

**Перспективы водных растворов фуллеренов  
 $C_{60}$  и  $C_{70}$  для лечения онкологических и  
нейродегенеративных заболеваний**

**Е.А. Кизима**

*Лаборатория нейтронной физики им. И.М.Франка  
Объединенный институт ядерных исследований*

*Киевский национальный университет  
имени Тараса Шевченко*

# Сотрудничество

М.В. Авдеев<sup>1</sup>, В.Л. Аксенов<sup>1,2</sup>, Л.А. Булавин<sup>3</sup>, А.И. Иванов<sup>1</sup>, И.В. Кошлань<sup>1</sup>,  
Ю. Прилуцкий<sup>3</sup>, М.В. Коробов<sup>4</sup>, И.В. Михеев<sup>4</sup>, В.М. Гарамус<sup>5</sup>, L. Almasy<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

<sup>2</sup>Российский научный центр "Курчатовский институт", Москва

<sup>3</sup>Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва

<sup>5</sup>GKSS Research Centre, Geesthacht, Germany

<sup>6</sup>Wigner Research Center for Physics, Budapest



# Содержание



*Водные растворы фуллеренов  $C_{60}$  и  $C_{70}$ :  
Проблемы и перспективы их биоприменения*



*Противоопухолевая активность фуллеренов*



*Перспективность  $C_{60}$  в качестве  
антиамилоидогенных препаратов*



# Ключевые моменты в развитии биорелевантных растворов фуллерена для биомедицинских применений

## Разные методы приготовления

### Наличие токсичных примесей

Deguchi, et al. // Adv.Mater. 18(2006)729  
Andrievsky, G. et al. // Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct. 13 (2005)363

### Стабильность растворов

Avdeev M.V. et al. // Langmuir. 20(2004) 4363  
Prylutskyy Y. et al. // Langmuir 30(2014)3967

### Различные структурные и физические свойства растворов

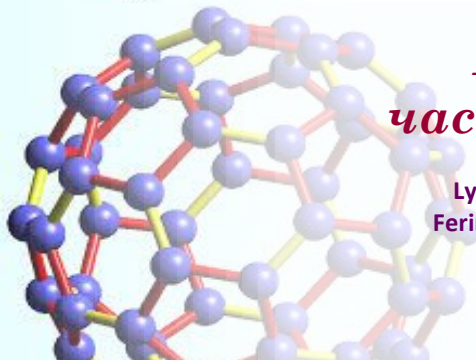
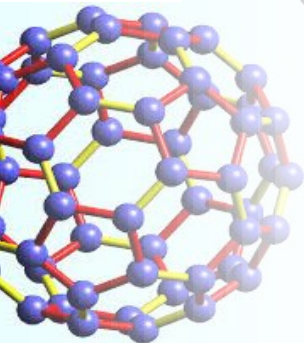
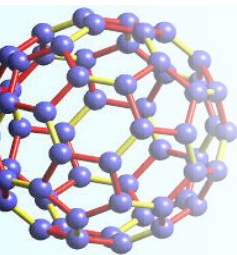
Sayes C.M. et al. // Nano Letters 4(2004)10 1881  
Dhawan A. et al. // Environ. Sci. Technol. 40 (2006)23 7394

