEM гострої лімфобластної лейкемії людини, клітини HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії людини, клітини L1210 лімфоцитарної лейкемії миші, клітини HeLa і KB-3-1 карциноми шийки матки людини, клітини LLC карциноми легені Льюїс миші та сублінії злоякісних клітин резистентних до цисплатину L1210/Cis-Pt, до вінкристину HL-60/vinc, до адріаміцину HL-60/adr і колхіцину KBC-1. Як модель пухлинного росту *in vivo* було використано трансплантовану карциному легені Льюїс.

Молекула C_{60} характеризується гідрофобними властивостями, завдяки чому виявляє спорідненість до ліпідних компонентів мембран, взаємодія з якими може зумовлювати біологічну дію фулеренів. Тому на першому етапі роботи було досліджено мембранотропні властивості C_{60} фулерену, які вивчали на штучних мембранах та на рівні клітин з використанням флуоресцентно міченої наноструктури. Показано, що мічений C_{60} фулерен флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом (C_{60} -FITC) взаємодіє зі штучним ліпідним бішаром та локалізувався у гідрофобних ділянках його матриксу.

За допомогою флуоресцентної мікроскопії показано проникнення міченого C_{60} фулерену (1-[3-(5-метил-2-(піридин-2-їл)-1,3-тіазол-4-оксикарбоніл)пропіл]-1-фенил-[6.6] C_{61}) крізь плазматичну мембрану та його локалізацію через 6 год у цитоплазмі клітин HEK293. Конфокальна мікроскопія підтвердила накопичення C_{60} фулерену флуоресцентно міченого родаміном В-ізотіоціанатом (C_{60} -RITC) у клітинах L1210 лейкемії впродовж 18 год інкубації, а з використанням FITC-мічених антитіл до молекул C_{60} , мітохондрійного барвника MitoTracker Orange та ядерного барвника DAPI виявлено локалізацію наноструктури через 24 год у мітохондріях клітин CCRF-CEM лейкемії.

Підтвердженням продемонстрованої нами внутрішньоклітинної локалізації C_{60} фулерену у лейкемічних клітинах є низка літературних даних щодо поглинання немодифікованого фулерену злоякісними клітинами. Так,

методом конфокальної мікроскопії виявлено цитозольну локалізацію C_{60} фулерену у клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 [288], гепатоми RH-35 [291], гострої лейкемії Jurkat [411], у перенуклеарній ділянці клітин фібросаркоми HT1080 [81] та у ядрі клітин Hep3B і Huh7 раку печінки [413]. З використанням міченого 5-амінофлуоресцеїном C_{60} фулерену продемонстровано його локалізацію у цитоплазмі клітин K562S та на мембрані клітин K562R лейкемії людини [514].

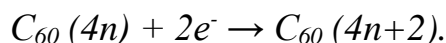
Проникнення молекул C_{60} у клітину відбувається без механічного пошкодження мембран. Припускають, що механізмами внутрішньоклітинного проникнення фулеренів є пасивний транспорт через канали чи пори [405], активний транспорт за допомогою клатрин-залежного [174, 291], або кавеол-опосередкованого [293, 424] ендоцитозу, а також фагоцитозу [81].

Біологічні ефекти C_{60} фулерену можуть виявлятися не лише на мембранному рівні, але у внутрішньоклітинному середовищі. Нами показано, що 10 мкМ C_{60} фулерен не спричиняв цитотоксичних та гемолітичних ефектів – не впливав на виживаність нормальних і злоякісних клітин та на стійкість еритроцитів до гемолізу. Виявлено вибіркковість дії 10 мкМ C_{60} фулерену на активність АО ензимів, який не впливав на супероксиддисмутазу, глутатіонпероксидазу та глутатіонтрансферазну активність тимоцитів, однак спричиняв зміни у активності компонентів АОС клітин лейкемії L1210 і Jurkat – знижувалася активність СОД та зростала активність ГТ.

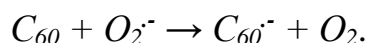
Наступним етапом було дослідити захисні ефекти C_{60} фулерену як сполуки з антиоксидантним потенціалом від ушкоджувальної дії пероксиду водню та цисплатину як індукторів окисного стресу та апоптогенних чинників на нормальні клітини. Показано, що 100 мкМ пероксид водню і 3,3 мкМ Cis-Pt посилювали продукування АФК у тимоцитах. У разі дії H_2O_2 та Cis-Pt на оброблені 10 мкМ C_{60} фулереном тимоцити швидкість генерації АФК пригнічувалась. C_{60} фулерен також запобігав H_2O_2 -індукованому зниженню життєздатності тимоцитів та Cis-Pt-індукованому гемолізу еритроцитів. C_{60} фулерен завдяки мембранотропним та антиоксидантним властивостям здатен

захищати нормальні клітини від ушкоджувального впливу пероксиду водню та цисплатину.

Механізмом антиоксидантної дії C_{60} фулерену є здатність приєднувати електрони по подвійним електродефіцитним зв'язкам на поверхні та переходити із нестабільної $(4n)$ у стабільну $(4n+2)$ ароматичну систему:



Молекула C_{60} може безпосередньо взаємодіяти з супероксидним аніон-радикалом через систему кон'югованих подвійних π -зв'язків на поверхні з утворенням радикала C_{60}^- або шляхом каталітичної дисмутації супероксиданіону на поверхні наночастинки:



Так, мономалоніл-похідне C_{60} розглядають як міметик СОД, який може бути використаний для зниження експресії цього індукцибельного ензиму у пухлинних клітинах [71].

Ефективне використання цисплатину у протипухлинній терапії обмежується розвитком стійкості до дії цитостатику у злякисних клітин. Одним з молекулярних механізмів розвитку стійкості до ліків у пухлинних клітин є інгібування входження та активація виведення цисплатину [101]. Виведення протипухлинних препаратів з пухлинних клітин регулюється АТФ-залежними мембранними АВС транспортерами, зокрема, Р-глікопротеїнами та MRP1 [129, 286], надекспресія цих білків вважається головною причиною розвитку стійкості до ліків [287].

Отримані нами результати молекулярного докінгу та розраховані енергетичні параметри підтверджують взаємодію молекул C_{60} з білками АВС-транспортерами плазматичної мембрани - Р-глікопротеїном, MRP-1 і MRP-2, яка супроводжується їх конформаційними змінами. Отже, C_{60} фулерен є модифікатором токсичної дії хіміопрепаратів у злякисних клітинах та їх резистентного стану.

Одним із механізмів токсичної дії акумульованого злякисними клітинами цисплатину є індукція апоптозу, яка реалізується не лише через вплив на ДНК, але й на позаядерні мішені (ПМ, мітохондрії). Припускають, що одним з

підходів до підвищення токсичності цисплатину у злоякісно трансформованих клітинах, зокрема, лейкемічних, та подолання резистентності до цитостатика є комбінація агентів, спрямованих на різні мішені та з різними механізмами дії.

Наступним завданням було дослідити фототоксичну дію C_{60} фулерену за комбінації з цисплатином у низькій 3,3 мкМ концентрації на чутливі L1210 та резистентні до цисплатину L1210/Cis-Pt клітини лейкемії.

C_{60} фулерен у разі його фотоактивації світлом у діапазоні ближнього ультрафіолету та видимого спектра продукує токсичні АФК [203, 345], а фототоксична дія C_{60} фулерену у лейкемічних клітинах реалізується через індукцію апоптозу, що підтверджено падінням мітохондрійного потенціалу, виходом цитохрому *c* з мітохондрій у цитозоль, активацією каспази-3 і p38 MAP кінрази та міжнуклеосомною фрагментацією ДНК [47, 390]. Фотосенсибілізуючі властивості молекули C_{60} можуть бути використані для розробки підходів у фотодинамічній терапії пухлин.

Фотозбуджений C_{60} фулерен у видимому діапазоні спектра (410-700 нм) спричиняв токсичну дію не лише на чутливі, але й резистентні до цисплатину клітини L1210. Так, через 72 год інкубації відсоток життєздатних клітин L1210 та L1210/Cis-Pt становив 58 ± 3 % та 54 ± 4 % відповідно.

Фототоксичний ефект C_{60} фулерену на лейкемічні клітини було виявлено у роботах інших дослідників. Показано, що опромінення УФ світлом оброблених трис-малоніл- C_{60} клітин Jurkat лейкемії людини спричиняло їх загибель [412]. За умови фотоактивації похідного C_{60} -гекса-аддукта фулерена-біс-пірофеофорбіда видимим світлом (688 нм, потужність 400 мДж/см²) виживаність клітин Jurkat знижувалася на 58% порівняно з контролем [231].

Цисплатин у низькій 3,3 мкМ концентрації спричиняв часозалежне зниження життєздатності клітин L1210, однак не впливав на життєздатність резистентних клітин L1210/Cis-Pt.

У разі комбінованої дії фотозбудженого 10 мкМ C_{60} фулерену та 3,3 мкМ цисплатину спостерігався синергічний токсичний ефект чинників. Важливим є те, що за комбінованої дії чинників на резистентні клітини L1210/Cis-Pt лейкемії відновлювалася їх чутливість до низької концентрації цитостатику.

Так, через 72 год після комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину відсоток життєздатних клітин L1210/Cis-Pt становив лише 35±3 %.

Для підтвердження того, що виявлені зміни можуть бути спричинені індукцією оксидативного стресу, було оцінено продукування АФК у клітинах L1210 та L1210/Cis-Pt через 3 год після комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину. Фотозбуджений C₆₀ фулерен посилював продукування АФК не лише у чутливих, але й у резистентних до цитостатику клітинах лейкемії, флуоресценція зонда DCF зростала у 3,4 та 2,3 рази порівняно з контролем. Рівень АФК у лейкемічних клітинах за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину був за величиною вищим порівняно з окремою дією як цисплатину, так і фотозбудженого C₆₀ фулерену.

Припускаємо, що адитивне посилення токсичної дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину на лейкемічні клітини може бути зумовлене їх впливом на спільні АФК-чутливі мішені у складі залучених до апоптозу сигнальних шляхів. Цисплатин, або через утворення аддуктів з мітохондріальною ДНК [94, 172, 314], або через зміни у активності НАДФН-оксидаз ЕПР та ПМ [239, 259] спричиняє посилення продукування АФК. C₆₀ фулерен після фотозбудження також здатен продукувати АФК, шляхом перенесення електронів від донора на молекулярний кисень [11, 518]. Оскільки у зляккісно трансформованих клітинах через дефектну роботу ЕТЛ мітохондрій кисень знаходиться у надлишку [79], то фотозбудження поглинутого клітинами L1210 лейкемії C₆₀ фулерену призводить до значного продукування АФК.

Ранні механізми виявленої активації за дії чинників оцінювали за концентрацією вільного цитозольного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$), як інтегральний показник кальцієвого гомеостазу у лейкемічних клітин після комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину.

З використанням кальцій-чутливого зонду індо-1 нами було показано, що через 3 год після комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину величина $[Ca^{2+}]_i$ підвищувалась до мікромольного рівня, перевищуючи показники за окремої дії досліджуваних чинників та досягаючи 1445±44 нМ та 830±43 нМ у клітинах L1210 та L1210/Cis-Pt відповідно.

Результати про інтенсифікацію продукування АФК у клітинах L1210 та L1210/Cis-Pt після комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину дозволяють зробити декілька важливих висновків. По-перше, оскільки флуоресценція зонду DCF реєструється за умови його розщеплення внутрішньоклітинними естеразами [194], отримані нами дані є свідченням того, що C₆₀ фулерен, не зважаючи на підвищену активність АВС-транспортів у резистентних клітинах, проникає та накопичується у внутрішньоклітинному просторі клітин L1210/Cis-Pt. По-друге, отримані дані свідчать на користь того, що збільшення [Ca²⁺]_i внаслідок фотозбудження поглинутого клітинами C₆₀ опосередковані посиленням продукуванням АФК.

Структурно-функціональний стан мітохондрій лейкемічних клітин за дії досліджуваних чинників було оцінено за відносною величиною мітохондрійного потенціалу. Відносна величина мітохондрійного потенціалу у резистентних до цисплатину клітинах L1210/Cis-Pt виявилась нижчою, ніж у чутливих клітинах L1210. Ці дані узгоджуються з літературними щодо порушень у роботі ЕТЛ мітохондрій у резистентних до протипухлинних препаратів зляккісно трансформованих клітинах. У роботах на резистентних до цисплатину клітинах L1210 лейкемії показано, що зниження величини мембранного потенціалу мітохондрій пов'язане з надмірною експресією UCP2 протеїну [338].

За дії цисплатину у чутливих клітинах L1210 спостерігалось зниження величини мітохондрійного потенціалу у 2 рази порівняно з контролем. Преінкубація клітин L1210 з C₆₀ фулереном призводила до незначного, але достовірного зниження величини мембранного потенціалу мітохондрій, що, очевидно, пояснюється здатністю наноструктури взаємодіяти з мембранами органели. Так, з використанням флуоресцентно мічених моноклональних антитіл до C₆₀ фулерену виявлено переважну локалізацію наноструктури C₆₀ у мітохондріях клітин CCRF-CEM лейкемії [198] та клітинах COS-7 нирок мавпи [174]. У роботі [427] за допомогою комп'ютерного моделювання продемонстровано, що фулерен C₆₀, може проникати у міжмембранний простір

мітохондрій та локалізуватися на зовнішній стороні внутрішньої мембрани завдяки негативно зарядженій гідратованій поверхні структури.

За комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину спостерігалось найбільше падіння мітохондрійного потенціалу у чутливих і резистентних клітинах лейкемії - відносна величина показника у клітинах L1210 та L1210/Cis-Pt була у 3,2 та 3,5 рази меншою за контроль відповідно. Такі зміни можуть пояснюватись впливом АФК, що продукуються як фотозбудженим C_{60} [42, 345], так і цисплатином [474], на функціонування мітохондрій.

На нашу думку, одним з можливих наслідків значного зростання $[Ca^{2+}]_i$, може бути акумуляція надлишку катіону мітохондріями. Беручи до уваги, що через 3 год після дії досліджуваних чинників було відмічено значне посилення продукування АФК, зростання $[Ca^{2+}]_i$ до мікромолярного рівня та дисипацію мітохондрійного мембранного потенціалу, ми припускаємо, що мітохондрії втрачають здатність до утримання катіону.

Для дослідження пролонгованої цитотоксичної комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину було оцінено розподіл лейкемічних клітин за фазами клітинного циклу. За комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину на чутливі клітини L1210 спостерігався адитивний ефект чинників – індуковане цисплатином накопичення клітин у G2/M фазі та індуковане фотозбудженим C_{60} збільшення кількості клітин у SubG1 фазі. У резистентних клітинах L1210/Cis-Pt за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину спостерігалось значне накопичення клітин у SubG1 фазі, яке за величиною перевищувало показник за дії фотозбудженого C_{60} фулерену. Накопичення клітин у проапоптичній SubG1 фазі свідчить про те, що токсична комбінована дія фотозбудженого C_{60} фулерену з цисплатином пов'язана з активацією сигнальних шляхів апоптичної загибелі клітин.

Отже, продемонстровано можливість посилення токсичної дії цисплатину за комбінації з фотозбудженим C_{60} у клітинах лейкемії. Дослідження механізмів комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину на лейкемічні клітини показало значне посилення продукування АФК, зростання концентрації Ca^{2+} ,

падіння мітохондрійного потенціалу та накопичення клітин у SubG1 фазі, ніж за окремої дії чинників. На нашу думку, адитивне посилення токсичної дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину на клітини L1210 може бути зумовлене їх впливом на спільні АФК-чутливі мішені у складі залучених до апоптозу сигнальних шляхів. Механізми такого посилення у чутливих та резистентних до препарату лейкемічних клітинах можуть відрізнятися за послідовністю подій та мішенями впливу.

Оцінка довготривалих ефектів комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину у резистентних до протипухлинного препарату лейкемічних клітинах вказує на домінуючу роль фотозбудженого C₆₀ у активації шляхів їх загибелі. Відновлення чутливості резистентних до цисплатину клітин L1210 за умови його комбінації з фотозбудженим C₆₀ вказує на мультитаргетний вплив карбонової наноструктури, зокрема, на системи, що забезпечують стійкість злоякісних клітин до дії протипухлинних препаратів.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що початковим етапом у послідовності біохімічних подій, які призводять до загибелі резистентних клітин за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину, є вплив утворених АФК фотозбудженим C₆₀ на компоненти систем, що контролюють надходження та накопичення препарату у резистентних до цисплатину клітинах L1210 лейкемії.

Наше припущення узгоджується з гіпотезою так званого «подвійного удару» [105]. Згідно даної гіпотези, поєднання двох факторів, зокрема фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину, спричиняє ще більшу генерацію АФК, підвищення концентрації Ca²⁺ у матриксі мітохондрій, дисипацію мітохондріального потенціалу та вивільнення у цитозоль проапоптичних факторів загибелі клітини.

Отже, завдяки комбінованому застосуванню фотозбудженого C₆₀ фулерену і цисплатину вдалося посилити та відновити токсичний ефект протипухлинного препарату у низькій концентрації щодо чутливих та резистентних до цитостатику клітин L1210 лейкемії, відповідно. Комбінована цитотоксична дія фотозбудженого C₆₀ фулерену і цисплатину має адитивний

характер і реалізується внаслідок активації проапоптичних шляхів. Посилення чутливості до цисплатину резистентних до цитостатику лейкемічних клітин після фотозбудження акумульованого C_{60} фулерену вказує на мультитаргентну дію АФК, що продукуються фотозбудженим C_{60} фулереном, та ушкоджувальний вплив на АФК-чутливі компоненти систем, що контролюють виведення протипухлинного препарату із злоякісних клітин, наслідком чого може бути утримання протипухлинного препарату у внутрішньоклітинному просторі та реалізація позаядерних механізмів його дії у резистентних до цитостатика злоякісних клітинах.

Отримані дані свідчать про перспективність застосування C_{60} фулерену для фотодинамічної терапії пухлин та для розробки підходів подолання резистентності злоякісних клітин до дії цитостатиків (Рис. 11.1).

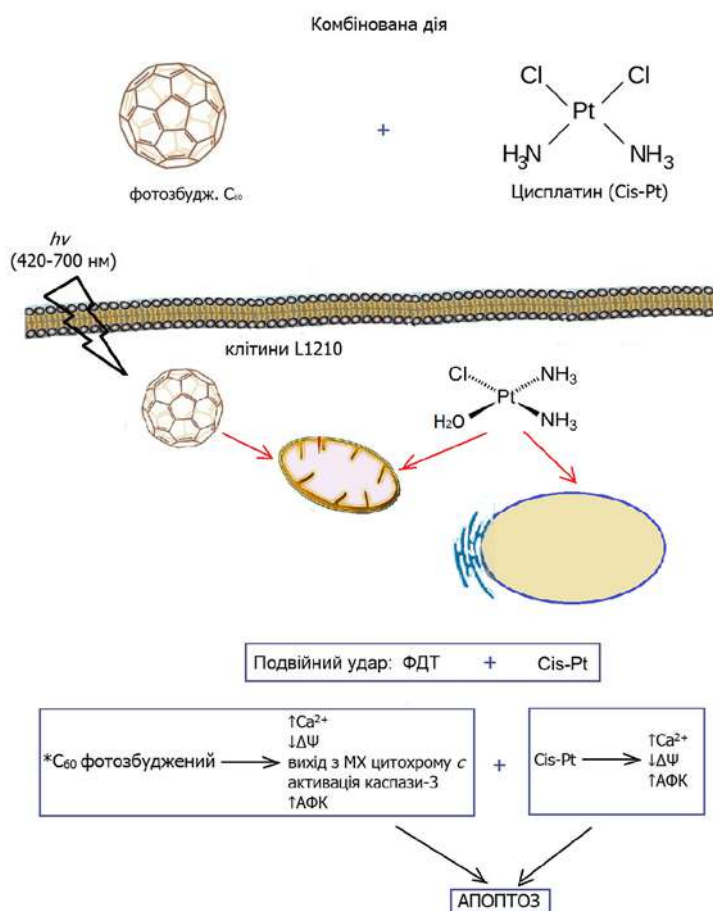
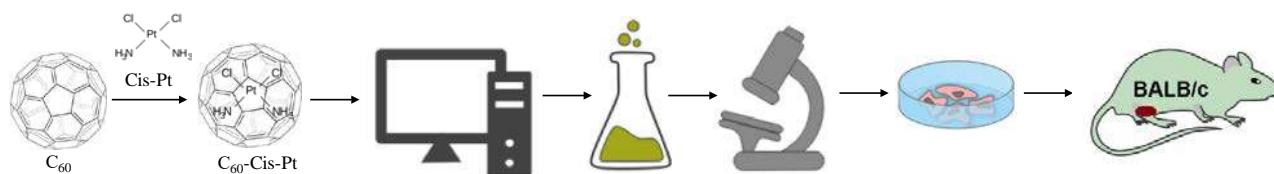


Рис. 11.1. Механізми комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину на злоякісні клітини

Ще одним підходом до посилення дії протипухлинних препаратів є створення їх комплексів з C_{60} фулереном. Розробка і створення нековалентного наноконкомплексу цисплатину із C_{60} фулереном включала такі послідовні етапи:



- (1) Комп'ютерне моделювання нековалентного C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу.
- (2) Швидке та низьковартісне приготування водного розчину C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу.
- (3) Аналіз стабільності розчину C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу фізико-хімічними методами (ДРС, СТМ, АСМ, визначення дзета-потенціалу).
- (4) Оцінка цитотоксичної активності цисплатину та C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу.
- (5) Оцінка протипухлинної активності цисплатину та C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс.

Згідно даних молекулярного моделювання нековалентний наноконкомплекс C_{60} -Cis-Pt у співвідношенні молекул 1:1 є найпростішою структурою, хоча не виключено адсорбцію і більш ніж однієї молекули Cis-Pt на поверхні фулеренового кластера (~15 молекул). Утворений C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс стабілізується нековалентними взаємодіями - як електростатичними між адсорбованою молекулою Cis-Pt на поверхні молекул C_{60} , що несе частковий від'ємний заряд, так і гідрофобними, які є домінуючими.

Нами була запропонована методика створення нековалентного наноконкомплексу C_{60} фулерену з цисплатином (C_{60} -Cis-Pt). Метод ґрунтується на обробці ультразвуком (22 кГц, 20 хв) суміші водного колоїдного розчину C_{60} фулерену та сольового розчину Cis-Pt у еквівалентній концентрації з подальшим тривалим перемішуванням на магнітній мішалці (400 об/хв, 18 год).

Утворення C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу підтверджено результатами динамічного розсіювання світла (ДРС), атомно-силової мікроскопії (АСМ), сканувально тунельної мікроскопії (СТМ) та мало-кутового рентгенівського розсіювання (МКРР). Порівняльний аналіз розміру поодиноких молекул C_{60} і Cis-Pt показав, що при їх комплексації розмір наночастинок збільшується. Так,

згідно СТМ знімків розмір наночастинок C_{60} -Cis-Pt комплексу становить 1,1 нм і є більшим, ніж розмір молекул C_{60} (0,72 нм) або Cis-Pt (до 0,75 нм) окремо. Відмічено, що наночастинки комплексу утворюють ланцюжкові структури, орієнтовані у певному напрямі, що вказує на комплексоутворення за механізмом самозбирання. Знімки АСМ показали, що поверхня, утворена з водного колоїдного розчину C_{60} фулерену рівномірно вкрита наночастинками розміром від 5 до 32 нм, тоді як поверхня, утворена із суміші C_{60} фулерену із цисплатином, вкрита наночастинками удвічі більшого розміру від 10 до 70 нм.