### Влияние размера частиц на токсичность

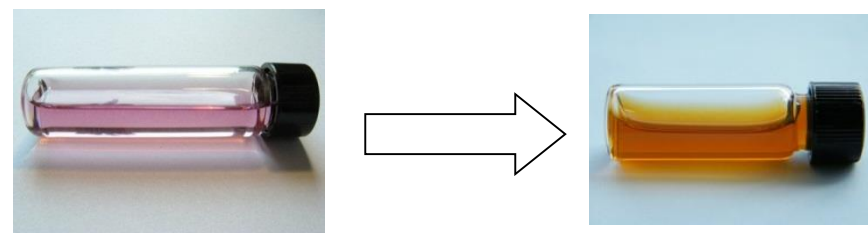
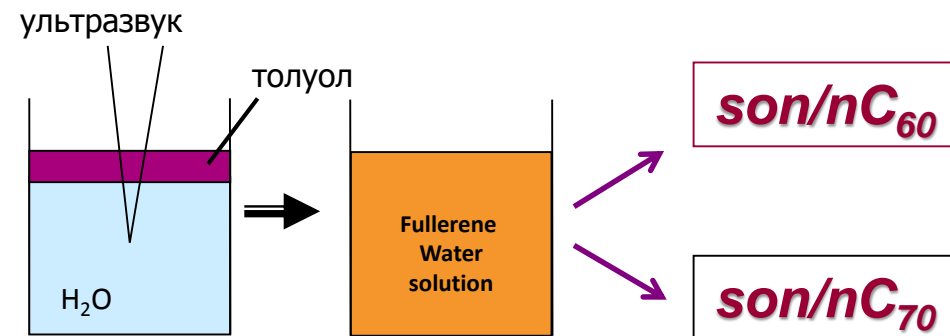
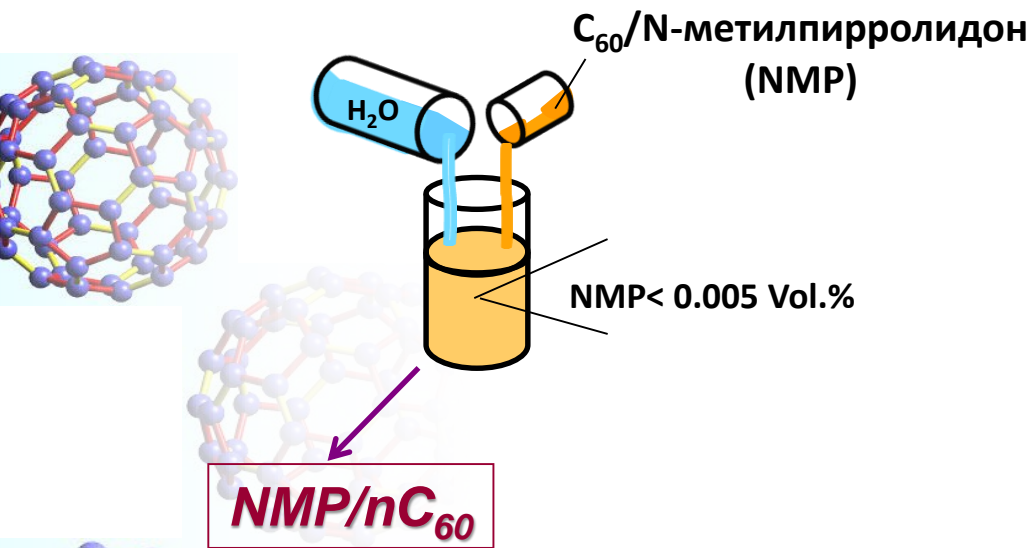
Lyon D.Y. et al. // Environ. Sci. Technol. 40(2006)4360  
Ferin J. et al. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 6(1992)535

### Взаимодействие $C_{60}$ и клеток организма

Fang. J. et al. // Environ. Sci. Technol. 41(2007) 2636



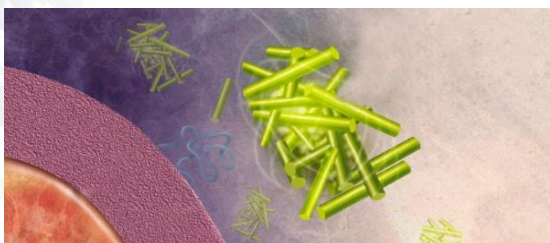
# Немодифицированные растворы фуллеренов



Нейродегенеративные заболевания



Амилоидные фибриллы



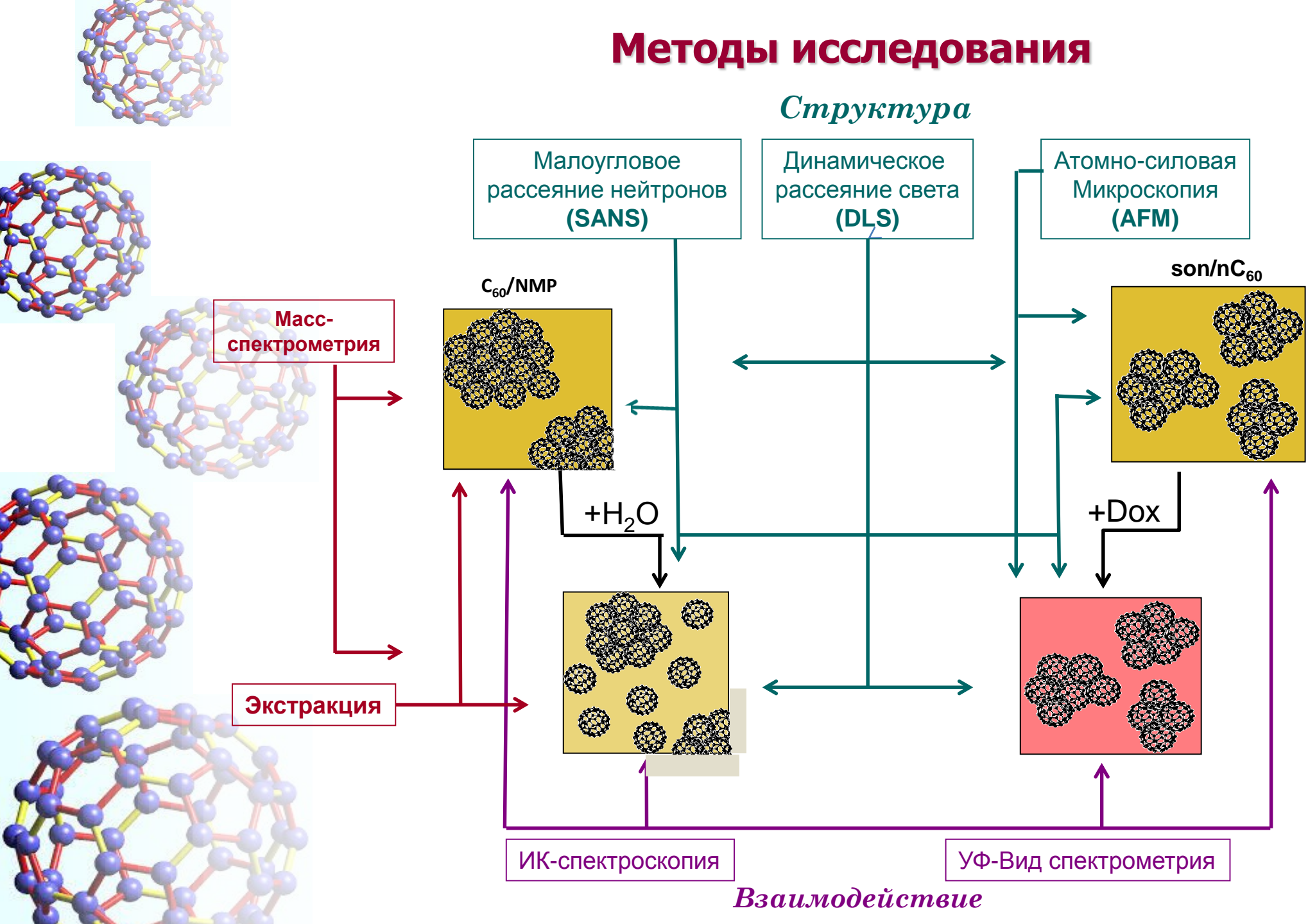
Онкологические заболевания