За допомогою МКРР виявлено відмінності у інтенсивності рентгенівського розсіювання, яка була вищою у водному колоїдному розчині C_{60} фулерену, порівняно з розчином C_{60} фулерену із Cis-Pt. Важливо зазначити, що різниця у кількості максимумів за функціями розподілу по парним відстаням рентгенівського розсіювання – один для C_{60} фулерену і два для C_{60} -Cis-Pt, є прямим свідченням формування комплексу між молекулами C_{60} і Cis-Pt.

Розмір наночастинок у водному середовищі було оцінено методом динамічного розсіювання світла. Встановлено, що у водному колоїдному розчині C_{60} фулерену переважають наночастинки з середнім гідродинамічним діаметром 80 нм, тоді як у розчині C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу відмічено зростання гідродинамічного розміру – 120 нм.

Стабільність отриманого C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу в розчині оцінювали за величиною ζ (дзета)-потенціалу, яка через 3 місяці після його отримання становила -21.2 мВ, що свідчить про стабільність утвореної системи та її придатність для біологічних досліджень.

Токсичну дію створеного C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу на нормальні та злоякісні клітини оцінено у порівнянні з вільним цисплатином. Концентрацію C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу виражали за концентрацією цисплатинового компонента. C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс у діапазоні концентрацій 5-40 мкМ через 24 год інкубації не спричиняв токсичної дії на клітини НЕК294.

Принциповим було дослідити токсичні ефекти C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у злоякісних клітинах як чутливих, так і резистентних до цитостатиків і з'ясувати

чи посилюється цитотоксичність цисплатину за комплексації з C₆₀ фулереном. Об'єктом дослідження було обрано злоякісно трансформовані клітини різного гістогенезу: клітини HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії, та їх резистентні сублінії, клітини HeLa і KB-3-1 карциноми шийки матки, а також клітини LLC карциноми легені Льюїс.

Порівняльне дослідження токсичної дії C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу і вільного цисплатину за еквівалентної концентрації щодо чутливих клітин HL-60/wt лейкемії та резистентних до адриаміцину клітин HL-60/adr і вінкристину клітин HL-60/vinc виявило ряд особливостей. По-перше, C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс був токсичнішим, ніж Cis-Pt, про це свідчили значення IC₅₀ через 24 год у клітинах лейкемії HL-60/wt (IC₅₀=0,38 мкМ), HL-60/vinc (IC₅₀=6,68 мкМ) та HL-60/adr (IC₅₀=7,68 мкМ), які були нижчими у 2,2, 3,3 та 2,3 рази відповідно порівняно з вільним цисплатином за еквівалентної концентрації. По-друге, C₆₀-Cis-Pt наноконкомплекс відновлював чутливість резистентних клітин лейкемії до дії цитостатику за низьких концентрацій та посилював їх чутливість за високих концентрацій цитостатику.

Токсична дія C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу за еквівалентної концентрації цисплатину 10 мкМ через 24 год у резистентних клітинах HL-60/adr лейкемії реалізується через індукцію апоптозу, що супроводжувалося накопиченням клітин у subG1 і G2/M фазах та збільшенням вмісту клітин, пофарбованих анексином V-FITC/PI, з ознаками пізнього апоптозу.

Отже, C₆₀-CisPt наноконкомплекс посилював чутливість резистентних клітин лейкемії HL-60/vinc та HL-60/adr з надекспресією білків Р-глікопротеїну та MRP1 відповідно. Окрім того, діапазон діючої концентрації C₆₀-Cis-Pt наноконкомплексу виявився нижчим порівняно з вільним цисплатином, що свідчить про високу ефективність протипухлинної дії наноконкомплексу та низьку токсичність цитостатика у складі наноконкомплексу щодо резистентних лейкемічних клітин.

Отримані результати є доказом того, що C₆₀ фулерен модифікує процеси стійкості у резистентних злоякісних клітин, впливає на механізми надходження

та утримання цисплатину всередині клітини, впливаючи на роботу АВС-транспортерів.

C_{60} фулерен, незважаючи на підвищену активність АВС транспортерів у резистентних клітинах, проникав та накопичувався у внутрішньоклітинному просторі злоякісних клітин. Так, немодифікований фулерен C_{60} не розпізнавався Р-глікопротеїнами та з однаковою ефективністю накопичувався як чутливими (K562S), так і резистентними (K562R) лейкемічними клітинами [314].

Відновлений ендоцитоз наночастинками C_{60} фулеренів може бути залучений у подолання набутої резистентності у пухлинних клітин шляхом посиленого поглинання цисплатину. Так, металопохідні фулеренів посилювали чутливість до цисплатину у резистентних клітин карциноми шийки матки KB-3-1 та гепатоми BEL7404 людини [210, 296].

Наступним об'єктом токсичної дії C_{60} -CisPt наноконкомплексу були клітини карциноми шийки матки людини. Виявлено раннє проникнення та швидке накопичення (через 1-3 год) C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у клітинах HeLa, що супроводжувалося зниженням їх життєздатності та морфологічними змінами. Токсичність цисплатину при комплексації із C_{60} фулереном у досліджуваних злоякісних клітинах посилювалася. Показник IC_{50} для C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу через 24 год для клітин HeLa (9,1 мкМ) та KB-3-1 (6,8 мкМ) був удвічі нижчим, ніж для вільного цисплатину. Про апоптичний механізм загибелі клітин KB-3-1 спричинений наноконкомплексом свідчили структурні зміни хроматину у ядрі.

Припускається, що C_{60} фулерен можна використовувати як наноносій хіміопрепаратів, що сприяє та прискорює їх проникнення у злоякісно трансформовані клітини. Так, з використанням флуоресцентної мікроскопії та протокової цитофлуориметрії показано, що комплексований доксорубіцин із C_{60} фулереном накопичувався у клітинах CCRF-CEM лейкемії швидше, ніж вільний [199].

Структура молекули C_{60} є подібною до структури клатрину [432-433], оболонковий білок є основним компонентом при формуванні везикул під час ендоцитозу. Тому C_{60} фулерен може транспортувати ароматичні молекули невеликого розміру [100].

Встановлено, що токсична дія C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу порівняно з окремою дією цисплатину на клітини LLC карциноми легені Льюїс була потужнішою, виявлялась у більш ранній період та за таких еквівалентних концентрацій цитостатику, за яких він окремо не впливав на життєздатність клітин. Згідно розрахованої величини IC_{50} при комплексації Cis-Pt із C_{60} фулереном чутливість клітин LLC до хіміопрепарату зростає у 3 та у 4,5 разів через 24 та 72 год відповідно. Після дії C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу у концентрації наближеній до IC_{50} (12,5 мкМ за Cis-Pt) через 24 год значно знижувалася життєздатність клітин LLC (на 64%), порушувалася їх форма і адгезія, інгібувалася їх міграційна активність і збільшувався вміст клітин у G2/M та subG1 фазах. Індукцію апоптозу C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексом було підтверджено активацією каспази 3/7 і екстерналізацією фосфатидилсерину на зовнішню поверхню клітин LLC, пофарбованих FITC-міченим анексином-V/PI.

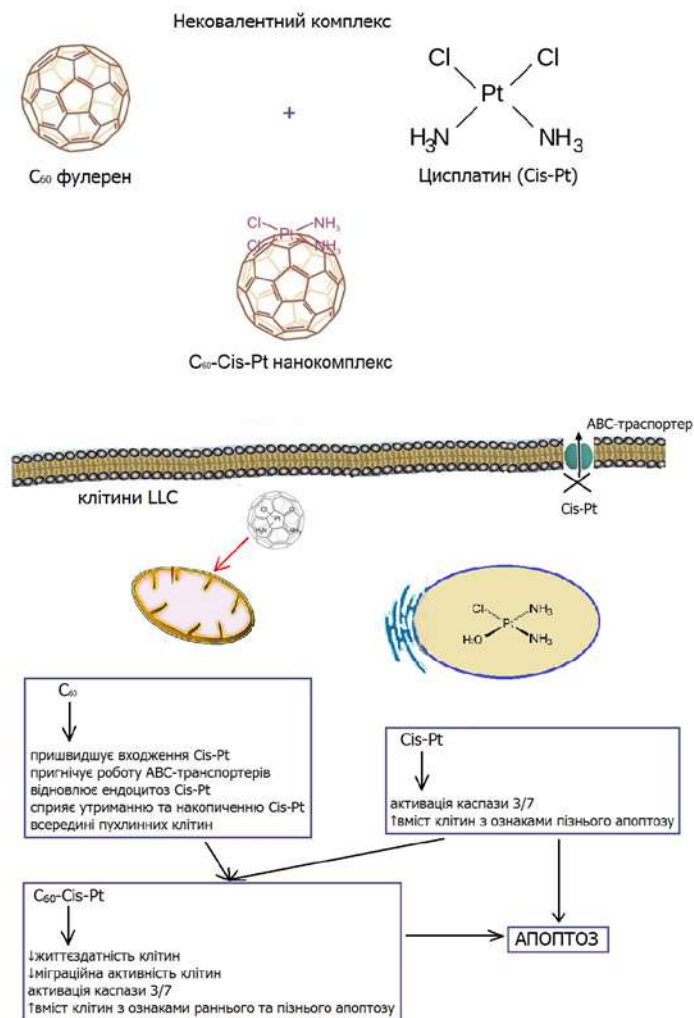


Рис. 11.2. Механізми дії C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу на злоякісні клітини

Отже, застосування наноконплексу Cis-Pt з C₆₀ дозволяє знизити токсичну для клітин LLC карциноми легені концентрацію цисплатину та більш ефективно пригнітити міграційну активність цих клітин порівняно з окремою дією препарату.

Припускається, що C₆₀ фулерен посилює проникнення та утримання цисплатину всередині злоякісних клітин, а C₆₀-Cis-Pt наноконплекс проникає у клітини без механічного пошкодження мембран або шляхом пасивної дифузії, або шляхом ендоцитозу.

Отримані результати досліджень свідчать про перспективність застосування нековалентного наноконплексу C₆₀ фулерену із цисплатином для підвищення протипухлинних ефектів цитостатиків (Рис. 11.2).

Завершальним етапом нашої роботи була перевірка протипухлинної дії C₆₀-Cis-Pt наноконплексу *in vivo*. Спочатку було оцінено гостру токсичність C₆₀ фулерену, цисплатину та C₆₀-Cis-Pt наноконплексу упродовж 14 днів після внутрішньочеревного введення мишам інбредної лінії.

Внутрішньочеревне введення використовується для швидкої та ефективної оцінки генотоксичності, ембріотоксичності та мутагенних властивостей наночастинок. Окрім того, у черевну порожнину можна вводити препарати у вищих концентраціях, які будуть швидше накопичуватися в органах черевної порожнини, ніж після внутрішньовенного введення, а також препарати не піддаються дії ферментів і соків органів ШКТ, як після ентерального введення [306].

C₆₀ фулерен в діапазоні доз 75-150 мг/кг не спричиняв токсичних ефектів у експериментальних тварин за умови внутрішньочеревного введення. Токсичний ефект C₆₀ фулерену спостерігався за концентрацій 300 мг/кг і більше, який супроводжувався порушенням поведінкових реакцій у мишей, гематотоксичністю і патоморфологічними змінами в тканинах селезінки, печінки і нирок. Високе значення LD₅₀ для C₆₀ фулерену (721 мг/кг) підтверджує відсутність у організмі тварин токсичних ефектів карбонової наноструктури за низьких доз.

Токсичність цисплатину ($LD_{50}=15,6$ мг/кг) при комплексції із C_{60} фулереном ($LD_{50}=36,1$ мг/кг) удвічі знижувалася. За умови внутрішньочеревного введення мишам C_{60} -Cis-Pt наноконплексу (1:1) токсичні ефекти виявлялися за дози 22,5+22,5 мг/кг, а цисплатину – за дози 15 мг/кг, що супроводжувалося зниженням активності та виживаності тварин, порушенням процесів кровотворення та гістопатологічними змінами у печінці, серці та нирках.

Високий показник смертності тварин за токсичної дії хіміопрепаратів ускладнює тривалу оцінку їх протипухлинних ефектів, тому введення цисплатину за низьких доз є більш ефективним. Протипухлинну активність C_{60} -Cis-Pt наноконплексу за низької нетоксичної дози його складових (Cis-Pt - 3,75 мг/кг та C_{60} фулерену - 3,75 мг/кг) вивчали на мишах з перещепленою карциномою легені Льюїс. Внутрішньочеревне (5-разове з інтервалом через 1 день) введення препаратів розпочинали на 2 день після внутрішньом'язової інокуляції клітин LLC (5×10^5) у задню кінцівку мишей лінії C57Bl/6.

Показано, що протипухлинний ефект C_{60} -Cis-Pt наноконплексу був ефективнішим, ніж цисплатину за еквівалентної дози. Гальмівний вплив C_{60} -Cis-Pt наноконплексу на ріст пухлини був стабільним у часі, індекс гальмування пухлинного росту становив 55%, 58%, 51% та 46% на 13, 16, 19 та 22 день відповідно після перещеплення пухлини. Виразні протипухлинні ефекти C_{60} -Cis-Pt наноконплексу спостерігалися на 22 добу після перещеплення пухлинних клітин LLC. У групі мишей з карциномою легені Льюїс, яким вводили C_{60} -Cis-Pt наноконплекс за дози 7,5 мг/кг (3,75 мг/кг C_{60} + 3,75 мг/кг Cis-Pt) об'єм та маса пухлинного вузла були меншими у 1,4 та 1,2 рази відповідно порівняно з групою мишей, яким вводили Cis-Pt за дози 3,75 мг/кг.

Цитоморфологічне дослідження тканини карциноми легені Льюїс показало, що за дії C_{60} -Cis-Pt наноконплексу у пухлинні удвічі зменшується кількість клітин з ознаками мітозу та збільшується кількість клітин з ознаками апоптозу порівняно з дією Cis-Pt, що може бути одним з механізмів протипухлинної активності наноконплексу.

Одним з механізмів посилення протипухлинного ефекту цисплатину за комплексації з C_{60} фулереном може бути здатність молекули C_{60} сприяти проходженню цитостатика крізь плазматичні мембрани та накопичуватися всередині злоякісних клітин.

Відомо, що похідні C_{60} фулерену C_{60} -ПЕГ і $C_{60}(\text{OH})_n$ переважно накопичуються і довше утримуються у пухлинних, ніж у нормальних тканинах тварин [81, 472, 541].

Однією з причин вибіркового накопичення C_{60} фулеренів у пухлинній тканині може бути їх здатність зв'язуватися з Toll-подібними рецепторами [484], які надекспресуються більшістю пухлинних клітин [374] і регулюють ендоцитоз [326].

На нашу думку, спрямований транспорт C_{60} -Cis-Pt наноконплексу може відбуватися за рахунок вибіркового накопичення та утримання молекул C_{60} фулерену у пухлинній тканині внаслідок зміненої системи судин у пухлині, а також шляхом фагоцитозу макрофагами.

Карцинома легені Льюїс характеризується здатністю утворювати численні метастази в легенях [256]. Відомо, що процеси пухлиноутворення та метастазування є взаємопов'язаними, тому важливим було оцінити антиметастатичну дію C_{60} -Cis-Pt наноконплексу.

За дії C_{60} -Cis-Pt наноконплексу (3,75 мг/кг C_{60} + 3,75 мг/кг Cis-Pt) на 22-гу добу експерименту у мишей з карциномою легені Льюїс нормалізувалася маса легень, уражених метастазами, зменшувалися кількість (на 25%) та розмір (на 23%) метастазів у легенях порівняно з окремою дією цисплатину.

Припускається, що антиметастатичний ефект C_{60} -Cis-Pt наноконплексу обумовлений здатністю C_{60} фулерену інгібувати міграційну активність пухлинних клітин.

Отже, в експериментах *in vivo* показано, що протипухлинний та антиметастатичний ефекти C_{60} -Cis-Pt наноконплексу щодо карциноми легені Льюїс є вищими, порівняно з окремою дією цисплатину. Окрім того використання наноконплексу дозволило підвищити протипухлинну активність цисплатину за низької дози.

Важливо було з'ясувати чи позначаться виявлені протипухлинний та антиметастатичний ефекти C_{60} -Cis-Pt наноконплексу на фізіологічному стані мишей-пухлиноносіїв.

Тривалість життя мишей-пухлиноносіїв, які отримували C_{60} -Cis-Pt наноконплекс збільшувалася, порівняно з контрольною групою (на 6 днів) та Cis-Pt групою (на 4 дні). Подовження тривалості життя мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс за дії C_{60} -Cis-Pt наноконплексу на $32\pm 5\%$ порівняно з контрольною групою мишей-пухлиноносіїв свідчить про ефективність його протипухлинної дії.

C_{60} -Cis-Pt наноконплекс запобігав пухлинноасоційованим та цисплатин-індукованим зниженню маси тіла та гематотоксичності у мишей з карциномою легені Льюїс – маса мишей-пухлиноносіїв була більшою на 16% порівняно з контрольними мишами-пухлиноносіями, а показники крові у мишей-пухлиноносіїв наближались до значень отриманих у групі інтактних тварин, а саме зростали вміст гемоглобіну (до 100 г/л), кількість еритроцитів (до $6,8\pm 0,8 \times 10^{12}/л$), лімфоцитів (до $3,0\pm 0,2 \times 10^9/л$), а також знижувалася кількість лейкоцитів (до $9,4\pm 1,3 \times 10^9/л$).

C_{60} -Cis-Pt наноконплекс нормалізував вагові показники лімфоїдних органів селезінки та тимусу – загальна маса органів була нижчою у 1,3 та 2 рази відповідно порівняно з контрольними мишами-пухлиноносіями.

Отже, при комплексації цисплатину за низької дози (3,75 мг/кг) з C_{60} фулереном (3,75 мг/кг) у мишей з карциномою легені Льюїс ефективно інгібулася ріст пухлини та утворення метастазів у легенях, що супроводжувалося подовженням тривалості життя мишей-пухлиноносіїв, нормалізацією їх маси тіла, показників крові тощо.

Виявлені терапевтичні ефекти C_{60} -Cis-Pt наноконплексу можуть бути обумовлені антиоксидантними, мембранотропними, імунномодулюючими та протизапальними властивостями C_{60} фулерену. Тому не виключено використання C_{60} фулеренів як захисних та терапевтичних агентів при багатьох захворюваннях, а також для запобігання розвитку побічних ефектів, спричинених токсичною дією протипухлинних препаратів.

Отримані результати свідчать про перспективність використання C_{60} фулерену для підвищення протипухлинної ефективності традиційних хіміопрепаратів. Запропоновані нами технології застосування C_{60} фулерену як за комбінованої дії з цисплатином після фотоактивації наноструктури, так і за комплексоутворення із цисплатином дозволили знизити діючу дозу цитостатику та посилити його протипухлинні ефекти.

Таким чином, створений нековалентний C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс виявляв ефективнішу протипухлинну дію *in vitro* та *in vivo* порівняно з окремою дією цисплатину за еквівалентної концентрації. За дії наноконкомплексу C_{60} -Cis-Pt вдалося підвищити і пришвидшити токсичну дію цисплатину щодо клітин LLC карциноми легені Льюїс. Застосування C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу дозволило посилити протипухлинні та антиметастичні ефекти цитостатику, що доводить таргентну ефективність наноструктури, а також знизити токсичну дію цисплатину на організм мишей з карциномою легені Льюїс та покращити їх фізіологічний стан.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі розроблено технології використання C_{60} фулерену як за комбінованої дії з цисплатином після фотоактивації наноструктури, так і за комплексоутворення із цисплатином та доведено їх ефективність для посилення протипухлинної дії традиційного хіміопрепарату, подолання медикаментозної резистентності злоякісних клітин, мінімізації побічних ефектів. З'ясовано механізми цитотоксичної дії цисплатину за комбінації із фотозбудженим C_{60} фулереном та нековалентного наноконкомплексу C_{60} -Cis-Pt. Отримані результати свідчать про перспективність використання C_{60} фулерену як ефективного цитопротектора, фотосенсибілізатора, таргентного наноносія традиційних протипухлинних препаратів та демонструють нові підходи для розробки оптимізованих форм протипухлинних агентів.

1. Виявлено захисні ефекти C_{60} фулерену від ушкоджувальної дії 100 мкМ пероксиду водню та 3,3 мкМ цисплатину на нормальні клітини: за дії наноструктури знижувався рівень АФК, утворюваних за дії H_2O_2 і Cis-Pt, попереджалось H_2O_2 -індуковане зниження життєздатності тимоцитів та цисплатин-індукований гемоліз еритроцитів.

2. З використанням флуоресцентно-міченого C_{60} фулерену (C_{60} -FITC) доведено поглинання та довготривале утримання наноструктури клітинами лейкемії L1210. Імуноцитохімічне фарбування з використанням FITC-мічених антитіл до C_{60} фулерену продемонструвало накопичення C_{60} фулерену у мітохондріях клітин лейкемії CCRF-CEM.

3. Показано, що за умови комбінованої дії фотозбудженого (410-700 нм) C_{60} фулерену та цисплатину у низькій дозі токсична дія на чутливі до цитостатика клітини L1210 посилювалась, а на резистентні – відновлювалась. Механізмами токсичної комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину є посилення продукування АФК, підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} , падіння мітохондрійного потенціалу та індукція загибелі клітин за механізмом апоптозу.

4. Створено та охарактеризовано нековалентний, стабільний у водному середовищі наноконкомплекс C_{60} фулерену з Cis-Pt (C_{60} -Cis-Pt) з концентрацією складових 75:75 мкг/мл (за масою 1:1), або 104 мкМ C_{60} :250 мкМ Cis-Pt (за молярністю 1:2,4). Комплексоутворення між молекулами C_{60} і Cis-Pt підтверджено методами комп'ютерного моделювання, сканувальної тунельної мікроскопії та динамічного розсіювання світла.

5. У експериментах *in vitro* доведено, що застосування наноконкомплексу C_{60} -Cis-Pt дозволяє знизити токсичну для клітин LLC карциноми легені Льюїс концентрацію цисплатину. Значення IC_{50} для цисплатину становило 50 ± 4 мкМ, тоді як для наноконкомплексу C_{60} -Cis-Pt - 17 ± 2 мкМ.

6. Індукований C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексом апоптоз клітин LLC підтверджено активацією каспази 3/7 і транслокацією фосфатидилсерину на зовнішню поверхню мембрани. Показано, що за дії наноконкомплексу вміст клітин LLC з ознаками раннього та пізнього апоптозу є вищим, ніж за окремої дії цисплатину в еквівалентній концентрації за незмінного рівня некротичних клітин.

7. Продемонстровано ефективне пригнічення міграційної активності клітин LLC за дії C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу порівняно з окремою дією цитостатика в еквівалентній концентрації.

8. Оцінено гостру токсичність C_{60} фулерену та встановлено значення LD_{50} (721 ± 48 мг/кг), яке дозволяє віднести наноструктуру до низькотоксичних сполук. Встановлено, що гостра токсичність цисплатину ($LD_{50} = 15,6 \pm 1,3$ мг/кг) за комплексоутворення із C_{60} фулереном знижувалася удвічі ($LD_{50} = 36,1 \pm 2,8$ мг/кг).

9. Показано, що C_{60} -Cis-Pt наноконкомплекс за внутрішньочеревного введення мишам-пухлиноносцям ефективніше пригнічував ріст карциноми легені Льюїс та утворення метастазів у легенях порівняно з цисплатином за еквівалентної дози.

10. Виявлено, що протипухлинний та антиметастатичний ефекти C_{60} -Cis-Pt наноконкомплексу супроводжувалися подовженням тривалості життя мишей-пухлиноносців, нормалізацією їх маси тіла та показників крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бандас ІА, Криницька ІЯ, Куліцька МІ, Корда ММ. Наночастинки: важливість сьогодні, класифікація, використання в медицині. Мед Клін Хімія. 2015;17(3):123-129.
2. Гарманчук Л, Скачкова О, Репіч Г, Орисик С. Протипухлинні, антиметастатичні та метаболічні ефекти новосинтезованих платинових комплексів. Проблеми Регуляції Фізіол Функцій. 2017;2(23):69-75.
3. Гарманчук ЛВ, Перепелиціна ОМ, Гринюк ІІ, Прилуцька СВ, Матишевська ОП, Сидоренко МВ. Фулерени C_{60} змінюють адгезивні властивості клітин раку молочної залози MCF-7. Доповіді НАНУ. 2009;4:164-167.
4. Гребіник СМ. Кальцієвий сигнал у тимоцитах та МТ-4 клітинах за дії екзогенних чинників. Вісник Київського національного університету. Серія Біологія. 2012;60:15-18.
5. Гребіник СМ, Гринюк ІІ, Прилуцька СВ, Матишевська ОП. Генерація активних форм кисню у тимоцитах щурів за дії пероксиду водню та фулерену C_{60} . Укр Біохім Журн. 2012;84(2):48-52.
6. Гринюк ІІ, Корнійчук ГМ, Капралов ОО, Матишевська ОП. Зміни структурного стану хроматину на ранньому етапі апоптозу за індукції пероксидом водню та радіацією. Укр Біохім Журн. 2004;75(5):90-95.
7. Гринюк ІІ, Перепелиціна ОМ, Прилуцька СВ, Гарманчук ЛВ, Храновська НМ, Матишевська ОП, Сидоренко МВ. Вплив фулеренів C_{60} на виживаність клітин MCF-7 раку молочної залози за тривалої інкубації. Біотехнологія. 2010;3(4):75-79.
8. Гринюк ІІ, Прилуцька СВ, Гребіник СМ, Михайлова АГ, Франкевич ДВ, Матишевська ОП. Показники активності антиоксидантної системи у нормальних та трансформованих клітинах. Досягнення Біол Мед. 2011;2:31-35.
9. Кононова ГС, Антонюк СВ, Штеменко НІ. Вплив реній-платинової системи у вигляді наноліпосом на проліферативну активність ракових клітин. Вісник Дніпропетровського університету. Біол Мед. 2011;1(2):59-67.

10. Матишевська ОП, Дробот ЛБ, Прилуцька СВ, Гринюк П, Паливода КО, Петухов ДМ. Фулерен C_{60} – модулятор апоптозу попередників Т-лімфоцитів та лейкомічних клітин. Монографія під ред. Стойки РС, Прилуцького ЮІ, Наумовця АГ, та ін. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування. 2017. Київ: НВП «Видавництво «Наукова думка» НАН України»:114-126.
11. Матишевська ОП, Прилуцька СВ, Гринюк П. Фулерени C_{60} – біологічно активні молекули. І. Фізико-хімічні властивості та біодоступність. Біотехнологія. 2010;3(1):18-26.
12. Матишевська ОП, Прилуцька СВ, Бурлака АП, Сидорик ЄП, Ящук ВМ, Голуб ОА, Прилуцький ЮІ. Генерація радикальних форм кисню у водних розчинах C_{60} під дією опромінення. Фізика Живого. 2004;12(2):78-82.
13. Опейда Є, Рудик М, Святецька В, Сківка Л, Федорчук О. Реакція лімфоїдних органів щурів на ріст гліоми С6. Вісник КНУ ім. Шевченка. 2017;1(22):61-65.
14. Прилуцька СВ. Застосування комплексів фулерену C_{60} із протипухлинними препаратами у хіміотерапії. Biotechnol Acta. 2014;7(3):9-20.
15. Прилуцька СВ, Гринюк П, Бурлака АП, Голуб ОА, Матишевська ОП. Оксидантні властивості фотозбуджених фулеренів C_{60} та C_{60} -вмісних композитів у суспензіях тимоцитів та клітин асцитної карциноми Ерліха. Укр Біохім Журн. 2006;78(4):139-145.
16. Прилуцька СВ, Гринюк П, Голуб ОА, Матишевська ОП. Оцінка параметрів цитотоксичності фулеренів C_{60} та C_{60} -вмісних композитів *in vitro*. Доповіді НАНУ. 2006;1:163-167.
17. Прилуцька СВ, Кічмаренко ЮМ, Богуцька КІ, Прилуцький ЮІ. Фулерен C_{60} та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи. Біотехнологія. 2012;5(3):9-17.
18. Прилуцька СВ, Ротко ДМ, Прилуцький ЮІ, Рибальченко ВК. Токсичність вуглецевих наноструктур у системах *in vitro* та *in vivo*. Совр Проб Токсикол. 2012;3-4:49-57.

19. Резніков ОГ, Соловйов АІ, Добреля НВ, Стефанов ОВ. Біоетична експертиза до клінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах. Методичні рекомендації. Установа-розробник: Інститут фармакології і токсикології АМН України. Київ. 2006:1-28.
20. Стефанов ОВ. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод рекомен. Держ фармакол центр. Київ: Вид. дім «Авіцена». 2001:1-527.
21. Абелев ГИ. Механизмы дифференцировки и опухолевый рост. Биохимия. 2000;65(1):127-138.
22. Абрашова ТВ, Гуцин ЯА, Ковалева МА, Рыбакова АВ, Селезнева АИ, Соколова АП, Ходько СВ. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб: Изд-во «ЛЕМА». 2013:1-116.
23. Безбородова ОА, Немцова ЕР, Александрова ЛН, Суханов ДС, Коваленко АЛ, Якубовская РИ. Оценка детоксицирующего действия препарата «Ремаксол» на модели токсикоза, индуцированного цисплатином. Эксперимент и клин фармакология. 2011;74(3);26-31.
24. Беляков КМ, Густов АВ, Потехина ЮП, Терентьев ИГ. Особенности клинко-электронейромиографических проявлений и морфологической картины плазмы крови при паранеопластических полиневропатиях. Неврол Журн. 2007;5;26-29.
25. Беспалов ВГ, Жабин АА, Стуков АН, Беляева ОА, Муразов ЯГ, Семёнов АЛ, Коньков СА, Крылова ИМ. Синергизм противоопухолевого действия диоксидэти и цисплатина на модели асцитной опухоли яичника. Сибир Онкол Журн. 2013;1(55):42-46.
26. Бутаков АА, Оганезов ВК, Пинегин БВ, Черноусов АД. Спектрофотометрическое определение адгезивной способности полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови. Иммунология. 1991;5:71-72.
27. Власова СН, Шабунина ЕИ, Персегина ИА. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб Дело. 1990;8:19-22.

28. Гвичия АШ. Морфология поверхности опухолевых клеток. Тбилиси: Мецинереба. 1983:1-118.
29. Гершанович МЛ. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. Москва: Медицина. 1982:89-97.
30. Гершанович МЛ, Филов ВА, Акимов МА, Акимов АА. Введение в фармакотерапию злокачественных опухолей. СПб: Сотис. 1999:1-143.
31. Гребиник ДМ, Коваль ТВ, Матышевская ОП. Кальциевый гомеостаз в тимоцитах при апоптозе. 1. Повышение концентрации цитозольного Ca^{2+} на ранней стадии апоптоза, индуцированного пероксидом водорода. Укр Біохім Журн. 2004;76(6):63-69.
32. Гринюк ИИ, Прилуцкая СВ, Слободяник НС, Чунихин АЮ, Матышевская ОП. Агрегатное состояние C_{60} -фуллерена в различных средах. Biotechnol Acta. 2013;6(6):71-76.
33. Дворецкий ЛИ. Паранеопластические синдромы. Труд Диагн. 2003;3:165-177.
34. Дейчман ГИ. Естественный отбор и ранние изменения фенотипа опухолевых клеток *in vivo*: приобретение новых механизмов защиты. Биохимия. 2000;65(1):92-111.
35. Елецкий АВ, Смирнов БМ. Фуллерены и структуры углерода. Усп Физ Наук. 1995;165(9):977-1009.
36. Ионичева ЛВ, Микуляк НИ, Моисеева ИЯ, Кустикова ИН. К проблемам антиоксидантной коррекции цитостатической супрессии гемопоэза. Известия Высш Науч Завед Мед Наук. 2008;2:3-12.
37. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник. под ред. Карпищенко АИ. Санкт-Петербург: Интермедика. 2002:1-408.
38. Козлов АМ, Софьина ЗП. Частота, сроки и тип метастазирования различных перевиваемых опухолей мышей. Бюлл Эксперим Биол Мед. 1978;12:715-717.
39. Колесниченко ЛС, Кулинский ВИ. Глутатионтрансферазы. Успехи Современ Биол. 1989;107(2):179-194.

40. Копнин БП. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия. 2000;65:5-33.
41. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионтранспероксидазы. Успехи Современ Биол. 1993;113(1):107-121.
42. Матышевская ОП, Паливода КО, Прилуцкая СВ, [и др.] Индукция апоптической гибели лейкемических клеток с использованием фуллерена C₆₀. Нано-размерные системы и нано-материалы: исследования в Украине. ред. Наумовец АГ. Киев: Академперіодика. 2014:524-529.
43. Мешалкин ЮП, Бгатова НП. Перспективы и проблемы использования неорганических наночастиц в онкологии. J Siber Fed Univ Biol. 2008;1(3):248-268.
44. Мушкамбаров НН, Кузнецов СЛ. Молекулярная биология. М: МИА. 2003:511-520.
45. Николаев АИ, Мартыненко АВ, Калмырзаев ББ. Повышение экспрессии некоторых митохондриальных генов при нон-ходжкинских лимфомах В-клеток человека и обезьяны. Мол Биол. 2001;35(1):108-115.
46. Орлова МА, Трофимова ТП, Орлов АП, Шаталов ОА, Наполов ЮК, Свистунов АА, Чехонин ВП. Противоопухолевая активность производных фуллерена и возможности их использования для адресной доставки лекарств. Онкогематол. 2013;8(2):83-89.
47. Паливода КО, Гринюк ИИ, Прилуцкая СВ, Самойленко АА, Дробот ЛБ, Матышевская ОП. Индукция апоптоза при действии фотовозбужденного фуллерена C₆₀ в лейкемических Т-клетках человека. Укр Біохім Журн. 2010;4:3459-3464.
48. Пальцев МА, Иванов АА. Межклеточное взаимодействие. Москва: Медицина. 1995:128-172.
49. Плохинский МА. Математические модели в биологии. Москва: Изд-во Моск Ун-та. 1981:1-265.

50. Резников ОГ. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Ендокринолог. 2003;8(1):142-145.
51. Ронин ВС, Старобинец ГМ. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований. 4-е изд. Москва: Медицина. 1989:1-320.
52. Росляков АД, Андриевский ГВ, Петренко АЮ, Малая ЛТ. Исследование цитотоксических и антиоксидантных свойств водных растворов нативных фуллеренов в системах *in vitro*. Журн Акад Мед Наук Укр. 1999;5:338-346.
53. Северин ЕС. Биохимические основы патологических процессов. Москва: Медицина. 2000:51-73.
54. Семенова ВМ, Лисяный НИ, Читаева ГЕ, Ключникова АИ, Лисяный АН, Бельская ЛН, Шевчук ОВ. Изучение противоопухолевой активности препаратов украин и цисплатин в эксперименте на модели перивентрикулярной глиомы мозга (штам 101.8). Укр Нейрохірург Журн. 2008;1:32-38.
55. Ставровская АА. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Биохимия. 2000;65(1):112-127.
56. Терсков ИА, Гительзон ИИ. Метод химических (кислотных) эритрограмм. Биофизика. 1957;2(2):259-266.
57. Фильченков АА, Стойка РС, Быкорез АИ. Трансформирующие факторы роста. Київ: Наукова думка. 1994:1-287.
58. Цымбал ТИ, Петрова АС, Зубрихина ГН, Кочеткова ОД. НАЗВА Лаб Дело. 1985;4:220-223.
59. Чевари С, Чаба И, Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб Дело. 1985;11:678-681.
60. Чумаков ПМ. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия. 2000;65:34-47.
61. Шор НФ, Каган ВЕ, Лианг И, Ян Ч, Тюрин В, Найландер КД. Использование окислительного стресса и механизма передачи сигналов при

лечении новообразований, устойчивых к химиотерапии. Биохимия. 2004;69(1):48-56.

62. Штыков СН, Русанова ТЮ. Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения. Росс Хим Журн. 2008;32(2):92-100.

63. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. Софьиной ЗП, Сыркина АБ, Голдина А, Кояйна А. Москва: Медицина. 1979:1-296.

64. Adamo C, Barone VJ. Exchange functionals with improved long-range behavior and adiabatic connection methods without adjustable parameters: The mPWmPW and mPW1PWmPW1PW models. Chem Phys. 1998;108:664-675.

65. Adams RP. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier. 1990.

66. Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. Chem Biodiversity. 2010;7(3):543-566.

67. Ahmand M, Shi Y. TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells: potential for therapeutic intervention. Oncogene. 2000;19:3363-3371.

68. Akcay A. The calculation of LD50 using probit analysis. FASEB J. 2013;1:1217-1228.

69. Albright CD, Liu R, Mar MH, Shin OH, Vrablic AS, Salganik RI, Zeisel SH. Diet, apoptosis, and cancerogenesis. Adv Exp Med Biol. 1997;422:97-107.

70. Alhasan SA, Pietrasczkiewicz H, Alonso MD, Ensley J, Sarkar FH. Genistein-induced cell cycle arrest and apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. Nutr Cancer. 1999;34(1):12-19.

71. Ali SS, Hardt JJ, Quick KL, Kim-Han JS, Erlanger BF, Huang TT, Epstein CJ, Dugan LL. A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. Free Radic Biol Med. 2004;37(8):1191-1202.

72. Ambrose KR, Lowrey JS. Effect of cis- and trans-dichlorodiammineplatinum (II) on human tumor cell proliferation in diffusion chambers *in vivo*. *Cancer Res.* 1982;42:1769-1773.
73. Anderson T, Westman G, Wennerstrom O, Sundahl M. NMR and UV-VIS investigation of Water-soluble fullerene-C₆₀- β -cyclodextrin. *J Chem Soc Perkin Trans II.* 1994;5:1097-1101.
74. Antunes F, iCadenas E, iBrunk U. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J.* 2001;356:549-555.
75. Anwar A, Numan A, Siddiqui R, Khalid M, Khan NA. Cobalt nanoparticles as novel nanotherapeutics against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasites Vectors.* 2019;12:280.
76. Aoshima HS, Saytoh Y, Ito S, Yamana S, Miwa N. Safety evaluation of highly purified fullerenes (HPFs): based on screening of eye and skin damage. *J Toxicol Sci.* 2009;4(5):555-562.
77. Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Vadhanam MV. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Lett.* 2013;334(1):133-141.
78. Arbogast JW, Foote CS. Photophysical properties of C₆₀. *J Am Chem Soc.* 1991;113:8886-8889.
79. Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(10):1150-1180.
80. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(13-14):1825-1835.
81. Asada R, Liao F, Saitoh Y, Miwa N. Photodynamic anti-cancer effects of fullerene [C₆₀]-PEG complex on fibrosarcomas preferentially over normal fibroblasts in terms of fullerene uptake and cytotoxicity. *Mol Cell Biochem.* 2014;390:175-184.
82. Atilano-Roque A, Wen X, Aleksunes LM, Joy MS. Nrf2 activators as potential modulators of injury in human kidney cells. *Toxicol Rep.* 2016;3:153-159.

83. Baierl T, Seidel A. *In vitro* effects of fullerene C₆₀ and fullerene black on immunofunctions of macrophages. *Fullerene Sci Technol.* 1996;4:1073-1085.
84. Baker GL, Gupta A, Clark ML, Valenzuela BR, Staska LM, Harbo SJ, Pierce JT, Dill JA. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C₆₀ fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol Sci.* 2008;101:122-131.
85. Bal R, Turk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Ozercan I, Kuloglu T, Gür S, Nedzvetsky VS, Tykhomyrov AA, Andrievsky GV, Baydas G, Naziroglu M. Protective effects of nanostructures of hydrated C₆₀ fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology.* 2011;282(3):69-81.
86. Balls M, Combes RD, Bhogal N. New technologies for toxicity testing. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* New York: Landes Bioscience, 2012:1-300.
87. Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, O'Flaherty JD, Fennell DA, Richard D, O'Leary JJ, O'Byrne KJ. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One.* 2013;8(1):e54193.
88. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids.* 2010;8:1-16.
89. Basu S, Harfouche R, Soni S, Chimote G, Mashelkar RA, Sengupta S. Nanoparticle-mediated targeting of MAPK signaling predisposes tumor to chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(19):7957-7961.
90. Bataller L, Dalmau JO. Paraneoplastic disorders of the central nervous system: update on diagnostic criteria and treatment. *Semin Neurol.* 2004;24:461-71.
91. Bedrov D, Smith GD, Davande H, Li L. Passive transport of C₆₀ fullerenes through a lipid membrane: a molecular dynamics simulation study. *J Phys Chem B.* 2008;112(7):2078-2084.
92. Bensasson RV, Brettreich M, Frederiksen J, Gottinger H, Hirsch A, Land EJ, Leach S, McGarvey DJ, Schonberger H. Reactions of e⁻(aq), CO₂(*)⁻, HO(*), O₂(*)⁻ and O₂((1)Δ(g)) with a dendro[60]fullerene and C(60)[C(COOH)₂]_n (n^{1/2}-6). *Free Radic Bio Med.* 2000;29(1):26-33.

93. Berger ChS. Toward fullerene immunotherapy with water-soluble paclitaxel-fullerene conjugates. Doctoral Thesis. Rice University. Houston. Texas. 2013:1-109.
94. Berndtsson M, Heagg M, Panaretakis T, Havelka AM, Shoshan MC, Linder S. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *Int J Cancer*. 2007;120(1):175-180.
95. Bianco A, Da Ros T, Prato M, Toniolo C. Fullerene-based amino acids and peptides. *J Pept Sci*. 2001;7:208-219.
96. Bisaglia M, Natalini B, Pellicciari R, Straface E, Malorni W, Monti D, Franceschi C, Schettini G. C₃-Fullerol Trismethanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis. *J Neurochem*. 2000;74(3):1197-1204.
97. Blodgett KB. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *J Am Chem Soc American Chemical Society*. 1935;57(6):1007-1022.
98. Bogdanovic G, Kojic V, Dordevic A, Canadanovic-Brunet J, Vojinovic-Miloradov M, Baltic V. Modulating activity of fullerol C₆₀(OH)₂₂ on doxorubicin-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2004;18(5):629-637.
99. Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer. 2013;3(292): 1-28.
100. Borowik A, Prylutsky Y, Kawelski Ł, Kyzyma O, Bulavin L, Ivankov O, Cherepanov V, Wyrzykowski D, Kaźmierkiewicz R, Gołuński G, Woziwodzka A, Evstigneev M, Ritter U, Piosik J. Does C₆₀ fullerene act as a transporter of small aromatic molecules? *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;164:134-143.
101. Boumendjel A, Florin A, Boutonnat J. Reversal agents of multidrug resistance mediated by multidrug resistance-associated proteins (MRPs). *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. 2009:261-288.
102. Bouška P. Mechanisms of resistance to platinum cytotoxic drugs: Diploma Thesis. Prague. 2009:1-63.

103. Brant JA, Labille J, Bottero JY, Wiesner MR. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry. *Langmuir*. 2006;22(8):3878-3885.
104. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology* 2013;14:32-41.
105. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):817-833.
106. Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(4):347-359.
107. Brunger AT. X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR. New Haven. CT. USA. Yale University Press. 1992.
108. Buford MC, Hamilton JrRF, Holian A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2007;4:6.
109. Bullard-Dillard R, Creek KE, Scrivens WA, Tour JM. Tissue sites of uptake of ¹⁴C-labeled C₆₀. *Bioorg Chem*. 1996;24(4):376-385.
110. Burlaka AP, Sidorik YeP, Prylutska SV, Matyshevskaya OP, Golub OA, Prylutskiy YuI, Scharff P. Catalytic system of the reactive oxygen species on the C₆₀ fullerene basic. *Exp Oncol*. 2004;26(4):326-327.
111. Bychko A, Sokolova V, Prylutska S, Bogutska K, Rybalchenko V, Evstigneev M, Prylutskiy Y, Epple M, Ritter U, Scharff P. Interaction of C₆₀ fullerene complexed to cisplatin with model bilipid membranes and its uptake by HeLa cells. *Mat-wiss u Werkstofftech*. 2016;47(2-3):105-111.
112. Cai XB, Jing XB, Hu H, Chen SZ, Li YH. The role of ROS in cisplatin-induced apoptosis of esophageal cancer cell line EC-109. *Ai Zheng*. 2006;25(4):427-431.
113. Cardoso BA, Gírio A, Henriques C, Martins LR, Santos C, Silva A, Barata JT. Aberrant signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: biological and therapeutic implications. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(5):344-350.

114. Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987;47(4):936-942.
115. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7(1):3-18.
116. Chaklader M, Das P, Pereira JA, Law A, Chattopadhyay S, Chatterjee R, Mondal A, Law S. 17-AAG mediated targeting of HSP90 limits tert activity in peritoneal sarcoma related malignant ascites by down regulating cyclin D1 during cell cycle entry. *Exp Oncol.* 2012;34(2):90-96.
117. Chaudhuri P, Paraskar A, Soni S, Mashelkar RA, Sengupta S. Fullerenol cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy. *ASC Nano.* 2009;3(9):2505-2514.
118. Chen BX, Wilson SR, Das M, Coughlin DJ, Erlanger BF. Antigenicity of fullerenes: Antibodies specific for fullerenes and their characteristics. *PNAS.* 1998;95(18):10809-10813.
119. Chen Ch, Xing G, Wang J, Zhao Y, Li B, Tang J, Jia G, Wang T, Sun J, Xing L, Yuan H, Gao YY, Meng H, Chen Z, Zhao F, Chai ZF, Fang X. Multihydroxylated [Gd@C82(H)22]n nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. *Nano Lett.* 2005;5:2050-2057.
120. Chen HH, Kuo MT. Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs.* 2010;2010:1-7.
121. Chen HH, Yu C, Ueng TH, Chen S, Chen BJ, Huang KJ, Chiang LY. Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C₆₀ in rats. *Toxicol Pathol.* 1998;6:143-151.
122. Chen J, Solomides C, Parekh H, Simpkins F, Simpkins H. Cisplatin resistance in human cervical, ovarian and lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(6):1217-1227.
123. Chen KL, Elimelech M. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Langmuir.* 2006;22:10994-11001.