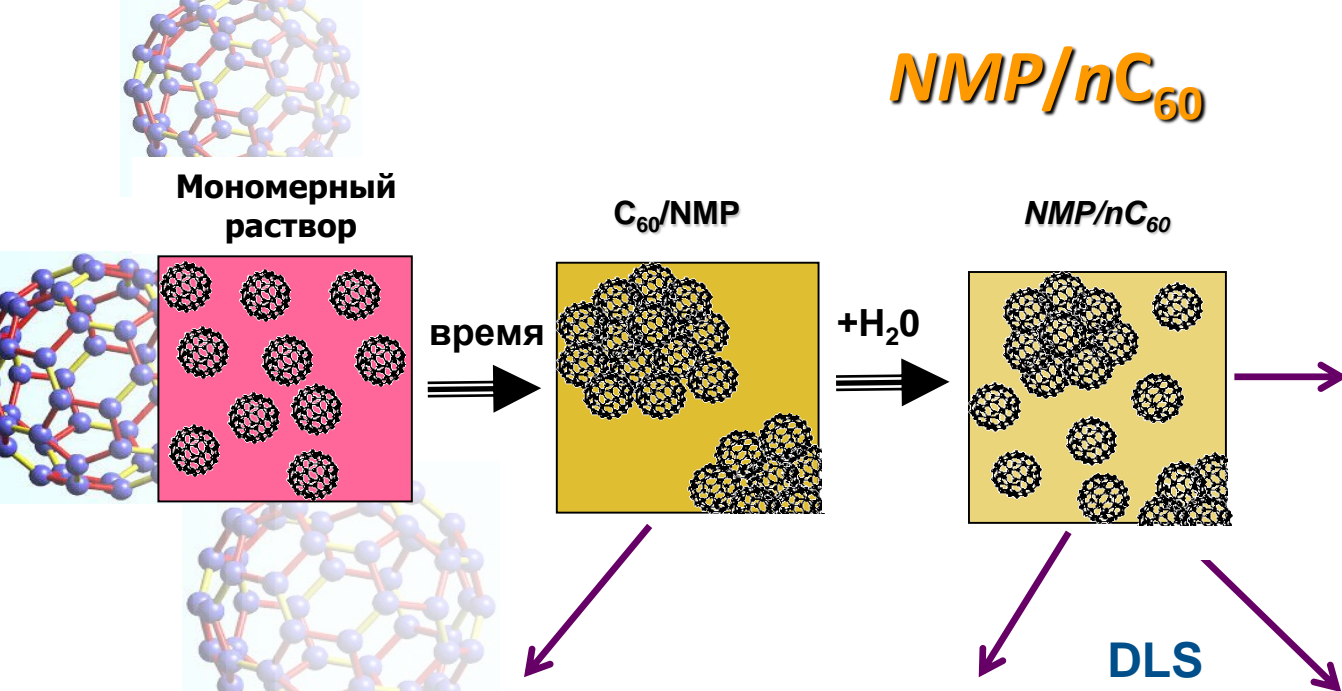


- Doxorubicin
- Cisplatin
- ICR
- Pectin
- Ландомицин А

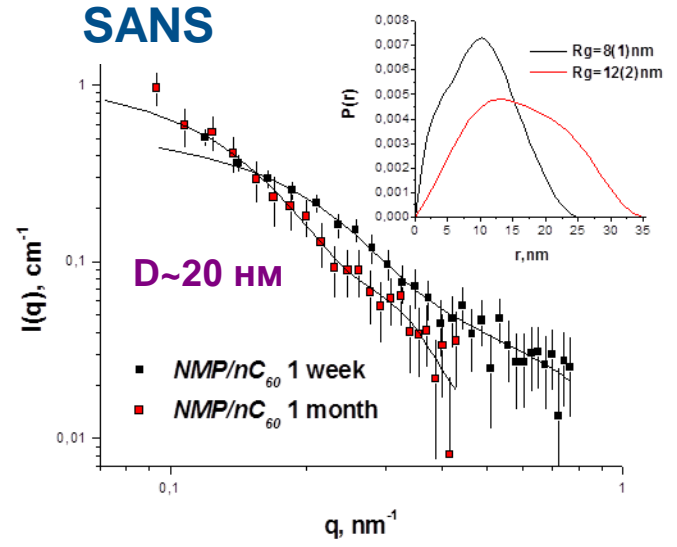