124. Chen YW, Hwang K, Yen CC, Lai YL. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regular Integr Comp Physiol*. 2004;287:21-26.
125. Chiang LY, Lu FJ, Lin JT. Free radical scavenging activity of water-soluble fullerenols. *J Chem Soc Chem Commun*. 1995;12:1283-1284.
126. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004;303(5660):1010-1014.
127. Chirico F, Fumelli C, Marconi A, Tinari A, Straface E, Malorni W, Pellicciari R, Pincelli C. Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Exp Dermatol*. 2007;16(5):429-436.
128. Chistyakov VA, Prazdnova EV, Soldatov AV, Smirnova YuO, Alperovich I. Can C₆₀ fullerene demonstrate properties of mitochondria-targeted antioxidant from the computational point of view? *Int J Biol Biomed Eng*. 2014;8:59-62.
129. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int*. 2005;5:30-43.
130. Ciardiello F, Tortora G. Anti-epidermal growth factor receptor drugs in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11:755-768.
131. Colerangle JB. Preclinical development of nononcogenic drugs (small and large molecules). A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development. Second Edition. 2017:659-683.
132. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124(2):263-266.
133. Coronello M, Marcon G, Carotti S, Caciagli B, Mini E, Mazzei T, Orioli P, Messori L. Cytotoxicity, DNA damage, and cell cycle perturbations induced by two representative gold(III) complexes in human leukemic cells with different cisplatin sensitivity. *Oncol Res*. 2000;12(9-10):361-370.
134. Csordas G, Hajnoczky G. SR/ER-mitochondrial local communication: Calcium and ROS. *J Physiol*. 2009;529:11-21.

135. Cullen J, Weydert C, Hinchouse M, Ritchie J, Domann FE, Spitz D, Oberley LW. The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(6):1297-1303.
136. Da Ros T, Prato M. Medical chemistry with fullerenes and fullerene derivatives. *Chem Commun.* 1999;8:663-669.
137. Da Ros T, Spalluto G, Prato M. Biological applications of fullerene derivatives: a brief overview. *Croat Chem Acta.* 2001;74:743-755.
138. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol.* 2012;13:645-660.
139. Deberardinis RJ, Jones RJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11-20.
140. Deguchi S, Alarg RG., Tsujii K. Stable dispersions of fullerenes C₆₀ and C₇₀ in water. Preparation and characteristics. *Langmuir.* 2001;17:6013-6017.
141. Del Prete A, Allavena P, Santoro G. Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med (Zagreb).* 2011;21(3):264-275.
142. Dellinger A, Zhou Z, Norton SK, Lenk R, Conrad D, Kepley CL. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells. *Nanomedicine.* 2010. 6(4):575-582.
143. Demash DV, Lukianova NYu, Chekhun VF. Evaluation of magnetosensitive cytostatic concentration and different mechanisms of their antitumor effects. *J Appl Life Sci Intern.* 2015;2(2):83-94.
144. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinica Chimica Acta.* 2000;293(1-2):53-62.
145. Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhzad OC, Lippard SJ. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt (IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2008;105:17356-17361.
146. Didenko G, Prylutska S, Kichmarenko Y, Potebnya G, Prylutsky Y, Slobodyanik N, Ritter U, Scharff P. Evaluation of the antitumor immune response to C₆₀ fullerene. *Mat-wiss u Werkstofftech.* 2013;44(2-3):124-128.

147. Dings RP, Loren M, Heun H, McNiel E, Griffioen AW, Mayo KH, Griffin RJ. Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and Avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3395-3402.
148. Djordjevic A, Srdjenovic B, Seke M. [et al.] Review of synthesis and antioxidant potential of fullereneol nanoparticles. [Электронный ресурс]. *J Nanomaterials.* 2015;2015:ID 567073. Режим доступа до ресурсу: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2015/567073/>.
149. Drasler D, Drobne D, Sadeghpour A, Rappolt M. Fullerene up-take alters bilayer structure and elasticity: A small angle X-ray study. *Chem Phys Lipids.* 2015;188:46-53.
150. Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Eklund PC. *Science of fullerenes and carbon nanotubes.* New York: Academic Press. 1996:23-89.
151. D’Rozario RS, Wee CL, Wallace EJ, Sansom MS. The interaction of C₆₀ and its derivatives with a lipid bilayer via molecular dynamics simulations. *Nanotechnology.* 2009;20(11):115102.
152. Duan X, He C, Kron SJ, Lin W. Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2016;8(5):776-791.
153. Dugan LL, Lovvet EG, Quick KL, Lotharius J, Lin TT, O’Malley KL. Fullerene based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord.* 2001;7:243-246.
154. Dugan LL, Turetsky DV, Du C, Lobner D, Wheeler M, Almlı CR, Shen CK, Luh TY, Choi DW, Lin TS. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(17):9434-9439.
155. Dumpis MA, Iljin VV, Litasova EV, Nikolaev DN, Bulion VV, Krylova IB, Okunevich IV, Rodionova OM, Safonova AF, Selina EN, Piotrovsky LB. The acute and sub-acute toxicity of C₆₀/PVP complex *in vivo*. *Adv Nano Res.* 2016;4(3):167-179.
156. Dzantiev BB, Klochkov SG, Hendrikson OD, Zherdev AV, Bachurin SO. Study of nanoparticles localization in organs and tissues of rats after

intraperitoneal and intragastrical administration. Abstracts of the Conference “Nanosafe-2012”. November 13-15. Grenoble. France. 2012:O2b-1.

157. Eberl S, Renner B, Neubert A, Reising M, Bachmakov I, König J, Fromm MF. Role of P-glycoprotein inhibition for drug interactions. *Clinical Pharmacokinetics*. 2007;46(12):1039-1049.

158. Elimelech M, Gregory J, Jia X, Williams RA. Particle deposition and aggregation: measurement, modelling and simulation. Butterworth-Heinemann: Oxford. UK. 1995.

159. Ema M, Matsuda A, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Dermal and ocular irritation and skin sensitization studies of fullerene C₆₀ nanoparticles. *Cutan Ocul Toxicol*. 2013;32(2):128-34.

160. Enck Re. Paraneoplastic syndromes. *Am J Palliate Care*. 2004;21:85-86.

161. Eropkina EM, Il'inskaia EV, Litasova EV, Eropkin MIu, Piotrovskiï LB, Dumpis MA, Kiselev OI. Effect of different water-soluble forms of the fullerene C₆₀ on the metabolic activity and ultra-structure of cells in culture. *Biofizika*. 2012;57(3):343-349.

162. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Meth Mol Biol*. 2010;594:57-72.

163. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg. 1986:1-53.

164. Evstigneev MP, Buchelnikov AS, Voronin DP, Rubin YV, Belous LF, Prylutskyy YI, Ritter U. Complexation of C₆₀ fullerene with aromatic drugs. *ChemPhysChem*. 2013;14:568-578.

165. Fan J, Du J, Wu J, Fu S, Hu D, Wan Q. Antitumor effects of different administration sequences of cisplatin and Endostar on Lewis lung carcinoma. *Oncology Lett*. 2015;9:822-828.

166. Fedorchuk OG, Pyaskovskaya OM, Skivka LM, Gorbik GV, Trompak O, Solyanik GI. Paraneoplastic syndrome in mice bearing high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma: relations with tumor derived VEGF. *Cytokine*. 2012;57(1):81-88.

167. Feng L, Yasukazu S, Nobuhiko M. Anticancer effects of fullerene [C₆₀] included in polyethylene glycol combined with visible light irradiation through ROS generation and DNA fragmentation on fibrosarcoma cells with scarce cytotoxicity to normal fibroblasts. *Oncol Res Feat Preclin Clin Cancer Therap.* 2011;19(5):203-216.
168. Feng R, Zhai WL, Yang HY, Jin H, Zhang QX. Induction of ER stress protects gastric cancer cells against apoptosis induced by cisplatin and doxorubicin through activation of p38 MAPK. *Bioch Biophys Res Commun.* 2011;406(2):299-304.
169. Feng Z, Lai Y, Ye H, Huang J, Xi XG, Wu Z. Poly (γ , L-glutamic acid)-cisplatin bioconjugate exhibits potent antitumor activity with low toxicity: A comparative study with clinically used platinum derivatives. *Cancer Sci.* 2010;101:2476-2482.
170. Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon.* 2006;44:1100-1105.
171. Florea AM, Buesselberg D. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *Neurotoxicology.* 2009;30(5):803-1010.
172. Florea AM, Buesselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351-1371.
173. Flourakis M, Prevarskaya N. Insights into Ca²⁺ homeostasis of advanced prostate cancer cells. 2009;1793(6):1105-1109.
174. Foley S, Crowley C, Smahi M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294:116-119.
175. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006;57:1-18.
176. Franskevych DV, Grynyuk II, Prylutska SV, Matyshevskaya OP. Modulation of cisplatin-induced reactive oxygen species production by fullerene C₆₀ in normal and transformed lymphoid cells. *Ukr Biochem J.* 2016;88:44-50.
177. Franskevych DV, Grynyuk II, Prylutska SV, Pasichnyk GV, Petukhov DM, Drobot LB, Matyshevskaya OP, Ritter U. Photocytotoxic effect of C₆₀ fullerene

against L1210 leukemic cells is accompanied by enhanced nitric oxide production and p38 MAP kinase activation. *Exp Oncol.* 2016;38(2):89-93.

178. Franskevych DV, Prylutska SV, Grynyuk II, Grebinyk DM, Matyshevskaya OP. Enhanced cytotoxicity of photoexcited fullerene C₆₀ and cisplatin combination against drug-resistant leukemic cells. *Exp Oncol.* 2015;37(3):187-191.

179. Franskevych D, Palyvoda K, Petukhov D, Prylutska S, Grynyuk I, Schuetze C, Drobot L, Matyshevskaya O, Ritter U. Fullerene C₆₀ penetration into leukemic cells and its photoinduced cytotoxic effects. *Nanoscale Res Lett.* 2017;12:40.

180. Freshney R. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications.* 7th Edition. Wiley-Blackwell. 2016:1-728.

181. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia.* 1997;11:1833-1841.

182. Fujita K, Morimoto Y, Ogami A, Myojyo T, Tanaka I, Shimada M, Wang WN, Endoh S, Uchida K, Nakazato T, Yamamoto K, Fukui H, Horie M, Yoshida Y, Iwahashi H, Nakanishi J. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C₆₀ fullerene particles. *Toxicol.* 2009;258(1):47-55.

183. Fukunishi Y, Mashimo T, Misoo K, Wakabayashi Y, Miyaki T, Ohta S, Nakamura M, Ikeda K. Miscellaneous topics in computer-aided drug design: Synthetic accessibility and GPU computing, and other topics. *Curr Pharm Des.* 2016;22:3555-3568.

184. Fumarel R, Murgoi G, Albert P, Hurduc A, Pascu ML. Increase of cisplatin therapeutic index through optical irradiation: a case study of choroidal metastasis. *Rom Rep Phys.* 2008;60:877-884.

185. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2014;5:1-18.

186. Gao J, Wang T, Qiu S, Zhu Y, Liang L, Zheng Y. Structure-based drug design of small molecule peptide deformylase inhibitors to treat cancer. *Molecules.* 2016;21:396.

187. Gao Z, Hedtke BM, Marsters JA, Lehman MR, Holmes T, Lucak JF, Ferguson LJC, McDonald JD, Walker NJ. Disposition of C₆₀ fullerene after inhalation (nanoC₆₀), intratracheal instillation, or intravenous injection in male F344 rats. In Society of Toxicology Annual Meeting. March 15-19. Baltimore. MD. USA. 2009.
188. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *Br J Cancer*. 1993;67:1171-1176.
189. Ge F, Li ZJ, Cao ZL. Thymoma associated with severe diarrhoea and anaemia. *Chin Med J (Engl)*. 2006;119:526-528.
190. Gelderman MP, Simakova O, Clogston JD, Patri AK, Siddiqui SF, Vostal AC, Simak J. Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: fullereneol C₆₀(OH)₂₄ induced tissue factor and ICAM-I membrane expression and apoptosis *in vitro*. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(1):59-68.
191. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. C₆₀ fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*. 2005;5(12):2578-2585.
192. Ghosh MN. Statistical analysis. Fundamentals of experimental pharmacology. Calcutta. Scientific Book Agency. 1984.
193. Glatter O. The interpretation of real-space information from small-angle scattering experiments. *J Appl Crystallogr*. 1979;12:166-175.
194. Gomes A, Fernandes E, Lima J. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*. 2005;65:45-80.
195. Goodarzi S, Da Ros T, Conde J, Sefat F, Mozafari M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Materials Today*. 2017;20(8):460-480.
196. Görlach A, Bertram K, Hudecova S. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*. 2015;6:260-271.
197. Gourdier I, Del Rio M, Crabble L, Candeil L, Copois V, Ychou M, Auffray C, Martineau P, Mehti N, Pommier Y, Pau B. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett*. 2002;529(2-3):232-236.

198. Grebinyk A, Grebinyk S, Prylutska S, Ritter U, Matyshevskaya O, Dandekar T, Frohme M. C₆₀ fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med.* 2018;124:319-327.
199. Grebinyk A, Prylutska S, Grebinyk S, Prylutsky Yu, Ritter U, Matyshevskaya O, Dandekar T, Frohme M. Complexation with C₆₀ fullerene increases doxorubicin efficiency against leukemic cells *in vitro*. *Nanoscale Res Lett.* 2019;9(1):59-70.
200. Grebinyk SM, Palyvoda KO, Prylutska SV, Grynyuk II, Samoylenko AA, Drobot LB, Matyshevskaya OP. Photoactivated fullerene C₆₀ induces store-operated Ca²⁺ entry and cytochrome c release in Jurkat cells. *Ukr Biochem J.* 2012;84(6):58-63.
201. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol.* 2010;624:25-37.
202. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440-3450.
203. Grynyuk I, Grebinyk S, Prylutska S, Mykhailova A, Franskevich D, Matyshevskaya O, Schütze C, Ritter U. Photoexcited fullerene C₆₀ disturbs prooxidant-antioxidant balance in leukemic L1210 cells. *Mat-wiss u Werkstofftech.* 2013;44(2-3):139-143.
204. Gu J, Liu J, Li Y, Zhao W, Shi J. One-pot synthesis of mesoporous silica nanocarriers with tunable particle sizes and pendent carboxylic groups for cisplatin delivery. *Langmuir.* 2012;29(1):403-410.
205. Gubskaya VP, Berezhnaya LSh, Gubaidullin AT, Faingold II, Kotelnikova RA, Konovalova NP, Morozov VI, Litvinov IA, Nuretdinov IA. Synthesis, structure and biological activity of nitroxide malonate methanofullerenes. *Org Biomol Chem.* 2007;5(6):976-981.
206. Guldi D, Asmus K. Activity of water-soluble fullerenes towards OH-radicals and molecular oxygen. *Radiat Phys Chem.* 1999;56:449-456.

207. Günes DA, Florea AM, Spletstoesser F, Büsselberg D. Co-application of arsenic trioxide (As₂O₃) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and cytotoxicity. *Neurotoxicology*. 2009;30(2):194-202.
208. Guo X, Ding R, Zhang Y, Ye L, Liu X, Chen C, Zhang Z, Zhang Y. Dual role of photosensitizer and carrier material of fullerene in micelles for chemophotodynamic therapy of cancer. *J Pharm Sci*. 2014;103(10):3225-3234.
209. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*. 1994;54(8):2095-2097.
210. Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:495-535.
211. Hamano T, Okuda K, Mashinon T, Hirobe M, Arakane K, Ryu A, Mashiko S, Nagano T. Singlet oxygen production from fullerene derivatives: effect of sequential functionalization of the fullerene core. *Chem Commun*. 1997;1:21-42.
212. Hamelers IH, Staffhorst RW, Voortman J, de Kruijff B, Reedijk J, van Bergen en Henegouwen PM, de Kroon AI. High cytotoxicity of cisplatin nanocapsules in ovarian carcinoma cells depends on uptake by caveolae-mediated endocytosis. *Clin Cancer Res*. 2009;15(4):1259-1268.
213. Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Markovic I, Trajkovic V. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol*. 2007;568(1-3):89-98.
214. Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuey E, Russo A, Trauger R, Vendemelio M, George A, Bartholomew R, Carlo D, Shaikh A, Kupperman J, Newell EW, Bessalov IA, Wallace SS, Liu Y, Rogers JR, Gibbs GL, Leahy JL, Camley RE, Melamede R, Newell MK. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J*. 2002;16(12):1550-1557.
215. Hashiba T, Saitoh Y, Asanuma N, Kouhara H, Maruo T, Fujinaka T, Kasayama S, Yoshimine T. Reduction of a pancreatic tumor after total removal of an

ACTH secreting pituitary tumor: differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocr J*. 2006;53(2):203-208.

216. Havryluk A, Bilyy R, Tolstiyak J, Kril I, Synenka M, Ząbek J, Palacz A, Bogaczewicz J, Chopyak V, Stoika R. Evaluation of immunological criteria for rheumatoid arthritis. *Cent Eur J Immunol*. 2009;34(34):176-181.

217. Hay PJ, Wadt WR. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J Chem Phys*. 1985;82:299-310.

218. He GD, He GL, Zhou RY, Pi ZB, Zhu TQ, Jiang LM, Xie YB. Enhancement of cisplatin induced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469(4):1075-1082.

219. Heinrichs S, Deppert W. Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals. *Oncogene*. 2003;22(4):555-571.

220. Hempstead J, Jones DP, Ziouche A, Cramer GM, Rizvi I, Arnason S, Hasan T, Celli JP. Low-cost photodynamic therapy devices for global health settings: characterization of batterypowered LED performance and smartphone imaging in 3D tumor models. *Sci Rep*. 2015;5:10093.

221. Hendrickson OD, Morozova OV, Zherdev AV, Yaropolov AI, Klochkov SG, Bachurin SO, Dzantiev BB. Study of distribution and biological effects of fullerene C₆₀ after single and multiple intragastrical administrations to rats. *Fullerenes, Nanotubes Carbon Nanostr*. 2014;23(7):658-668.

222. Hendrickson OD, Zherdev AV, Gmoshinskii IV, Dzantiev BB. Fullerenes: *in vivo* studies of biodistribution, toxicity, and biological action. *Nanotechnologies in Russia*. 2014;9(11-12):601-617.

223. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Baroń AE, Zeng C, Franklin WA. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003;21:3798-3807.

224. Hirsch J. An anniversary for cancer chemotherapy. *JAMA*. 2006;296(12):1518-1520.

225. Horibe S, Matsuda A, Tanahashi T, Inoue J, Kawauchi S, Mizuno S, Ueno M, Takahashi K, Maeda Y, Maegouchi T, Murakami Y, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins. *Life Sci.* 2015;124:31-40.
226. Horie M, Nishio K, Kato H, Shinohara N, Nakamura A, Fujita K, Kinugasa S, Endoh S, Yamamoto K, Yamamoto O, Niki E, Yoshida Y, Iwahashi H. *In vitro* evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C₆₀ medium dispersion. *J Biochem.* 2010;148(3):289-298.
227. Hromas RA, North C, Burns P. Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett.* 1987;36(2):197-201.
228. Hu Z, Zhang C, Huang Y, Sun S, Guan W, Yao Y. Photodynamic anticancer activities of water-soluble C(60) derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line. *Chem Biol Interact.* 2012;195(1):86-94.
229. Huang HM, Ou HC, Hsieh SJ, Chiang LY. Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fullerenol-1, carboxylate C₆₀ in PC12 cells. *Life Sci.* 2000;66(16):1525-1533.
230. Huang YL, Shen CK, Luh TY, Yang HC, Hwang KC, Chou CK. Blockage of apoptotic signaling of transforming growth factor-beta in human hepatoma cells by carboxyfullerene. *Eur J Biochem.* 1998;254(1):38-43.
231. Huang Y.-Y., Sharma S. K., Yin R, Agrawal T, Chiang LY, Hamblin MR. Functionalized fullerenes in photodynamic therapy. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10(9):1918-1936.
232. Huczko A, Lange H, Calko E. Short communication: fullerenes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerene Sci Technol.* 1999;7(5):935-939.
233. Hummelen JC, Knight BW, LePeq F, Wudl F, Yao J, Wilkins CL. Preparation and characterization of fulleroid and methanofullerene derivatives. *J Org Chem.* 1995;60:532-538.
234. Ion RM, Daicoviciu D, Filip AG, Clichici S, Muresan A. Oxidative stress effects of fullerene-porphyrin derivatives in photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2012;16:870-877.

235. Isaacs NS, Nicols PJ, Raston CL, Sandoval CA, Young DJ. Solution volume studies of a deep cavity inclusion complex of C₆₀: p-benzyl calyx[5]arene J. Chem Commun. 1997;19:1839-1840.
236. Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, Dramicanin M, Harhaji L, Raicevic N, Nikolic Z, Trajkovic V. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. Toxicol Sci. 2006;91(1):173-183.
237. Itoh T, Terazawa R, Kojima K, Nakane K, Deguchi T, Ando M, Tsukamasa Y, Ito M, Nozawa Y. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. Free Radic Res. 2011;45(9):1033-1039.
238. Jacobsen C, Honecker F. Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms. Andrology. 2015;3(1):111-121.
239. Jacobsen NR, Moller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, Wallin H. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. Fibre Toxicol. 2009;6:2.
240. Jakimov D, Bogdanovia G, Baltiæ M, Turšijan S, Aleksić L, Đorđević A, Mrđanović J, Miloradov M. Water-soluble fullerene C₆₀(OH)₂₄ modulates growth and proliferation of K562 human erythroleukemia cell line. [Електронний ресурс]. WSEAS. 2002. Режим доступу до ресурсу: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.413.1256>.
241. Jayadev S. Flow cytometric analysis of cell cycle. Exp Cell Res. 1994;207:142-151.
242. Jendželovská Z, Jendželovský R, Hilovská L, Koval J, Mikeš J, Fedoročko P. Single pre-treatment with hypericin, a St. John's wort secondary metabolite, attenuates cisplatin- and mitoxantrone-induced cell death in A2780, A2780cis and HL-60 cells. Toxicol In Vitro. 2014;28:1259-1273.
243. Jensen AW, Wilson SR, Schuster DI. Biological applications of fullerenes. Bioorg Med Chem. 1996;4:767-779.
244. Ji ZQ, Sun H, Wang H, Xie Q, Liu Y, Wang Z. Biodistribution and tumor uptake of C₆₀(OH)_x in mice. J Nanopart Res. 2006;8:53-63.

245. Jiang B, Liu JH, Bao YM, An LJ. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. *Cell Biol Int*. 2003;27(12):1025-1031.
246. Jiang Z, Chen B, Xia G, Wu Q, Zhang Y, Hong T, Zhang W, Cheng J, Gao F, Liu L, Li X, Wang X. The reversal effect of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles loaded with cisplatin on SKOV3/DDP ovarian carcinoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2009;4:107-114.
247. Jiao F, Liu Y, Qu Y, Li W, Zhou G, Ge C, Li Y, Sun B, Chen C. Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullereneol in a mouse breast cancer model. *Carbon*. 2010;48:2231-2243.
248. Jones A. Altered cellular signalling and metabolism in cisplatin cytotoxicity and chemoresistance. Diploma Thesis. London. 2011:1-211.
249. Jung K, Seidel B, Rudolph B, Lein M, Cronauer MV, Henke W, Hampel G, Schnorr D, Loening SA. Antioxidantenzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(1):127-133.
250. Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(5):510-524.
251. Kang HJ, Park JH, Yoo HS, Park YM, Cho CK, Kang IC. Effects of HAD-B1 on the proliferation of A549 cisplatin-resistant lung cancer cells. *Molec Med Rep*. 2018;17(5):6745-6751.
252. Kang S, Zhou GQ, Yang P, Liu Y, Sun BY, Huynh T, Meng H, Zhao LN, Xing GM, Chen CY, Zhao YL, Zhou RH. Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C₈₂(OH)₂₂ and its implication for de novo design of nanomedicine. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:15431-15436.
253. Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N, Saitoh Y, Miwa N. Fullerene C₆₀/liposome complex: defensive effects against UVA-induced damages in skin structure, nucleus and collagen type I/IV fibrils, and the permeability into human skin tissue. *J Photochem Photobiol B*. 2010;98(1):99-105.
254. Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. Highly hydroxylated or gamma-cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: the antioxidant ability

assessed by electron spin resonance method and beta-carotene bleaching assay. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(18):5293-5296.

255. Kaushansky K, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology.* USA: The McGraw-Hill Companies. 2010:1-2440.

256. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications. *Biomed Res Int.* 2015:621324.

257. Keller GA, Ponte ML, Di Girolamo G. Other drugs acting on nervous system associated with QT-interval prolongation. *Curr Drug Saf.* 2010;5:105-111.

258. Ki KD, Lee JM, Lee SK, Tong SY, Huh CY, Ryu JK, Kim KY. Pulmonary toxicity after a quick course of combinatorial vincristine, bleomycin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *J Korean Med Sci.* 2010;25:240-244.

259. Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, Oh GS, Moon HD, Kwon KB, Park C, Park BH, Lee HK, Chung SY, Park R, So HS. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci.* 2010;30(11):3933-3946.

260. Kintzel PE. Anticancer drug-induced kidney disorders. *Drug Saf.* 2001;24:19-38.

261. Klotz LO, Holbrook NJ, Sies H. UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. *Curr Probl Dermatol.* 2001;29:95-113.

262. Köberle B, Piee-Staffa A. The molecular basis of cisplatin resistance in bladder cancer cells. *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery.* ed. A. Canda – InTech. 2012;Chapter 13:265-290.

263. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1806(2):172-182.

264. Kondo A, Maeta M, Oka A, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N. Hypotonic intraperitoneal cisplatin chemotherapy for peritoneal carcinomatosis in mice. *Br J Cancer.* 1996;73(10):1166-1170.

265. Kopylov VB, Gavronskaya YY. Electronic and vibrational spectra of fullerenes in contact with oxygen. *Rus J Gen Chem.* 2001;71:1589-1592.

266. Kornev AB, Peregodov AS, Martynenko VM, Guseva GV, Sashenkova TE, Rybkin AY, Faingold II, Mishchenko DV, Kotelnikova RA, Konovalova NP, Balsarini J, Troshin PA. Synthesis and biological activity of a novel water-soluble methano[60]fullerene tetracarboxylic derivative. *Mendeleev Commun.* 2013;23(6):323-325.
267. Kostjukov VV, Khomytova NM, Hernandez Santiago AA, Tavera AMC, Alvarado JS, Evstigneev MP. Parsing of the free energy of aromatic–aromatic stacking interactions in solution. *J Chem Thermodyn.* 2011;43(10):1424-1434.
268. Kovichich M, Espinasse B, Auffan M, Hotze EM, Wessel L, Xia T, Nel AE, Wiesner MR. Comparative toxicity of C₆₀ aggregates toward mammalian cells: role of tetrahydrofuran (THF) decomposition. *Environ Sci Technol.* 2009;43(16):6378-6384.
269. Kozłowska E, Kopec-Szlezak J, Drela N. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1997;37:10-16.
270. Kraemer ÂB, Parfitt GM, Acosta DDS, Bruch GE, Cordeiro MF, Marins LF, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Barros DM. Fullerene (C₆₀) particle size implications in neurotoxicity following infusion into the hippocampi of Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;338:197-203.
271. Kratschmer W, Lamb LD, Fostiropoulos K, Huffman DR. Solid C₆₀: A new form of carbon. *Nature.* 1990;347:354-358.
272. Kroto HW, Heath RJ, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature.* 1985;318(6042):162-163.
273. Krusic PJ, Wasserman PN, Keizer PN, Morton JR, Preston KF. Radical reactions of C₆₀. *Science.* 1991;254(5035):1183-1185.
274. Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S. Structural damage of chicken red blood cells exposed to platinum nanoparticles and cisplatin. *Nanoscale Res Lett.* 2014;9(1):257-283.
275. Lai YL, Lin CC, Hsu SR, Yen SK. Electrochemical deposition of cisplatin on pure magnesium. *J Electrochem Society.* 2018;165(5):D196-D205.

276. Lane JE, Woody C, Davis LS, Guill MF, Jerath RS. Paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome (paraneoplastic pemphigus) in a child: case report and review of the literature. *Pediatrics*. 2004;114:e513-516.
277. Lapin NA, Vergara LA, Mackeyev Y, Newton JM, Dilliard SA, Wilson LJ, Curley SA, Serda RE. Biotransport kinetics and intratumoral biodistribution of malonodiserinolamide-derivatized [60] fullerene in a murine model of breast adenocarcinoma. *Int J Nanomed*. 2017;15:8289-8307.
278. Larner SF, Wang J, Goodman J, Altman M, Xin M, Wang K *In vitro* neurotoxicity resulting from exposure of cultured neural cells to several types of nanoparticles. *J Cell Death*. 2017;10:1-7.
279. Larson CA, Blair BG, Safaei R, Howell SB. The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol Pharmacol*. 2009;75:324-330.
280. Le Chevalier T. Adjuvant chemotherapy for resectable non-small cell lung cancer: where is it going? *Ann Oncol*. 2010;21:(7):196-198.
281. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5:227-231.
282. Lee SH, Jun BH. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *Int J Mol Sci*. 2019;20:865.
283. Lee TK, Lau TC, Ng IO. Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Canc Chemoth Pharm*. 2002;49:78-86.
284. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *NEJM*. 2003;349:474-485.
285. Leffel DJ. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:18-22.
286. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*. 2003;8(5):411-424.
287. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP, Nielsen DM. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204(3):216-237.

288. Levi N, Hantgan RR, Lively MO, Carroll DL, Prasad GL. C₆₀-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects. *J Nanobiotechnol.* 2006;4:14-25.
289. Li JZ, Jaimes KF, Aller SG. Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci.* 2014;23:34-46.
290. Li L, Davande H, Bedrov D, Smith GD. A molecular dynamics simulation study of C₆₀ fullerenes inside a dimyristoylphosphatidylcholine lipid bilayer. *J Phys Chem B.* 2007;111(16):4067-4072.
291. Li W, Chen C, Ye C, Wei T, Zhao Y, Lao F, Chen Z, Meng H, Gao Y, Yuan H, Xing G, Zhao F, Chai Z, Zhang X, Yang F, Han D, Tang X, Zhang Y. The translocation of fullerene nanoparticles into lysosome via the pathway of clathrin-mediated endocytosis. *Nanotechnol.* 2008;19:145102-145114.
292. Li WZ, Qian KX, Huang WD, Zhang XX, Chen WX. Water soluble C₆₀-liposome and the biological effect of C₆₀ to human cervix cancer cells. *Chin Phys Lett.* 1994;11:207-210.
293. Li Z, Zhang FL, Wang Z, Pan L, Shen, Y; Zhang Z. Fullerene (C₆₀) nanoparticles exert photocytotoxicity through modulation of reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activation in the MCF-7 cancer cell line. *J Nanopart Res.* 2013;15(12):2102-2112.
294. Liang XJ, Chen C, Zhao Yu, Wang PC. Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology. Multi-drug resistance in cancer, methods in molecular biology. *Methods Mol Biol.* 2010;596(21):467-488.
295. Liang XJ, Meng H, Wang Y, He H, Meng J, Lu J, Wang PC, Zhao Y, Gao X, Sun B, Chen C, Xing G, Shen D, Gottesman MM., Wu Y, Yin JJ, Jia L. Metallofullerene nanoparticles circumvent tumor resistance to cisplatin by reactivating endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:7449-7549.
296. Liang XJ, Shen DW, Garfield S, Gottesman MM. Mislocalization of membrane proteins associated with multidrug resistance in cisplatin-resistant cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003;63:5909-5916.

297. Lin AM, Chyi BY, Wang SD, Yu HH, Kanakamma PP, Luh TY, Chou CK, Ho LT. Carboxyfullerene prevents iron-induced oxidative stress in rat brain. *J Neurochem.* 1999;72(4):1634-1640.
298. Lin AM, Fang SF, Lin SZ, Chou CK, Luh TY, Ho LT. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain. *Neurosci Res.* 2002;43:317-221.
299. Lin CH, Cheng SH, Liao WN, Wei PR, Sung PJ, Weng CF, Lee CH. Mesoporous silica nanoparticles for the improved anticancer efficacy of cisplatin. *Int J Pharm.* 2012;429:138-147.
300. Lin CM, Lu TY. C₆₀ Fullerene derivatized nanoparticles and their application to therapeutics. *Recent Pat Nanotechnol.* 2012;6(2):105-113.
301. Liu FX, Song Y. Effect SJAMP on apoptosis of HeLa and Bax, Bcl-2 gene expression. *Pract J Med.* 2010;26:2089-2091.
302. Liu JH, Cao L, Luo PG, Yang ST, Lu F, Wang H, Meziani MJ, Haque SkA, Liu Y, Lacher S, Sun YP. Fullerene-conjugated Doxorubicin in cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2010;2(5):1384-1389.
303. Liu S., Liu H., Yin Z., Guo K., Gao X. Cytotoxicity of pristine C₆₀ fullerene on baby hamster kidney cells in solution. *J Biomat Nanobiotechnol.* 2012;3:385-390.
304. Liu XY, Liu SP, Jiang J, Zhang X, Zhang T. Inhibition of the JNK signaling pathway increases sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to cisplatin by down-regulating expression of P-glycoprotein. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20:1098-1108.
305. Longchar A, Prasad SB. Ascorbic acid (vitamin C) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in tumor-bearing mice. *World J Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 2016;5:1870-1891.
306. Los G, Mcvie JG. Experimental and clinical status of intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Cancer.* 1990;26:755-762.
307. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and

functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2016;533(7602):278.

308. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.

309. Lu CYu, Yao SD, Lin WZ, Wang WZ, Lin NY, Tong YP, Rong TW. Studies on the fullerol of C₆₀ in aqueous solution with laser photolysis and pulse radiolysis. *Rad Phys Chem*. 1998;53:137143.

310. Lu F, Haque SA, Yang ST, Luo PG, Gu L, Kitaygorodskiy A, Li H, Lacher S, Sun YP. Aqueous compatible fullerene-doxorubicin conjugates. *J Phys Chem C*. 2009;113(41):17768-17773.

311. Lu L, Lee Y, Chen HW, Chiang LY, Huang HC. The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fulleranol, polyhydroxylated C₆₀, on vascular smooth muscle cells. *British J Pharmacol*. 1998;123:1097-1102.

312. Ma SH, Tan WH, Du BT, Liu W, Li WJ, Che DH, Zhang GM. Oridonin effectively reverses cisplatin drug resistance in human ovarian cancer cells via induction of cell apoptosis and inhibition of matrix metalloproteinase expression. *Mol Med Rep*. 2016;13:3342-3348.

313. Ma W, Hu J, Cheng Y, Wang J, Zhang X, Xu M. Ginkgolide B protects against cisplatin-induced ototoxicity: enhancement of Akt-Nrf2-HO-1 signaling and reduction of NADPH oxidase. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;75(5):949-959.

314. Maccio A, Madeddu C. Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy - from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(13):1839-1857.

315. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul*. 2001;41:189-207.

316. Maggini M, Scorrano G, Prato M. Addition of azomethine ylides to C₆₀: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *J Am Chem Soc*. 1993;115:9798-9799.

317. Malarczyk E, Kandefler-Szerszeń M, Jarosz-Wilkolazka A. Influence of very low doses of cisplatin on tumor cell proliferation *in vitro* and some

hematological and enzymatic parameters of healthy rats. *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 2003;1:123-137.

318. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9100-9106.

319. Mansson E, Stridh H, Albertioni F. Resistance to mitochondrial- and Fas-mediated apoptosis in human Leukemic cells with acquired resistance to 9-beta-D-arabinofuranosylguanosine. *Biochem Res Commun.* 2002;21:8843-8851.

320. Mao Y, Song G, Cai Q, Liu M, Luo H, Shi M, Ouyang G, Bao S. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gastric carcinoma MGC803 cells. *Cell Biol International.* 2006;30(4):332-337.

321. Marchetti S. Effect of selected ABC-drug transporters on anticancer drug disposition *in vitro* and *in vivo*. Dissertation. Utrecht University. Utrecht. 2013:1-283.

322. Markovic SD, Zizk JB, Djavic DS, Obradovic AD, Curcic MD, Cvetkovic DM, Dordevic NZ, Ognjanovic BI, Stajn AS. Alteration of oxidative stress parameters in red blood cells of rats after chronic *in vivo* treatment with cisplatin and selenium. *Arch Biol Sci Belgrade.* 2011;63:991-999.

323. Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Kleut D, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Misirkic M, Vucicevic L, Janjetovic K, Isakovic A, Harhaji L, Babic-Stojic B, Dramicanin M, Trajkovic V. The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes. *Biomaterials.* 2007;28(36):5437-5448.

324. Mathew DG, Rooban T, Janani V, Joshua E, Rao U, Ranganathan K. Review of paraneoplastic syndromes associated with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2010;14(2):41-47.

325. Mayo YY. Biological characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother Rep.* 1972;3(2):325-330.

326. McCoy CE, O'Neill LA. The role of Toll-like receptors in macrophages. *Front Biosci.* 2008;13:62-70.

327. McGrath T, Center MS. Mechanisms of multidrugresistance in HL60 cells: evidence that as urfacemembraneprotein distinct from P-glycoprotein

contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer Res.* 1988;48:3959-3963.

328. Mchedlov-Petrosyan NO, Klochkov VK, Andrievsky GV. Colloidal dispersions of fullerene C₆₀ in water: some properties and regularities of coagulation by electrolytes. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1997;93(24):4343-4346.

329. McMartin C, Bohacek R. QXP: Powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput-Aid Mol Design.* 1997;11:333-344.

330. Meng H, Xing GM, Sun BY, Zha F, Lei H, Li W, Song Y, Chen Z, Yuan H, Wang XX, Long J, Chen CY, Liang XJ, Zhang N, Chai ZF, Zhao YL. Potent angiogenesis inhibition by the particulate form of fullerene derivatives. *ACS Nano.* 2010;4(5):2773-2783.

331. Metanawin T, Tang T, Chen R, Vernon D, Wang X. Cytotoxicity and photocytotoxicity of structure-defined water-soluble C₆₀/micelle supramolecular nanoparticles. *Nanotechnol.* 2011;22:235604-235613.

332. Milanesio ME, Alvarez MG, Rivarola V, Silber JJ, Durantini EN. Porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with high ability to form photoinduced charge-separated state as novel sensitizers for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2005;81(4):891-897.

333. Min Y, Mao C-Q, Chen S, Ma G, Wang J, Liu Y. Combating the drug resistance of cisplatin using a platinum prodrug based delivery system. *Angew Chem Int Edit.* 2012;51:6742-6747.

334. Minchenko DO, Prylutska SV, Moenner M, Minchenko OH, Prylutsky YI, Schütze C, Ritter U. Effect of C₆₀ Fullerene on the expression of ERN1 signaling related genes in human astrocytes. *Mat-wiss u Werkstofftech.* 2013;44(2-3):150-155.

335. Mohammadyani D, Modarress H, To AC, Amani A. Interactions of fullerene (C₆₀) and its hydroxyl derivatives with lipid bilayer: a coarse-grained molecular dynamics simulation. *Braz J Phys.* 2014;44:1-7.

336. Mohell N, Alfredsson J, Fransson Å, Uustalu M, Byström S, Gullbo J, Hallberg A, Bykov VJ, Björklund U, Wiman KG. APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells. *Cell Death Dis.* 2015;6: e1794.

337. Momekov G, Ferdinandov D, Bakalova A, Zaharieva M, Konstantinov S, Karaivanova M. *In vitro* toxicological evaluation of a dinuclear platinum(II) complex with acetate ligands. *Arch Toxicol*. 2006;80:555-560.
338. Montopoli M, Bellanda M, Lonardoni F, Ragazzi E, Dorigo P, Frolidi G, Mammi S, Caparrotta L. Metabolic reprogramming in ovarian cancer cells resistant to cisplatin. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(2):226-235.
339. Moor KJ, Snow SD, Kim JH. Differential photoactivity of aqueous [C₆₀] and [C₇₀] fullerene aggregates. *Environ Sci Technol*. 2015;49:5990-5998.
340. Moreno D, Zalba S, Navarro I, Tros de Ilarduya C, Garrido MJ. Pharmacodynamics of cisplatinloaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;74:265-274.
341. Mori TT, Takada H, Ito S, Matsubayashi K, Miwa N, Sawaguchi T. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. *Toxicology*. 2006;225(1):48-54.
342. Moussa F. [60] Fullerene and derivatives for biomedical applications. *Nanobiomaterials*. 2018:113-136.
343. Moussa F, Trivin F, Ceolin R, Hadchouel M, Sizaret P, Greugny V, Fabre C, Rassat A, Szwarcet H. Early effects of C₆₀ administration in Swiss mice: a preliminary account for *in vivo* C₆₀ toxicity. *Full Sci Technol*. 1996;4:21-29.
344. Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, Hamblin MR. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(5):711-719.
345. Mroz P, Tegos GP, Gali H, Wharton T, Sarna T, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(11):1139-1149.
346. Murugesan S, Mousa SA, O'Connor LJ, Lincoln II DW, Linhardt RJ. Carbon inhibits vascular endothelial growth factor- and fibroblast growth factor-promoted angiogenesis. *FEBS Lett*. 2007;581:1157-1160.

347. Myhre O, Andersen J, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2,7-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(10):1575-1582.
348. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Different.* 2016;23(6):952-961.
349. Naota M, Shimada A, Morita T, Inoue K, Takano H. Translocation pathway of the intratracheally instilled C₆₀ fullerene from the lung into the blood circulation in the mouse: possible association of diffusion and caveolae-mediated pinocytosis. *Toxicol Pathol.* 2009;37:456-462.
350. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(25):14681-14686.
351. Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43:1-7.
352. Nielsen GD, Roursgaard M, Jensen KA, Poulsen SS, Larsen ST. *In vivo* biology and toxicology of fullerenes and their derivatives. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(3):197-208.
353. Nikolic N, Vranjes-Ethuric S, Jankovic D, Ethokic D, Mirkovic M, Bibic N, Trajkovic V. Preparation and biodistribution of radiolabeled fullerene C₆₀ nanocrystals. *Nanotechnol.* 2009;20(38):385102.
354. Nishizawa C, Hashimoto N, Yokoo S, Funakoshi-Tago M, Kasahara T, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T. Pyrrolidinium-type fullerene derivative-induced apoptosis by the generation of reactive oxygen species in HL-60 cells. *Free Radic Res.* 2009;43(12):1240-1247.
355. Niu Y, Yan C. The effect of fullerenol combined with cisplatin on the proliferation of cervical cancer HeLa cells. *J Cancer Therapy.* 2016;7:232-238.
356. Niwa Y, Iwai N. Nanomaterials induce oxidized low-density lipoprotein cellular uptake in macrophages and platelet aggregation. *Circ J.* 2007;71(3):437-444.

357. Oberley T, Oberley L. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol.* 1997;12(2):525-535.
358. Ogami AY, Yamamoto K, Morimoto Y, Fujita K, Hirohashi M, Oyabu T, Myojo T, Nishi K, Kadoya C, Todoroki M, Yamamoto M, Murakami M, Shimada M, Wang WN, Shinohara N, Endoh S, Uchida K, Nakanishi J, Tanaka I. Pathological features of rat lung following inhalation and intratracheal instillation of C(60) fullerene. *Inhal Toxicol.* 2011;23(7):407-416.
359. Ohlsson C, Kley N, Werner H, LeRoith D. p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology.* 1998;139:1101-1107.
360. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, Carbone DP. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood.* 2003;101(12):4878-4886.
361. Ohno S, Strebler FR, Stephens LC, Siddik ZH, Baba H, Makino M, Khokhar AR, Bull JM. Haematological toxicity of carboplatin and cisplatin combined with whole body hyperthermia in rats. *Br J Cancer.* 1993;68:469-474.
362. Ohta M, Kawabata T, Yamamoto M, Tanaka T, Kikuchi H, Hiramatsu Y, Kamiya K, Baba M, Konno H. TSU68, an antiangiogenic receptor tyrosine kinase inhibitor, induces tumor vascular normalization in a human cancer xenograft nude mouse model. *Surg Today.* 2009;39(12):1046-1053.
363. Orfanopoulos M, Kambourakis S. Chemical evidence of singlet oxygen production from C₆₀ and C₇₀ in aqueous and other polar media. *Tetrahedron Lett.* 1995;36:435-438.
364. Orlova MA, Trofimova TP, Orlov AP, Shatalov OA. Perspectives of fullerene derivatives in PDT and radiotherapy of cancers. *Br J Med Med Res.* 2013;3(4):1731-1756.
365. Orlova MA, Trofimova TP, Shatalov OA. Fullerene nanoparticles operating the apoptosis and cell proliferation processes in normal and malignant cell. *Der Pharmacia Lett.* 2013;5(3):99-139.

366. Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D, Harrap KR. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp. Cell Res.* 1994;211:231-237.
367. Osuna S, Swart M, Sola M. On the mechanism of action of fullerene derivatives in superoxide dismutation. *Chem Eur J.* 2010;16:3207-3214.
368. Palyvoda KO, Grynyuk II, Prylutska SV, Samoilenko AA, Drobot LB, Matyshevskaya OP. Apoptosis photoinduction by C₆₀ fullerene in human leukemic T cells. *Ukr Biochem J.* 2010;82(4):121-127.
369. Panchuk R, Skorokhyd N, Chumak V. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: *in vitro* and *in vivo* study. *Croat Med J.* 2014;55:206-217.
370. Panchuk RR, Prylutska SV, Chumak VV, Skorokhyd NR, Lehka LV, Evstigneev MP, Prylutskiy YuI, Berger W, Heffeter P, Scharff P, Ritter U, Stoika RS. Application of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Nanotechnol.* 2015;11:1139-1152.
371. Pandey RK, Kumbhar BV, Sundar S, Kunwar A, Prajapati VK. Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against Leishmania donovani trypanothione reductase. *J Recept Signal Transduct Res.* 2017;37(1):60-70.
372. Park EJ, Kim H, Kim Y, Yi J, Choi K, Park K. Carbon fullerenes (C₆₀S) can induce inflammatory responses in the lung of mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;244(2):226-233.
373. Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:858-865.
374. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):886-892.

375. Partha R, Mitchell LR, Lyon JL, Joshi PP, Conyers JL. Buckysomes: fullerene-based nanocarriers for hydrophobic molecule delivery. *ASC Nano*. 2008;2:1950-1958.
376. Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, Lovelace E, Rutherford AV, Willingham MC. A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:4486-4490.
377. Patra JK, Das G, Fraceto L, Campos E, Rodriguez-Torres M, Acosta-Torres L, Diaz-Torres L, Grillo R, Swamy M, Sharma S, Habtemariam S, Shin H. Nanobased drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol*. 2018;16(1):71.
378. Pavlov G, Nazarova O, Ebel C, Mikhailova NA, Zaitseva II, Bokov SN, Litvinova LS, Afanas'eva EV, Korneeva EV, Panarin EF. Molecular characteristics of star-like polyvinyl-pyrrolidone with fullerene C₆₀ as the branching site in dilute solutions. *Russ J Appl Chem*. 2005;78(1):130-136.
379. Perše M, Večerić-Haler Ž. Cisplatin-induced rodent model of kidney injury: characteristics and challenges. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1462802.
380. Pires IM, Ward TH, Dive C. Oxaliplatin responses in colorectal cancer cells are modulated by CHK2 kinase inhibitors. *British J Pharmac*. 2010;159:1326-1338.
381. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 1997;389(6648):300-305.
382. Porter AE, Gass M, Muller K, Skepper JN, Midgley P, Welland M. Visualizing the uptake of C₆₀ to the cytoplasm and nucleus of human monocyte-derived macrophage cells using energy-filtered transmission electron microscopy and electron tomography. *Environ Sci Technol*. 2007;41(8):3012-3017.
383. Porter AE, Muller K, Skepper J, Midgley P, Welland M. Uptake of C₆₀ by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomater*. 2006;2:409-419.

384. Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;532:290-293.
385. Prylutska S, Bilyy R, Overchuk M, Bychko A, Andreichenko K, Stoika R, Rybalchenko V, Prylutsky Yu, Tsierkezos NG, Ritter U. 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(3):522-527.
386. Prylutska S, Burlaka A, Klymenko P, Grynyuk I, Prylutsky Yu, Schuetze Ch, Ritter U. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nanotechnol.* 2011;2:105-110.
387. Prylutska S, Burlaka A, Prylutsky Yu, Ritter U, Scharff P. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp Oncol.* 2011;33(3):162-164.
388. Prylutska S, Didenko G, Kichmarenko Yu, Kruts OO, Potebnya GP, Cherepanov VV, Prylutsky YuI. Effect of C₆₀ fullerene, doxorubicin and their complex on tumor and normal cells of BALB/c mice. *Biotechnol Acta.* 2014;7(1):60-65.
389. Prylutska S, Didenko G, Potebnya G, Bogutska K, Prylutsky Yu, Ritter U, Scharff P. Toxic effect of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex towards normal and tumor cells *in vitro*. *Biopolym Cell.* 2014;30(5):372-376.
390. Prylutska S, Franskevych D, Grynyuk I, Pasichnyk G, Drobot L, Matyshevska O, Ritter U. Mode of photoexcited C₆₀ fullerene involvement in potentiating of cisplatin toxicity against drug resistance L1210 cells. *Bioimpacts.* 2019;9(4):211-217.
391. Prylutska S, Grebinyk A, Lynchak O, Byelinska I, Cherepanov V, Tauscher E, Matyshevska O, Prylutsky Yu, Rybalchenko V, Ritter U, Frohme M. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2019;27(9):715-728.
392. Prylutska S, Grynyuk I, Grebinyk S, Matyshevska OP, Prylutsky YuI, Ritter U, Siegmund C, Scharff P. Comperative study of biological action of fullerenes

C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells. *Mat-wiss u Werkstofftech.* 2009;40(4):238-241.

393. Prylutska S, Grynyuk I, Matyshevskaya O, Prylutskiy Yu, Evstigneev M, Scharff P, Ritter U. C₆₀ Fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs R D.* 2014;14:333-340.

394. Prylutska S, Grynyuk I, Skaterna T, Horak I, Grebinyk A, Drobot L, Matyshevskaya O, Senenko A, Prylutskiy Yu, Naumovets A, Ritter U, Frohme M. Toxicity of C₆₀ fullerene-cisplatin nanocomplex against Lewis lung carcinoma cells. *Arch Toxicol.* 2019;93(5):1213-1226.

395. Prylutska S, Grynyuk I, Matyshevskaya OP, Prylutskiy Yu, Ritter U, Scharff P. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2008;16(5-6):698-705.

396. Prylutska S, Lynchak O, Kostjukov V, Evstigneev M, Remeniak O, Rybalchenko V, Prylutskiy Yu, Ritter U, Scharff P. Antitumor effects and hematotoxicity of C₆₀-Cis-Pt nanocomplex in mice with Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol.* 2019;41(2):106-111.

397. Prylutska S, Panchuk R, Gołuński G, Skivka L, Prylutskiy Yu, Hurmach V, Skorokhyd N, Borowik A, Woziwodzka A, Piosik J, Kyzyma O, Garamus V, Bulavin L, Evstigneev M, Buchelnikov A, Stoika R, Berger W, Ritter U, Scharff P. C₆₀ fullerene enhances cisplatin anticancer activity and overcomes tumor cells drug resistance. *Nano Res.* 2017;10(2):652-671.

398. Prylutska S, Politenkova S, Afanasieva K, Korolovych V, Bogutska K, Sivolob A, Skivka L, Evstigneev M, Kostjukov V, Prylutskiy Yu, Ritter U. A nanocomplex of C₆₀ fullerene with cisplatin: design, characterization and toxicity. *Beilstein J Nanotechnol.* 2017;8:1494-1501.

399. Prylutska S, Skivka L, Didenko G, Prylutskiy Yu, Evstigneev M, Potebnya G, Panchuk R, Stoika R, Ritter U, Scharff P. Complex of C₆₀ fullerene with Doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10:499-506.

400. Prylutskiy YI, Cherepanov VV, Evstigneev MP, Kyzyma OA, Petrenko VI, Styopkin VI, Bulavin LA, Davidenko NA, Wyrzykowski D, Woziwodzka A,

Piosik J, Kaźmierkiewicz R, Ritter U. Structural self-organization of C₆₀ and cisplatin in physiological solution. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(39):26084-26092.

401. Prylutsky Yu, Bychko A, Sokolova V, Prylutska S, Evstigneev M, Rybalchenko V, Epple M, Scharff P. Interaction of C₆₀ fullerene complexed to doxorubicin with model bilipid membranes and its uptake by HeLa cells. *Mater Sci Engineer C*. 2016;59:398-403.

402. Prylutsky YuI, Buchelnikov AS, Voronin DP, Kostjukov VV, Ritter U, Parkinson JA, Evstigneev MP. C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15(23):9351-9360.

403. Prylutsky YuI, Petrenko VI, Ivankov OI, Kyzyma OA, Bulavin LA, Litsis OO, Evstigneev MP, Cherepanov VV, Naumovets AG, Ritter U. On the origin of C₆₀ fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir*. 2014;30(14):3967-3970.

404. Pyaskovskaya ON, Kolesnik DL, Kolobov AV, Vovyanko SI, Solyanik GI. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture. *Exp Oncol*. 2008;30(4):269-275.

405. Qiao R, Roberts AP, Mount AS, Klaine SJ, Ke PC. Translocation of C₆₀ and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Lett*. 2007;7(3):614-619.

406. Qiao X, Huang C, Ying Y, Yang X, Liu Y, Tian Q. Involvement of reactive oxygen species and calcium in photo-induced membrane damage in HeLa cells by a bis-methanophosphonate fullerene. *J Photochem Photobiol B*. 2010;89(3):193-198.

407. Rabik CA, Fishel ML, Holleran JL, Kasza K, Kelley MR, Egorin MJ, Dolan ME. Enhancement of cisplatin [cis-diammine dichloroplatinum (II)] cytotoxicity by O₆-benzylguanine involves endoplasmic reticulum stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(2):442-452.

408. Rade I, Natasa R, Biljana G. Bioapplication and activity of fulleranol C₆₀(OH)₂₄. *Afr Biot*. 2008;7(25):4940-4950.

409. Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L, Baas P, Beijnen JH, Simis YJ, van Zandwijk N, Schellens JH. Relationship between Cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J Clin Oncol*. 2006;24:918-924.

410. Ramaen O, Leulliot N, Sizun C, Ulryck N, Pamard O, Lallemand JY, van Tilbeurgh H, Jacquet E. Structure of the human multidrug resistance protein 1 nucleotide binding domain 1 bound to Mg^{2+}/ATP reveals a non-productive catalytic site. *J Mol Biol.* 2006;359:940-949.
411. Rancan F, Helmreich M, Molich A, Jux N, Hirsch A, Roder B, Witt C, Bohm F. Fullerene-pyropheophorbide a complexes as sensitizer for photodynamic therapy: Uptake and photo-induced cytotoxicity on Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B: Biology.* 2005;80:1-7.
412. Rancan F, Rosan S, Boehm F, Cantrell A, Brelreich M, Schoenberger H, Hirsch A, Moussa F. Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C(60) mono-adduct and a malonic acid C(60) tris-adduct on Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B.* 2002;67(3):157-162.
413. Raof M, Mackeyev Y, Cheney MA, Wilson LJ, Curley SA. Internalization of C₆₀ fullerenes into cancer cells with accumulation in the nucleus via the nuclear pore complex. *Biomaterials.* 2012;33(10):2952-2960.
414. Rebillard A, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Curr Med Chem.* 2008;15(26):2656-2663.
415. Rieznichenko LS, Dybkova SM, Gruzina TG, Ulberg ZR, Todor IN, Lukyanova NY, Shpyleva SI, Chekhun VF. Gold nanoparticles synthesis and biological activity estimation *in vitro* and *in vivo*. *Exp Oncol.* 2012;34(1):25-28.
416. Rio Y, Nierengarten JF. Water soluble supramolecular cyclotrimeratrylene-[60]fullerene complex with potential for biological applications. *Tetrahedron Lett.* 2002;43:4321-4324.
417. Ritter U, Prylutskyi YI, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, Marchenko OA, Naumovets AG. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* 2015;23(6):530-534.
418. Rizvi S, Saleh A. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J.* 2018;26:64-70.

419. Roderick HL, Cook S. Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*. 2002;8(5):361-375.
420. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Cell Migration. Methods in Molecular Biology™*. Humana Press. 2005:1-294.
421. Rozhkov SP, Goryunov AS, Sukhanova GA, Borisova AG, Rozhkova NN, Andrievsky GV. Protein interaction with hydrated C_{60} fullerene in aqueous solutions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303:562-566.
422. Ruefli AA, Tainton KM, Darcy PK, Smyth MJ, Johnstone RW. P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation. *Cell Death and Differentiation*. 2002;9(11):1266-1272.
423. Ruoff RS, Tse DS, Malhotra M, Lorents DC. Solubility of fullerene C_{60} in a variety of solvents. *J Phys Chem*. 1993;97:3379-3383.
424. Russ KA, Elvati P, Parsonage TL, Dews A, Jarvis JA, Ray M, Schneider B, Smith PJ, Williamson PT, Violi A, Philbert MA. C_{60} fullerene localization and membrane interactions in RAW 264.7 immortalized mouse macrophages. *Nanoscale*. 2016;7(8):4134-4144.
425. Ryan J, Bateman HR, Stover A, Gomez G, Norton SK, Zhao W, Schwartz LB, Lenk R, Kepley CL. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol*. 2007;179(1):665-672.
426. Saitoh Y, Miyanishi A, Mizuno H, Kato S, Aoshima H, Kokubo K, Miwa N. Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS generation and DNA damages. *J Photochem Photobiol B*. 2011;102(1):69-76.
427. Santos SM, Dinis AM, Peixoto F, Ferreira L, Jurado AS, Videira RA. Interaction of fullerene nanoparticles with biomembranes: from the partition in lipid membranes to effects on mitochondrial bioenergetics, *Toxicol Sci*. 2014;138(1):117-129.

428. Sarin N, Engel F, Kalayda GV, Mannewitz M, Cinatl Jr, Rothweiler F, Michaelis M, Saafan H, Ritter CA, Jaehde U, Frotschl R. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0181081:1-26.
429. Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, Tao YJ, Sitharaman B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL, Colvin VL. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett*. 2004;4(10):1881-1887.
430. Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative pulmonary toxicity assessments of C₆₀ water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vitro* profiles. *Nano Lett*. 2007;7:2399-2406.
431. Scharff P, Risch K, Carta-Abelmann L, Dmytruk IM, Bilyi MM, Golub OA, Khavryuchenko AV, Buzaneva EV, Aksenov VL, Avdeev MV, Prylutskyy YuI, Durov SS. Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon*. 2004;42:1203-1206.
432. Schein S. Architecture of clathrin fullerene cages reflects a geometric constraint the head-to-tail exclusion rule and a preference for asymmetry. *J Mol Biol*. 2009;387:363-375.
433. Schein S, Sands-Kidner M. A geometric principle may guide selfassembly of fullerene cages from clathrin triskelia and from carbon atoms. *Biophys J*. 2008;94:958-976.
434. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*. 1998;5:372-380.
435. Schinazi RF, Sijbesma R, Srdanov G, Hill CL, Wudl F. Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C₆₀ fullerene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(8):1707-1710.
436. Schuetze C, Ritter U, Scharff P, Bychko A, Prylutska S, Rybalchenko V, Prylutskyy Yu. Interaction of N-fluorescein-5-isothiocyanate pyrrolidine-C₆₀ compound with a model bimolecular lipid membrane. *Mater Sci Engineer C*. 2011;31(5):1148-1150.

437. Schwarz EC, Qu B, Hoth M. Calcium, cancer and killing: The role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(7):1603-1611.
438. Scott E. McNeil. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. Humana Press. 2011:1-283.
439. Scrivens WA, Tour JM, Kreek K, Pirisi L. Synthesis of ^{14}C labeled C_{60} , its suspension in water, and its uptake by human keratinocytes. *J Am Chem Soc*. 1994;116:4517-4518.
440. Sezgin C, Sanli UA, Uslu R, Goker E. Arsenic trioxide has additive cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer line with taxanes. *Turk J Med Sci*. 2002;32:439-444.
441. Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2001;7(8):2168-2181.
442. Shah N, Dizon DS. New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncol*. 2009;5:33-42.
443. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008;9(1):105-127.
444. Sharp SY, Rogers PM, Kelland LR. Transport of cisplatin and bis-acetatoammine-dichlorocyclohexylamine Platinum (IV) (JM216) in human ovarian carcinoma cell lines: Identification of a plasma membrane protein associated with cisplatin resistance. *Clin Cancer Res*. 1995;1:981-989.
445. Shayne C. Rodents model for toxicity testing and biomarkers. *Biomarkers in Toxicology*. 2014:7-69.
446. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev*. 2012;64(3):706-721.
447. Shen H, Perez RE, Davaadelger B, Maki CG. Two 4N cell-cycle arrests contribute to cisplatin-resistance. *PLoS One*. 2013;8(4):e59848.
448. Shi J, Wang B, Wang L, Lu T, Fu Y, Zhang H, Zhang Z. Fullerene (C_{60})-based tumor-targeting nanoparticles with “off-on” state for enhanced treatment of cancer. *J Control Release*. 2016;235:245-258.

449. Shikanov A, Shikanov S, Vaisman B, Golenser J, Domb AJ. Cisplatin tumor biodistribution and efficacy after intratumoral injection of a biodegradable extended release implant. *Chemother Res Pract.* 2011;2011:175054.
450. Shimizu K, Kubota R, Kobayashi N, Tahara M, Sugimoto N, Nishimura T, Ikarashi Y. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes in three types of liver cells. *Materials.* 2013;6:2713-2722.
451. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999;399:483-487.
452. Shinohara N, Nakazato T, Tamura M, Endoh S, Fukui H, Morimoto Y, Myojo T, Shimada M, Yamamoto K, Tao H, Yoshida Y, Nakanishi J. Clearance kinetics of fullerene C₆₀ nanoparticles from rat lungs after intratracheal C₆₀ instillation and inhalation C₆₀ exposure. *Toxicol Sci.* 2010;118(2):564-573.
453. Shipelin VA, Arianova EA, Trushina EN, Avren'eva LI, Batishcheva SYu, Cherkashin AV, Soto SKh, Lashneva NV, Gmoshinskii IV, Khotimchenko SA. Toxicity-hygienic characteristic of C₆₀ fullerene under its injecting into rat gastrointestinal tract. *Gig Sani.* 2012;2:90-94.
454. Shipelin VA, Avren'eva LI, Guseva GV, Trushina EN, Mustafina OK, Selifanov AV, Soto SKh, Mal'tsev GIu, Gmoshinskii IV, Khotimchenko SA. Characterization of fullerene C₆₀ peroral toxicity to rats in the 92-day experiment. *Vopr Pit.* 2012;5:20-27.
455. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7265-7279.
456. Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, Castoro JA, Wilkins C, Friedman SH, DeCamp DL, Kenyon GL. Synthesis of fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J Am Chem Soc.* 1993;115(15):7918-7919.
457. Skivka LM, Prylutska SV, Rudyk MP, Khranovska NM, Opeida IV, Hurmach VV, Prylutskyi YI, Sukhodub LF, Ritter U. C₆₀ fullerene and its nanocomplexes with anticancer drugs modulate circulating phagocyte functions and dramatically increase ROS generation in transformed monocytes. *Cancer Nanotechnol.* 2018;9(1):8-31.

458. Skrzydewska E, Stankiewicz A, Sulkowska M. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *Mediators of Inflammation*. 2005;233-234.
459. Solaini G, Sgarbi G, Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807(6):534-542.
460. Solari R, Smithers N, Kennard N, Ray K, Grenfell S. Receptor mediated endocytosis and intracellular fate of interleukin 1. *Biochem Pharmacol*. 1994;47:93-101.
461. Song W, Tang Z, Li M, Lv S, Sun H, Deng M, Liu H, Chen X. Polypeptide-based combination of paclitaxel and cisplatin for enhanced chemotherapy efficacy and reduced side-effects. *Acta Biomater*. 2014;10:1392-1402.
462. Srdjenovic B, Milic-Torres V, Grujic N, Stankov K, Djordjevic A, Vasovic V. Antioxidant properties of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicol Mech Methods*. 2010;20(6):298-305.
463. Stankov K, Borisev I, Kojic V, Rutonjski L, Bogdanovic G, Djordjevic A. Modification of antioxidative and antiapoptotic genes expression in irradiated K562 cells upon fullereneol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticle treatment. *J Nanoscience Nanotechnol*. 2012;13:105-113.
464. Stippich K, Weiss D, Guether A, Görls H, Beckert R. Novel luminescence dyes and ligands based on 4-hydroxythiazole. *J Sulfur Chem*. 2009;30:109-118.
465. Stone JR. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Arch Biochem Biophys*. 2001;422:119-124.
466. Straface E, Natalini B, Monti D, Franceschi C, Schettini G, Bisaglia M, Fumelli C, Pincelli C, Pellicciari R, Malorni W. C3-fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability. *FEBS Lett*. 1999;454(3):335-340.
467. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2:17-29.
468. Sumner SC, Fennell TR, Snyder RW, Taylor GF, Lewin AH. Distribution of carbon-14 labeled C₆₀([¹⁴C]C₆₀) in the pregnant and in the lactating

dam and the effect of C₆₀ exposure on the biochemical profile of urine. *J Appl Toxicol.* 2010;30(4):354-360.

469. Suwalsky M, Hernández P, Villena F, Sotomayor CP. The anticancer drug cisplatin interacts with the human erythrocyte membrane. *Z Naturforsch C.* 2000;55(5-6):461-466.

470. Svergun DI. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Cryst.* 1992;25:495-503.

471. Tabata Y, Ikada Y. Biological functions of fullerene. *Pure Appl Chem.* 1999;71:2047-2053.

472. Tabata Y, Murakami Y, Ikada Y. Photodynamic effect of polyethylene glycolmodified fullerene on tumor. *Jpn J Cancer Res.* 1997;88(11):1108-1116.

473. Tachikawa T, Kumazawa H, Hori Y, Harada N, Sai S, Yamashita T, Yodosawa S, Kawamoto K. Intracellular calcium changes and chemosensitivities of human epidermoid carcinoma cell lines after exposure to cisplatin. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998;107(7):611-618.

474. Tacka KA, Dabrowiak JC, Goodisman J, Penefsky HS, Souid AK. Effects of cisplatin on mitochondrial function in Jurkat cells. *Chem Res Toxicol.* 2004;17:1102-1111.

475. Takada H, Kokubo K, Matsubayashi K, Oshima T. Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by beta-carotene bleaching assay. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(12):3088-3093.

476. Tanaka Y, Fujiwara K, Tanaka H, Maehata K, Kohno I. Paclitaxel inhibits expression of heat shock protein 27 in ovarian and uterine cancer cells. *Int J Gynecol Canc.* 2004;14(4):616-620.

477. Täuscher E, Bastos EL, Görls H, Weiß D, Beckert R. Hydroxythiazole-based fluorescent probes for fluoride ion detection. *Eur J Org Chem.* 2012;13:2535-2541.

478. The ethics of research involving animals. Nuffield Council on Bioethics. London. 2005:1-336.

479. Thomas E, Smith DC, Lee MY, Rosse C. Induction of granulocytic hyperplasia thymic atrophy, and hypercalcemia by a selected subpopulation of a murine mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1985;45:5840-5844.
480. Troshin PA, Lyubovskaya RN. Organic chemistry of fullerenes: the major reactions, types of fullerene derivatives and prospects for practical use. *Russ Chem Rev.* 2008;77(4):323.
481. Trpkovic A, Todorovic-Markovic B, Trajkovic V. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Arch Toxicol.* 2012;86(12):1809-1827.
482. Tsao N, Kanakamma PP, Luh TY, Chou CK, Lei HY. Inhibition of *Escherichia coli*-induced meningitis by carboxyfullerene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(9):2273-2277.
483. Tsao N, Wu CM, Hsu HP, Liu CC, Luh TY, Chou CK, Lei HY. Inhibition of the increased permeability of blood-brain barrier in *E.coli* coli-induced meningitis by carboxyfullerenes. *Full Sci Technol.* 2001;9:307-320.
484. Turabekova M, Rasulev B, Theodore M, Jackman J, Leszczynska D, Leszczynski J. Immunotoxicity of nanoparticles: a computational study suggests that CNTs and C₆₀ fullerenes might be recognized as pathogens by Toll-like receptors. *Nanoscale.* 2014;6(7):3488-3495.
485. Uchida I, Zhong X. Differential cytotoxicity of anticancer agents in hMutS α -deficient and -proficient human colorectal cancer cells. *Tiss Cult Res Commun.* 1999;18:301-312.
486. Uemura M, Hoshiyama M, Furukawa A, Sato T, Higuchi Y, Komeda S. Highly efficient uptake into cisplatin-resistant cells and the isomerization upon coordinative DNA binding of anticancer tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes. *Metallomics.* 2015;7(11):1488-1496.
487. Ueng TH, Kang JJ, Wang HW, Cheng YW, Chiang LY. Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerenol, a polyhydroxylated fullerene C₆₀. *Toxicol Lett.* 1997;93(1):29-37.

488. Unami A, Nishina N, Terai T, Sato S, Tamura T, Noda T, Mine Y. Effects of cisplatin on erythropoietin production in rats. *J Toxicol Sci.* 1996;21:157-165.
489. Vávrová J, Řezáčová M, Pejchal J. Fullerene nanoparticles and their anti-oxidative effects: a comparison to other radioprotective agents. *J Appl Biomed.* 2012;10:1-8.
490. Vedadi M, Lew J, Artz J, Amani M, Zhao Y, Dong AP, Wasney GA, Gao M, Hills T, Brokx S, Qiu W, Sharma S, Diassiti A, Alam Z, Melone M, Mulichak A, Wernimont A, Bray J, Loppnau P, Plotnikova O, Newberry K, Sundararajan E, Houston S, Walker J, Tempel W, Bochkarev A, Koziaradzki I, Edwards A, Arrowsmith C, Roos D, Kain K, Hui R. Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol Biochem Parasit.* 2007;151(1):100-110.
491. Velma V, Dasari S, Tchounwou P. Low doses of cisplatin induce gene alterations, cell cycle arrest, and apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Biomarker Insights.* 2016;11:113-121.
492. Vereshchaka IV, Bulgakova NV, Maznychenko AV, Gonchar OO, Prylutskyi YI, Ritter U, Moska W, Tomiak T, Nozdrenko DM, Mishchenko IV, Kostjukov AI. C₆₀ fullerenes diminish the muscle fatigue in rats comparable to N-acetylcysteine or β -alanine. *Front Physiol.* 2018;9:517.
493. Videira RA, Antunes-Madeira MC, Madeira VM. Biophysical perturbations induced by ethylaziraphos in lipid membranes. *Chem Phys Lipids.* 1999;97(2):139-153.
494. Voronin DP, Buchelnikov AS, Kostjukov VV, Khrapatyi SV, Wyrzykowski D, Piosik J, Prylutskyi YI, Ritter U, Evstigneev M.P. Evidence of entropically driven C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *J Chem Phys.* 2014;140:104909.
495. Wagstaff AJ, Brown SD, Holden MR, Craig GE, Plumb JA, Brown RE, Schreiter N, Chrzanowski W, Wheate NJ. Cisplatin drug delivery using gold-coated iron oxide nanoparticles for enhanced tumour targeting with external magnetic fields. *Inorg Chim Acta.* 2012;393:328-333.

496. Wang H, Kong L, Zhang J, Yu G, Lv G, Zhang F, Chen X, Tian J, Fu F. The pseudoginsenoside F11 ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anti-tumor activity *in vivo*. *Sci Rep*. 2014;4:4986.
497. Wang IC, Tai LA, Lee DD, Kanakamma PP, Chen CK, Luh TY, Cheng CH, Hwang KC. Water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J Med Chem*. 1999;42:4614-4620.
498. Wang L., Xiang S., Williams K.A., Dong H., Bai W., Nicosia S.V., Khochbin S., Bepler G., Zhang X., 2012. Depletion of HDAC₆ enhances cisplatin-induced DNA damage and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e44265.
499. Wang Y, McIntyre C, Mittar D. Cell cycle and DNA content analysis using the BD cycletest assay on the BD FACSVerser system. [Электронный ресурс]. BD Biosciences. 2011. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/cell-analyzers/bd-facsverse/m/1298832/resources>.
500. Warren GL, Andrews CW, Capelli AM, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, Lindvall M, Nevins N, Semus SF, Senger S, Tedesco G, Wall ID, Woolven JM, Peishoff CE, Head MS. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem*. 2006;49(20):5912-5931.
501. Watanabe T, Nakamura S, Ono T, Ui S, Yagi S, Kagawa H, Watanabe H, Ohe T, Mashino T, Fujimuro M. Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(1):93-100.
502. Watson MB, Lind MJ, Cawkwell L. Establishment of in-vitro models of chemotherapy resistance. *Anti-Cancer Drugs*. 2007;18(7):749-754.
503. Wilson SR. Biological aspects of fullerenes. *Fullerenes: Chemistry, physics and technology*. New York. John Wiley & Sons. 2000:437-465.
504. Winkler F, Kozin SV, Tong RT., Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role

of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*. 2004;6(6):553-563.

505. Wolff DJ, Mialkowski K, Richardson CF, Wilson SR. C60-Fullerene monomalonate adducts selectively inactivate neuronal nitric oxide synthase by uncoupling the formation of reactive oxygen intermediates from nitric oxide production. *Biochem*. 2001;40(1):37-45.

506. Wolff DJ, Papoiu ADP, Mialkowski K, Richardson CF, Schuster DI, Wilson SR., *Arch Biochem Biophys*. 2000;378:216-223.

507. Wong-Ekkabut J, Baoukina S, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nature Nanotechnology*. 2008;3:363-368.

508. Wood PA, Hrushesky WJ. Cisplatin-associated anemia: an erythropoietin deficiency syndrome. *J Clinical Invest*. 1995;95:1650-1659.

509. Wu Y, Wang R, Wang Y, Gao J, Feng L, Yang Z. Distinct impacts of fullerene on cognitive functions of dementia vs. non-dementia mice. *Neurotox Res*. 2019;36(4):736-745.

510. Wysokiński R, Michalska DJ. The performance of different density functional methods in the calculation of molecular structures and vibrational spectra of platinum(II) antitumor drugs: cisplatin and carboplatin. *Comput Chem*. 2001;22:901-912.

511. Xia CQ, Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol*. 2012;82(6):1008-1021.

512. Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C₆₀) topically exposed in industrial organic solvents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;242(1):29-37.

513. Xie Q, Perez-Cordero E, Echegoyen L. Electrochemical detection of C₆₀ and C₇₀: enhanced stability of fullerides in solution. *Am Chem Soc*. 1992;114:3978-3980.

514. Xu X, Li R, Ma M, Wang X, Wang Y, Zou H. Multidrug resistance protein P-glycoprotein does not recognize nanoparticle C₆₀: experiment and modeling. *Soft Matter*. 2012;8:2915-2923.
515. Xu Y, Wang C, Li Z. A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(1):3-7.
516. Yalciner MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 1999;18(34):4879-4883.
517. Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, Nakahara H, Enomoto S, Ambe F. *In vivo* biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem Biol*. 1995;2(6):385-389.
518. Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂⁻ versus ¹O₂. *J Chem Soc*. 2003;125(42):12803-12809.
519. Yamakoshi YN, Yagami T, Fukuhara K, Sueyoshi S, Miyata N. Solubilisation of fullerenes into water with polyvinylpyrrolidone applicable to biological test. *J Chem Soc Chem Commun*. 1994;4:517-518.
520. Yamashita KY, Yoshioka Y, Pan H, Taira M, Ogura T, Nagano T, Aoyama M, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda SI, Aoshima H, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C₆₀ after oral administration. *Pharmazie*. 2013;68(1):54-57.
521. Yan XD, Li M, Yuan Y, Mao N, Pan LY. Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and Taxol by two different administrations. *Oncol Rep*. 2007;17(5):1163-1169.
522. Yang X, Chen L, Qiao X, Fan C. Photo-induced damages of cytoplasmic and mitochondrial membranes by a [C₆₀]fullerene malonic acid derivative. *Int J Toxicol*. 2007;26(3):197-201.

523. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2001;38(1):17-23.
524. Yang XL, Fan CH, Zhu HS. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C(60)]fullerene derivatives and its mechanism. *Toxicol In Vitro*. 2002;16(1):41-46.
525. Yano S, Naemura M, Toshimitsu A, Akiyama M, Ikeda A, Kikuchi J, Shen X, Duan Q, Narumi A, Inoue M, Ohkubo K, Fukuzumi S. Efficient singlet oxygen generation from sugar pendant C₆₀ derivatives for photodynamic therapy. *Chem Commun*. 2015;51(93):16605-16608.
526. Ye H, Jin L, Hu R, Yi Z, Li J, Wu Y, Xi X, Wu Z. Poly (γ , l-glutamic acid)-cisplatin conjugate effectively inhibits human breast tumor xenografted in nude mice. *Biomaterials*. 2006;27:5958-5965.
527. Yin JJ, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, Wang PC, Qiu Y, Sun B, Xing G, Dong J, Liang XJ, Chen C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*. 2009;30(4):611-621.
528. Yin R, Wang M, Huang YY, Huang HC, Avci P, Chiang LY, Hamblin MR. Photodynamic therapy with decacationic [60]fullerene monoadducts: effect of a light absorbing electron-donor antenna and micellar formulation. *Nanomedicine*. 2014;10(4):795-808.
529. Yoshida Z, Takekuma H, Takekuma S, Matsubara Y. Molecular recognition of C₆₀ with γ -cyclodextrin. *Angew Chem Int Ed*. 1994;33:1597-1599.
530. Young AR. Cumulative effects of ultraviolet radiation on the skin: cancer and photoaging. *Semin Dermatol*. 1990;9:25-31.
531. Yu F, Megyesi J, Price PM. Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(1):44-52.
532. Zaffaroni N, Silvestrini R, Orlandi L, Bearzatto A, Gornati D, Villa R. Induction of apoptosis by taxol and cisplatin and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *Br J Cancer*. 1998;77(9):1378-1385.

533. Zakharian TY, Seryshev A, Sitharaman B, Gilbert BE, Knight V, Wilson LJ. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture. *J Am Chem Soc.* 2005;127:12508-12509.
534. Zhang J, Wang L, Xing Z, Liu D, Sun J, Li X, Zhang Y. Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010;10:272-282.
535. Zhang Q, Yang W, Man N, Zheng F, Shen Y, Sun K, Li Y, Wen LP. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C₆₀ nanocrystal. *Autophagy.* 2009;5(8):1107-1117.
536. Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS. Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect *in vitro*. *Mol Cancer.* 2003;2:1.
537. Zhao WL. Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways. *Leukemia.* 2010;24(1):13-21.
538. Zhou F, Wu S, Yuan Y, Chen WR, Xing D. Mitochondria-targeting photoacoustic therapy using single-walled carbon nanotubes. *Small.* 2012;8(10):1543-1550.
539. Zhou F, Xing D, Wu B, Wu S, Ou Z, Chen WR. New insights of transmembranal mechanism and subcellular localization of noncovalently modified single-walled carbon nanotubes. *Nano Lett.* 2010;10(5):1677-1681.
540. Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X, Zhu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:1885-1895.
541. Zhu J, Ji Zh, Wang J., Sun R., Zhang X, Gao Y, Sun H, Liu Y, Wang Zh, Li A, Ma J, Wang T, Jia G, Gu Y. Tumor-Inhibitory effect and immunomodulatory activity of fullerol C₆₀(OH)_x. *Small.* 2008;4(8):1168-1175.
542. Zhuge CC, Xu JY, Zhang J, Li W, Li P, Li Z, Chen L, Liu X, Shang P, Xu H, Lu Y, Wang F, Lu L, Xu GT. Fullerenol protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced premature senescence via activating SIRT1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(7):4628-4638.
543. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004;19(3):124-128.

544. Zogovic NS, Nikolic NS, Vranjes-Djuric SD, Harhaji LM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, Misirkic MS, Todorovic-Markovic BM, Markovic ZM, Milonjic SK, Trajkovic VS. Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C₆₀) on tumour cell growth *in vitro* and *in vivo* and a possible role of immunosuppression in the cancer-promoting activity of C₆₀. *Biomaterials*. 2009;30(36):6940-6946.

545. Zupanc J, Drobne D, Drasler B, Valant J, Igljic A, Kralj-Igljic V, Makovec D, Rappolt M, Sartori B, Kogej K. Experimental evidence for the interaction of C-60 fullerene with lipid vesicle membranes. *Carbon*. 2012;50(3):1170-1178.

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ**

1. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P., Prylutskiy Yu.I., Ritter U., Scharff P. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. Fuller. Nanotub. Car. Nanostruct. 2008; 16(5-6): 698–705.
2. Гарманчук Л.В., Перепелиціна О.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Матишевська О.П., Сидоренко М.В. Фулерени C₆₀ змінюють адгезивні властивості клітин раку молочної залози MCF-7. Доповіді НАНУ. 2009; 4: 164-167.
3. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Grebinyk S.M., Matyshevskaya O.P., Prylutskiy Yu.I., Siegmund C., Ritter U., Scharff P. Comparative study of biological action of fullerenes C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells. Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2009; 40(4): 238-241.
4. Матишевська О.П., **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І. Фулерени C₆₀ – біологічно активні молекули. I. Фізико-хімічні властивості та біодоступність. Біотехнологія. 2010; 3(1): 18-26.
5. Гринюк І.І., Перепелиціна О.М., **Прилуцька С.В.**, Гарманчук Л.В., Храновська Н.М., Матишевська О.П., Сидоренко М.В. Вплив фулеренів C₆₀ на виживаність клітин MCF-7 раку молочної залози за тривалої інкубації. Біотехнологія. 2010; 3(4): 75-79.
6. Schuetze C., Ritter U., Scharff P., Bychko A.V., **Prylutska S.**, Rybalchenko V.K., Prylutskiy Yu.I. Interaction of N-fluorescein-5-isothiocyanate pyrrolidine-C₆₀ compound with a model bimolecular lipid membrane. Mat. Sci. Eng. C. 2011; 31(5): 1148-1150.
7. **Prylutska S.V.**, Burlaka A.P., Yu.I. Prylutskiy, U. Ritter, P. Scharff. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. Exp. Oncol. 2011; 33(3): 162-164.

8. **Prylutska S.V.**, Burlaka A.P., Klymenko P.P., Grynyuk I.I., Prylutskyu Yu.I., Schuetze C., Ritter U. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nanotech.* 2011; 2: 105-110.

9. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Гребіник С.М., Михайлова А.Г., Франскевич Д.В., Матишевська О.П. Показники активності антиоксидантної системи у нормальних та трансформованих клітинах. *Досягн. Біол. Медиц.* 2011; 2: 31-35.

10. Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Матишевська О.П. Генерація активних форм кисню в тимоцитах щурів за дії пероксиду водню та фулерену C₆₀. *Укр. біохім. журн.* 2012; 84(2): 48-52.

11. **Prylutska S.V.**, Bilyu R.O., Overchuk M.M., Bychko A.V., Andreichenko K.O., Stoika R.S., Rybalchenko V.K., Prylutskyu Yu.I., Tsierkezos N., Ritter U. 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(3): 522-527.

12. **Прилуцька С.В.**, Кічмаренко Ю.М., Богуцька К.І., Прилуцький Ю.І. Фулерен C₆₀ та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи. *Біотехнологія.* 2012; 5(3): 9-17.

13. **Прилуцька С.В.**, Ротко Д.М., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Токсичність вуглецевих наноструктур у системах *in vitro* та *in vivo*. *Суч. Пробл. токсикол.* 2012; 3-4: 49-57.

14. Didenko G.V., **Prylutska S.V.**, Kichmarenko Yu.M., Potebnya G.P., Prylutskyu Yu.I., Slobodyanik N.S., Ritter U., Scharff P. Evaluation of the antitumor immune response to C₆₀ fullerene. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 2013; 44(2-3): 124-128.

15. Grynyuk I.I., Grebinyk S.M., **Prylutska S.V.**, Mykhailova A.G., Franskevich D.V., Matyshevska O.P., Schütze C., Ritter U. Photoexcited fullerene C₆₀ disturbs prooxidant-antioxidant balance in leukemic L1210 cells. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 2013; 44(2-3): 139-143.

16. Гринюк И.И., **Прилуцкая С.В.**, Слободяник Н.С., Чунихин А.Ю., Матышевская О.П. Агрегатное состояние pristine C₆₀ фуллерена в различных средах. *Biotechnol. Acta*. 2013; 6(6): 68-74.

17. **Прилуцька С.В.** Застосування комплексів фулерену C₆₀ із протипухлинними препаратами у хіміотерапії. *Biotechnol. Acta*. 2014; 7(3): 9-20.

18. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P., Prylutskiy Yu.I., Evstigneev M.P., Scharff P., Ritter U. C₆₀ Fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs RD*. 2014; 14: 333-340.

19. **Prylutska S.V.**, Didenko G.V., Potebnya G.P., Bogutska K.I., Prylutskiy Yu.I., Ritter U., Scharff P. Toxic effect of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex towards normal and tumor cells *in vitro*. *Biopolym. Cell*. 2014; 30(5): 372-376.

20. Franskevych D.V., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Grebinyk D.M., Matyshevskaya O.P. Enhanced cytotoxicity of photoexcited fullerene C₆₀ and cisplatin combination against drug-resistant leukemic cells. *Exp. Oncol*. 2015; 37(3): 187-191.

21. **Prylutska S.V.**, Skivka L.M., Didenko G.V., Prylutskiy Yu.I., Evstigneev M.P., Potebnya G.P., Panchuk R.R., Stoika R.S., Ritter U., Scharff P. Complex of C₆₀ Fullerene with Doxorubicin as a Promising Agent in Antitumor Therapy. *Nanoscale Res. Lett*. 2015; 10: 499-506.

22. Bychko A.V., Sokolova V.V., **Prylutska S.V.**, Bogutska K.I., Rybalchenko V.K., Evstigneev M.P., Prylutskiy Y.I., Epple M., Ritter U., Scharff P. Interaction of C₆₀ fullerene complexed to cisplatin with model bilipid membranes and its uptake by HeLa cells. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*. 2016; 47(2-3): 105-111.

23. Franskevych D.V., Grynyuk I.I., **Prylutska S.V.**, Matyshevskaya O.P. Modulation of cisplatin-induced reactive oxygen species production by fullerene C₆₀ in normal and transformed lymphoid cells. *Ukr. Biochem. J*. 2016; 88(1): 44-50.

24. Franskevych D.V., Palyvoda K.O., Petukhov D.M., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Schuetze C., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Ritter U. Fullerene C₆₀ penetration into leukemic cells and its photoinduced cytotoxic effects. *Nanoscale Res. Lett*. 2017; 12: 40-49.

25. **Prylutska S.V.**, Panchuk R.R., Gołński G., Skivka L.M., Prylutskiy Yu.I., Hurmach V.V., Skorokhyd N.N., Borowik A., Wozniowiczka A., Piosik J.,

Kyzyma O.A., Garamus V.V., Bulavin L.A., Evstigneev M.P., Buchelnikov A.P., Stoika R.S., Berger W., Ritter U., Scharff P. C₆₀ fullerene enhances cisplatin anticancer activity and overcomes tumor cells drug resistance. *Nano Research*. 2017; 10(2): 652-671.

26. **Prylutska S.V.**, Politenkova S.V., Afanasieva K.S., Korolovych V.F., Bogutska K.I., Sivolob A.V., Skivka L.M., Evstigneev M.P., Kostjukov V.V., Prylutsky Yu.I., Ritter U. A nanocomplex of C₆₀ fullerene with cisplatin: design, characterization and toxicity. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2017; 8: 1494-1501.

27. Grebinyk A.G., Grebinyk S.M., **Prylutska S.V.**, Ritter U., Matyshevskaya O.P., Dandekar T., Frohme M. C₆₀ fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 2018; 124: 319-327.

28. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Skaterna T.D., Horak I.R., Grebinyk A.G., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Senenko A.I., Prylutsky Yu.I., Naumovets A.G., Ritter U., Frohme M. Toxicity of C₆₀ fullerene-cisplatin nanocomplex against Lewis lung carcinoma cells. *Arch. Toxicol.* 2019; 93(5): 1213-1226.

29. **Prylutska S.V.**, Lynchak O.V., Kostjukov V.V., Evstigneev M.P., Remeniak O.V., Rybalchenko V.K., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. Antitumor effects and hematotoxicity of C₆₀-Cis-Pt nanocomplex in mice with Lewis lung carcinoma. *Exp. Oncol.* 2019; 41(2): 106-111.

30. **Prylutska S.V.**, Grebinyk A.G., Lynchak O.V., Byelinska I.V., Cherepanov V.V., Tauscher E., Matyshevskaya O.P., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Ritter U., Frohme M. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fuller. Nanotub. Car. Nanostruct.* 2019; 27(9): 715-728.

31. Franskevych D.V., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Pasichnyk G.V., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Ritter U. Mode of photoexcited C₆₀ fullerene involvement in potentiating of cisplatin toxicity against drug resistance L1210 cells. *Bioimpacts.* 2019; 9(4): 211-217.

32. Матышевская О.П., Паливода К.О., **Прилуцкая С.В.**, Гринюк И.И., Пасечник А.В., Петухов Д.Н., Дробот Л.Б. Индукция апоптической гибели лейкемических клеток с использованием фуллерена C₆₀ //Монография под ред.

Наумовца А.Г. Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине. Академперіодика. - Киев. - 2014. С. 524-529.

33. Матишевська О.П., Дробот Л.Б., **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Паливода К.О., Петухов Д.М. Фулерен C_{60} – модулятор апоптозу попередників Т-лімфоцитів та лейкомічних клітин //Монографія під ред. Стойки Р.С., Прилуцького Ю.І., Наумовця А.Г., та ін. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування. НВП Видавництво «Наукова думка» НАН України. - Київ. - 2017. С. 114-126.

34. Патент України на винахід “Застосування немодифікованих фулеренів C_{60} як протипухлинних агентів у терапії злоякісних новоутворень”, №98076 від 10.04.2012. / **Прилуцька С.В.**, Бурлака А.П., Прилуцький Ю.І., патентовласник КНУ ім. Тараса Шевченка.

35. Патент України на винахід “Спосіб лікування злоякісних пухлин комбінацією немодифікованих фулеренів C_{60} і доксорубіцину”, №102139 від 10.06.2013. / **Прилуцька С.В.**, патентовласник КНУ ім. Тараса Шевченка.

36. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Grebinyk S.M., Mykhailova A.G., Garmanchuk L.V., Matyshevskaya O.P. Study of fullerenes C_{60} effects on ecto-ATPase activity and calcium homeostasis in T-cells //Book of Abstracts of 1st Ukrainian-French School “Carbon Nanomaterials: Structure and Properties”.- P. 82 (Beregove, Crimea, Ukraine, 14-18 September, 2009).

37. Palyvoda K., Samoilenko A., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Drobot L., Matyshevskaya O.; Comparison of protective and cytotoxic effects of C_{60} fullerenes on normal and transformed T-lymphocytes //Ukr. Biochem. J. 2009; 81(4):110 (VII Parnas Conference, Yalta, Crimea, Ukraine, 3-7 October, 2009).

38. Garmanchuk L., Perepelytsina O., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Khranovska N., Sydorenko M., Matyshevskaya O. Effect of fullerenes C_{60} on adhesion and growth of breast adenocarcinoma MCF-7 cells //Ukr. Biochem. J. 2009; 81(4):296 (VII Parnas Conference, Yalta, Crimea, Ukraine, 3-7 October, 2009).

39. Паливода К.О., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Марченко С.М., Самойленко А.А., Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Селективний цитотоксичний вплив фотозбуджених фулеренів C_{60} на трансформовані і на нормальні Т-

лімфоцити //Мед. Хім. - 2009. - Т. 11, №3. - С. 154-155. (Всеукраїнська науково-практична конференція «Досягнення і перспективи клінічної біохімії», Тернопіль, Україна, 8-9 жовтня, 2009).

40. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Garmanchuk L., Perepelytsina O., Sydorenko M., Matyshevskya O., Prylutskyu Yu., Ritter U., Scharff P. Influence of C₆₀ fullerenes on the adhesiveness of MCF-7 cells (breast cancer) //Book of Abstracts of 216th Meeting of the Electrochemical Society. - P. 351 (Vienna, Austria, 4-9 October, 2009).

41. Паливода К.О., Самойленко А.А., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Механізми впливу фотозбуджених фулеренів C₆₀ на нормальні і трансформовані Т-клітини //Тезиси Х Юбилейной научной конференции молодых ученых «Современные проблемы экспериментальной и клинической онкологии». - С. 33-34 (Київ, Україна, 22-24 квітня, 2010).

42. Grebinyk S., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Mykhailova A., Matyshevskya O., Yu.I. Prylutskyu, Ritter U., Scharff P. The comparative study of carbon nanotubes and fullerenes C₆₀ influence on free cytosolic Ca²⁺ and ecto-ATPase activity in thymocytes and L1210 cells //Book of Abstracts of Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. - P. 248 (Beregove, Crimea, Ukraine, 6-10 September, 2010).

43. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Palyvoda K., Franskevich D., Matyshevskya O., Ritter U., Scharff P. The effect of photoexcited fullerenes C₆₀ on activity of antioxidative enzymes in Jurkat cells //Book of Abstracts of Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. - P. 250 (Beregove, Crimea, Ukraine, 6-10 September, 2010).

44. Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Матишевська О.П. Рівень цитозольного Ca²⁺ у нормальних та трансформованих Т-клітинах за дії позаклітинного АТР та фулеренів C₆₀ //Укр. біохім. журн. 2010; 82(4):169-170 (Матеріали Х Українського біохімічного з'їзду, Одеса, Україна, 13-17 вересня 2010).

45. Паливода К.О., Самойленко А.А., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Активация каспази-3 у трансформованих Т-

лімфоцитах за фотодинамічної терапії фулеренами C₆₀ //Укр. біохім. журн. 2010; 82(4):223 (Матеріали X Українського біохімічного з'їзду, Одеса, Україна, 13-17 вересня, 2010).

46. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Паливода К.О., Гребіник С.М., Михайлова А.Г., Франкевич Д.В., Матишевська О.П. Продукування активних форм кисню та активність антиоксидантних ферментів у нормальних та трансформованих Т-клітинах за дії фотозбуджених фулеренів C₆₀ //Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства. - С. 223 (Луцьк, Україна, 22-25 червня, 2011).

47. **Прилуцька С.В.**, Бурлака А.П., Прилуцький Ю.І. Ангіогенна дія фулеренів C₆₀ //Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства. - С. 112-113 (Луцьк, Україна, 22-25 червня, 2011).

48. **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Матишевська О.П. Біологічні ефекти вуглецевих наноструктур у клітинах різних типів //Тези доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства. - С. 113-114 (Луцьк, Україна, 22-25 червня, 2011).

49. Grebinyk S., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Palyvoda K., Mykhailova A., Matyshevskaya O. Modulation of ROS production and cytosolic Ca²⁺ homeostasis by fullerenes C₆₀ in oncotransformed T-cells //FEBS J. 2011; 278(1):157 (Materials of 36th FEBS congress "Biochemistry for Tomorrow's Medicine", Torino, Italy, 25-30 June, 2011).

50. Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Михайлова А.Г., Франкевич Д.В. Продукування активних форм кисню та активність антиоксидантних ферментів у нормальних та трансформованих Т-клітинах за дії фотозбуджених фулеренів C₆₀ //Матеріали VI Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери». - С. 68 (Харків, Україна, 22-25 листопада, 2011).

51. Михайлова А.Г., Франкевич Д.В., Гребіник С.М., Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.** Порівняльна характеристика продукування активних форм кисню й активності антиоксидантних ензимів у нормальних і трансформованих Т-клітинах за дії фотозбуджених фулеренів C₆₀ //Збірник тез VII міжнародної

наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» . - С. 64 (Львів, Україна, 3-6 квітня, 2012).

52. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Гребіник С.М., Михайлова А.Г., Франскевич Д.В. Ефекти фулерена C₆₀ на стан антиоксидантної системи нормальних і трансформованих клітин //Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття». - С. 38 (Київ, Україна, 5 квітня, 2012).

53. Grebinyk S., Palyvoda K., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Samoilenko A., Drobot L., Matyshevskaya O. Induction of human leukemic cells apoptosis by photoexcited fullerenes C₆₀ is followed by remodeling of intracellular Ca²⁺ fluxes //FEBS J. 2012; 279(1):52 (Materials of 37th FEBS congress «From Single Molecules to Systems Biology». Sevilla, Spain, 4-9 September, 2012).

54. Didenko G., Kichmarenko Yu., **Prylutska S.**, Potebnya G., Prylutsky Yu., Ritter U., Scharff P. Evaluation of antitumor immune response of C₆₀ fullerenes and xenogeneic vaccine //Materials of 4th German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 162 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

55. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Klymenko P., Ritter U., Scharff P. Antitumor action of fullerenes C₆₀ and doxorubicin *in vitro* //Materials of 4th German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 167 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

56. Grebinyk S., Palyvoda K., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Mykhailova A., Franskevich D., Drobot L., Matyshevskaya O., Scharff P. Photoexcited fullerene C₆₀ induced endoplasmic reticulum-mitochondria Ca²⁺ fluxes and apoptosis in leukemic cells //Materials of 4th German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 193 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

57. Mykhailova A., Grebinyk S., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Franskevich D., Matyshevskaya O., Ritter U. Reactive oxygen species production and antioxidant system status in transformed cells treated with fullerenes C₆₀ //Materials of 4th

German-Ukrainian symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» - P. 92 (Ilmenau, Germany, 18-20 September, 2012).

58. **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Франскевич Д.В., Михайлова А.Г., Матишевська О.П. Вплив фулерену C_{60} і доксорубіцину на активність антиоксидантних ензимів у тканинах тварин-пухлиноносіїв з карциномою Льюїса //Матеріали XII Міжнародної конференції з біоніки і прикладної біофізики. - С. 66 (Київ, Україна, 28-29 березня, 2013).

59. Franskevych D., Grebinyk S., **Prylutska S.**, Grynyuk I. Photoexcited Fullerene C_{60} intensifies endoplasmic reticulum-mitochondria Ca^{2+} fluxes in leukemic cells // Materials of Cell Technology Week. - P.37 (Kyiv, Ukraine, 14-17 May, 2013).

60. Mykhailova A., **Prylutska S.**, Grynyuk I. Reactive oxygen species production in leukemic cells under action of photoexcited fullerene C_{60} . // Materials of Cell Technology Week. - P.56. (Kyiv, Ukraine, 14-17 May, 2013).

61. **Prylutska S.**, Pasichnyk G., Grynyuk I., Matyshevskaya O., Drobot L. Modulation of L1210 cells sensitivity to cisplatin by treatment with fullerene C_{60} // FEBS J. 2013;280(1):323-324 (Materials of 38th FEBS congress, S.-Petersburg, Russia, 4-8 July, 2013).

62. Mykhailova A., Franskevych D., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Matyshevskaya O. Prooxidant effect of photoexcited fullerene C_{60} in leukemic cells // Abstract book of Summer school Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013). - P.406 (Bukovel, Ukraine, 25 August-1 September, 2013).

63. **Prylutska S.**, Grynyuk I., Klymenko P., Mykhailova A., Franskevych D., Matyshevskaya O., Prylutskiy Yu., Ritter U., Sharff P. Antioxidant and antitumor effect of C_{60} fullerene on Lewis lung carcinoma model // Abstract book of 2nd Ukrainian-French school-seminar «Carbon Nanomaterials: Structure and Properties» - P. 84-85 (Beregove, Crimea, Ukraine, 16-20 September, 2013).

64. **Prylutska S.**, Kichmarenko Yu., Didenko G., Skivka L., Prylutskiy Yu., Ritter U., Scharff P. C_{60} fullerene in combination with doxorubicin as a perspective agent in antitumor therapy // Тезиси IV Международной научной конференции

«Нанорозмерные системы: строение, свойства, технологии» - Р. 474 (Київ, Україна, 19-22 листопада, 2013).

65. **Прилуцька С.В.**, Гринюк І.І., Франкевич Д.В., Гребіник Д.М., Пасічник Г.В., Дробот Л.Б., Матишевська О.П. Позаядерні ефекти ДНК-ушкоджувальних препаратів у лейкемічних клітинах //Ukr. Biochem. J. 2014;86(5):129 (Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, Київ, Україна, 6-10 жовтня, 2014).

66. Гринюк І.І., **Прилуцька С.В.**, Франкевич Д.В., Гребіник А.Г., Матишевська О.П. Продукування активних форм кисню та азоту в трансформованих клітинах за дії фулерену C_{60} //Ukr. Biochem. J. 2014;86(5):181 (Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, Київ, Україна, 6-10 жовтня, 2014).

67. Гринюк І., **Прилуцька С.**, Франкевич Д., Петухов Д., Шютце К., Дробот Л., Матишевська О. Агрегатний стан фулерену C_{60} у фізіологічному середовищі та проникнення наноструктури у трансформовані клітини // Збірник тез 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. - С. 103 (Ужгород, Україна, 17-20 вересня, 2014).

68. Franskevich D.V., Grynyuk I.I., **Prylutska S.V.**, Matyshevskaya O.P. Photoexcited fullerene C_{60} enhances cisplatin antineoplastic action in drug – resistant leukemic cells // Book of abstracts 22nd International Student Congress of (Bio)Medical sciences. - P. 577 (Groningen, Netherlands, 2-5 June, 2015).

69. Franskevich D., Grebinyk A., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Matyshevskaya O. Intensification of extranuclear effects of cisplatin promotes cytotoxicity towards drugresistant leukemic cells // FEBS J. 2015;282(1):458 (Abstracts of 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life, Berlin, Germany, 4-9 July, 2015).

70. Franskevich D., Grebinyk A., Grynyuk I., **Prylutska S.**, Matyshevskaya O. Cytotoxic effect of photoexcited fullerene C_{60} nanostructure in leukemic cells // Book of abstracts Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research. - P. 48 (Budva, Montenegro, 8-12 June, 2015).

71. Pasichnyk G., Drobot L., **Prylutska S.**, Grynyuk I., Franskevich D., Matyshevskaya O., Ritter U. Fullerene C_{60} modulates proliferative activity of leukemic

L1210 cells resistant to cisplatin // Book of abstracts V Ukrainian-Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. - P. 279 (Kyiv, Ukraine, 21-25 September, 2015).

72. Franskevich D.V., **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P., Ritter U., Sharff P. Combined treatment with cisplatin and photoexcited fullerene C₆₀ potentiates cytotoxicity against drug – resistant leukemic cells // Book of abstracts V Ukrainian-Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. - P. 282 (Kyiv, Ukraine, 21-25 September, 2015).

73. Grebinyk A., **Prylutska S.**, Matyshevskaya O., Dandekar T., Frohme M. Fullerene C₆₀-Doxorubicin Conjugate for Effective Drug Delivery *in vitro* // Abstracts of 9th Meeting of Engineering of Functional Interfaces at the Technical University of Applied Sciences. - P. 36 (Wildau, Germany, 3-5 July, 2016).

74. Grynyuk I.I., Hurmach V.V., **Prylutska S.V.**, Matyshevskaya O.P., Slobodyanik M.S., Prylutskyi Yu.I. C₆₀ fullerene interacts with human serum // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2016) . - P. 465 (Lviv, Ukraine, 24-27 August, 2016).

75. Franskevich D., Grynyuk I.I., **Prylutska S.V.**, Pasichnyk G.V., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Ritter U. Photoexcited fullerene C₆₀ overcomes resistance of leukemic cells to cisplatin by activation of proapoptotic pathways // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017). - P. 27 (Chernivtsi, Ukraine, 23-26 August, 2017).

76. Grebinyk A., **Prylutska S.**, Prylutskyi Yu., Ritter U., Matyshevskaya O., Dandekar T., Frohme M. Apoptosis induction in human leukemic cells with photoexcited C₆₀ fullerene-doxorubicin conjugate // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). - P. 14 (Kyiv, Ukraine, 27-30 August, 2018).

77. **Prylutska S.V.**, Grynyuk I.I., Skaterna T.D., Horak I.R., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Prylutskyi Yu.I., Slobodyanik M.S., Ritter U. Antitumor activity of C₆₀ fullerene-cisplatin nanocomplex against Lewis lung carcinoma cells // Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). - P. 77-78 (Kyiv, Ukraine, 27-30 August, 2018).

78. Grebinyk A., **Prylutska S.**, Frohme M., Matyshevskya O. Apoptosis induction in human leukemic cells with C₆₀ fullerene LED-mediated photodynamic therapy // Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (Special Issue): P. 42. (Materials of FEBS+Meeting – XI Parnas Conference, Kyiv, Ukraine, 3-5 September, 2018).

79. **Прилуцька С.**, Гребіник А., Гринюк І., Линчак О., Дробот Л., Матишевська О. C₆₀ фулерен та його комплекс з цисплатином для застосування у протипухлинній терапії // Мед. Клін. Хімія. 2019; 21.(3): 281-282. (Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, Тернопіль, Україна, 30 вересня - 4 жовтня, 2019).

ЕКСПЕРТНИЙ ВИСНОВОК ЩОДО ЕФЕКТИВНОСТІ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
КАФЕДРА ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ЕКОНОМІКИ ФАРМАЦІЇ**



м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69
тел. (0322) 276-86-39, факс 276-85-93.
e-mail: oef1784@gmail.com,
kaf_organizationpharm@meduniv.lviv.ua



ЕКСПЕРТНИЙ ВИСНОВОК

щодо ефективності впровадження результатів дисертаційної роботи
Прилуцької С.В.

**«Розробка технології посилення протипухлинної активності цисплатину
за використання C₆₀ фулерену»**,

поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
зі спеціальності 03.00.20 - біотехнологія

За даними Національного канцер-реєстру України (<http://www.ncru.inf.ua/publications/index.htm>) загальна онкозахворюваність складає 384,7 осіб на 100 000 осіб. Серед неї, зокрема виділяється рак легеневої системи, захворюваність яким складає 35 хворих на 100 000 осіб. Загальна кількість випадків хворих у 2019р. становила 12 538. При цьому **ефективність лікування хворих на рак легень складає 58,9%**, позаяк такий відсоток осіб не прожив один рік з моменту встановлення діагнозу. Цей показник є удвічі вищим від середньої ефективності лікування усіх злоякісних новоутворень (28,2%).

У Національний перелік основних лікарських засобів (ЛЗ) (https://moz.gov.ua/uploads/0/3799-nacperelic_dodatok_web.pdf), до якого включені якісні, ефективні, безпечні та економічно доцільні ЛЗ, необхідні для забезпечення надання медичної допомоги населенню у закладах охорони здоров'я незалежно від форми власності, для лікування раку легень зачислено лише 6 ЛЗ за міжнародною непатентованою назвою (за алфавітом):

- Вінорельбін (zareєстровано в Україні (<http://www.drlz.com.ua/>) 2 торговельних назви (ТН) іноземного виробництва);
- Гемцитабін (10 ТН, з них одна українська);
- Етопозид (8 ТН, з них одна українська);
- Карбоплатин (9 ТН іноземного виробництва);
- Паклітаксел (16 ТН, з них одна українська);
- Цисплатин (5 ТН іноземного виробництва).

Отже, серед 50 зареєстрованих ТН ЛЗ для лікування раку легень лише 3 ТН українського виробництва, тобто **індекс імпортозалежності за цією**

групою ЛЗ складає 94% і його значення є майже на третину більшим від такого (66,4%) для усіх зареєстрованих в Україні ЛЗ.

Тому актуальним і важливим є розвиток вітчизняного виробництва ЛЗ для лікування хворих раком, у т.ч. легень. При цьому імпортозаміщення насамперед має передбачати не розширення числа вже наявних генериків, а **виробництво інноваційних вітчизняних ЛЗ.**

Власне біотехнологічні розробки, заявлені Прилуцькою С.В. у дисертаційній роботі, спрямовані на інноваційне фармацевтичне імпортозаміщення. Зокрема варто детальніше зупинитися на перспективності використання новоствореного водорозчинного стабільного нековалентного наноконкомплексу C₆₀-цисплатин для національної охорони здоров'я.

Згідно даних [S. Prylutska et al. C₆₀ fullerene enhances anticancer activity of cisplatin *in vitro* and *in vivo* and facilitates circumvention of drug resistance in tumor cells. *Nano Res.* – 2017. – V. 10, N 2. – P. 652-671.; S.V. Prylutska et al. Antitumor effects and hematotoxicity of C₆₀-Cis-Pt nanocomplex in mice with Lewis lung carcinoma. *Exp. Oncol.* – 2019. - V. 41, N 2. - P. 106-111.] наноконкомплекс C₆₀-цисплатин у дозі 1,5 мг/кг (0,2 мл) вводився внутрішньочеревно мишам з перешепленою пухлиною упродовж 10 днів через день (5 введень). Для порівняння використовували у такій же дозі цисплатин і C₆₀ фулерен. За даними табл. 1 індекс пригнічення метастазування цисплатином (ІПМ) складає 57,1%, C₆₀ фулереном – 73,2% і наноконкомплексом C₆₀-цисплатин - 75,0%, що засвідчує високу ефективність новоствореного наноконкомплексу.

Таблиця 1

ІПМ у мишей цистапластином, C₆₀ фулереном і наноконкомплексом C₆₀-цисплатин (на основі моделі карциноми легені Льюїс)

Група тварин	Кількість метастазів пухлини	Загальний об'єм (мм ³) метастазів у легені	ІПМ, %
Контрольна група (внутрішньочеревне введення фізрозчину), n=10	13	V _к = 112±8	-
Група 1 (внутрішньочеревне введення водного розчину C ₆₀ фулерену), n=10	7	V _{д1} = 30±2*	73,2
Група 2 (внутрішньочеревне введення цисплатину), n=10	12	V _{д2} = 48±3*	57,1
Група 3 (внутрішньочеревне введення наноконкомплексу C ₆₀ -цисплатин), n=10	9	V _{д3} = 28±2*	75,0
ІПМ = (1 – V _д /V _к) × 100%			

Відповідно до Реєстру оптово-відпускних цін (ОВЦ) на ЛЗ станом на 07.02.2020 р. (https://moz.gov.ua/uploads/3/18810-reestr_lz_stanom_na_07_02_20.pdf) в Україні задекларовані ОВЦ концентрату для розчину для інфузій 3 з 5 ТН цисплатину (табл. 2), тобто їх можуть закуповувати заклади охорони здоров'я, що повністю або частково фінансуються з державного та місцевих бюджетів.

Таблиця 2

Задекларовані ОБЦ ТН концентрату для розчину для інфузій цисплатину

ТН цисплатина	Дозування і форма випуску	Виробник, країна	ОБЦ, дол. США	
			1 флакона	1 г субстанції
Цисплатина Аккорд	1 мг/мл по 100 мл у флаконі	Інтас Фармасьютікалз Лімітед, Індія / Аккорд Хелскеа Лімітед, Велика Британія	33,24	332,4
Цисплатин-мілі	0,5 мг/мл по 100 мл (50 мг) у флаконі	Венус Ремедіс Лімітед, Індія	8,88	177,6
Цисплатин	1 мг/мл по 10 мл у флаконі	Сіндан Фарма СРЛ, Румунія	10,0	1000
	1 мг/мл по 50 мл у флаконі		30,0	600

Для подальшої характеристики взято мінімальну задекларовану ОБЦ 1 г субстанції концентрату для розчину для інфузій цисплатину-мілі. При цьому за даними доклінічних досліджень розраховано показник «вартість-ефективність» для цисплатину, С₆₀ фулерену і наноконкомплексу С₆₀-цисплатин (табл. 3).

Таблиця 3

Показники «вартість-ефективність» пригнічення метастазування цисплатином, С₆₀ фулереном і наноконкомплексом С₆₀-цисплатин (на основі моделі трансплантованої карциноми легені Льюїс у мишей)

Назва концентрату для розчину для інфузій	ОБЦ, дол. США		Вартість курсу (7,5 мг/кг), цент США	ПМ, %	Співвідношення «вартість-ефективність» (ПМ), %
	1 флакона	1 г субстанції			
Цисплатин (0,5 мг/мл – 100,0)	8,88	176,0	1,32	57,1	2,33
С ₆₀ фулерен (1 мг/мл – 100,0)	10,0*	100,0	0,75	73,2	1,02
Наноконкомплекс С ₆₀ -цисплатин (2 мг/мл – 180,0)	33,0*	91,7	0,46	75,0	0,61

*за даними дисертантки Прилуцької С.В.

З'ясовано, що новостворений наноконкомплекс С₆₀-цисплатин є суттєво корисним з точки зору показника «вартість-ефективність».

Доцільно зазначити, що у зв'язку з невисокою ефективністю ТН цисплатину, його здебільшого не назначають індивідуально, а за комбінації з іншими ЛЗ. У табл. 4 наведена вартість схем фармакотерапії раку легень за участі цисплатину, а також новоствореного наноконкомплексу С₆₀-цисплатин на прикладі середньостатистичного українця (зріст 170 см (<https://1news.com.ua/ukraine/seredniy-zrist-ukrayintsiv-syagnuv-170-5-santimetriv.html>), вага 74 кг (<http://mtrk.com.ua/news/20686-----74-.html>), розрахована за калькулятором сервісу Хемотека (<https://chemoteka.com.ua/ua/calculator>).

Таблиця 4

Вартість схем фармакотерапії раку легень
за участі цисплатину та наноконплексу C₆₀-цисплатин

Назва схеми	Кількість циклів за перерви 22 дні	Вартість	
		грн.	дол. США
Цисплатин (141,75 мг) / Паклітаксел (151,2 мг) в першій день	6	19845	715,55
Цисплатин (141,75 мг в перший день) / Гемцитабін (2362,5 мг в перший і 8 день)	6	31468,5	1133,07
Цисплатин (189 мг в перший день) / Вінорельбін (47,25 мг в перший, 8, 15 і 22 день)	6	35154	1265,77
Цисплатин (151,2 мг в перший день) / Вінорельбін (56,7 мг в перший і 8 день)	6	22680	816,63
Цисплатин (189 мг в перший день) / Вінорельбін (9,45 мг в 1-5, 8-12, 15-19, 22-26 день)	6 (через 26 днів)	75878	2732,1
Гемцитабін (2362,5 мг в перший і 8 день) / Цисплатин (151,2 мг в перший день)	6	15972,7	575,12
Наноконплекс C ₆₀ -цисплатин (94,5-226,8 мг в перший день)*	6	x	124,84
*За аналогією щодо одноразового введення цисплатину (інструкція для медичного застосування - http://www.drlz.com.ua/) в дозі 120 мг/м ² поверхні тіла (1,89 м ² для особи зростом 170 см та вагою 74 кг): 226,8 мг × 6 × 0,0917 = 124,84 дол. США			

Таким чином, перспективна вартість лікування раку легень новоствореним наноконплексом C₆₀-цисплатин (124,84 дол. США за повний курс лікування) є значно меншою від чинних схем фармакотерапії за участі цисплатину (575,12 - 2732,1 дол. США за повний курс лікування). Виходячи з охоплення хворих раком легень (12 538 осіб), обсяг виробництва наноконплексу C₆₀-цисплатин (концентрат для розчину для інфузій 2 мг/мл – 180,0) складатиме: 47 394 флаконів загальною вартістю 1 млн 564 тис. дол. США.

Висновок: запропонований наноконплекс C₆₀-цисплатин є перспективним інноваційним ЛЗ, володіє значно вищою протипухлинною ефективністю порівняно з вільним цисплатином, мінімізуючи його побічну дію щодо нормальних клітин та органів, є суттєво корисним за співвідношенням «вартість-ефективність» - перспективна вартість фармакотерапії ним раку легень є нижчою від чинних схем лікування; очікувана вартість імпортозаміщення при переході на розроблений інноваційний ЛЗ становить 1 млн 564 тис. дол. США на рік.

Д. фарм. н., проф.,
завідувач кафедри організації та економіки фармації
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького

Богдан Громовик

Львів, 30 квітня 2020 р.