# Методы исследования

## Структура

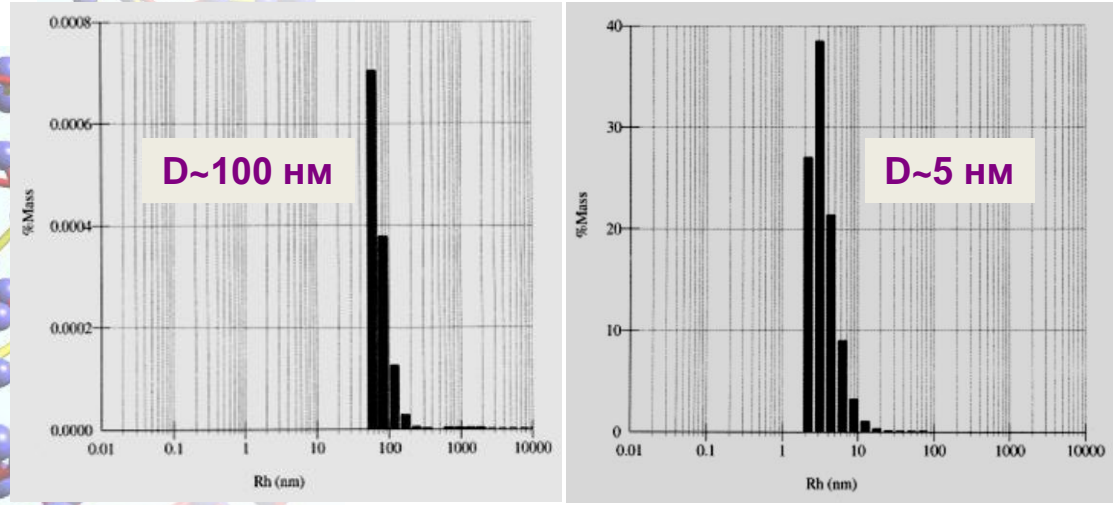




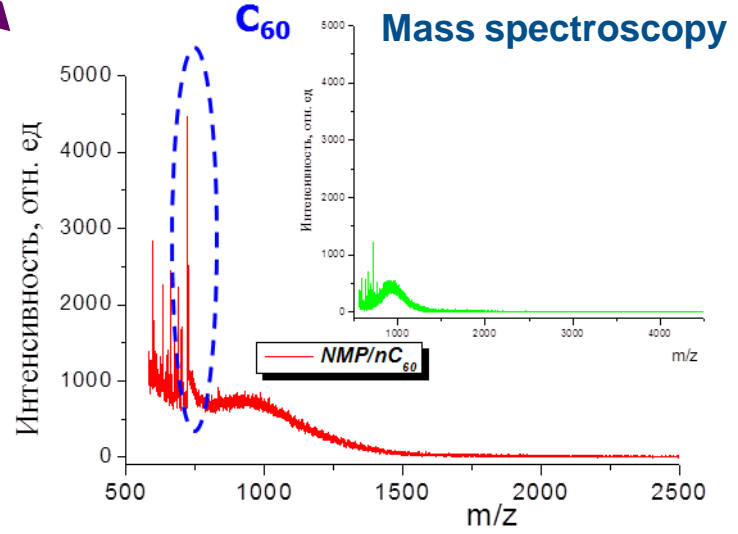
**SANS**



**DLS**

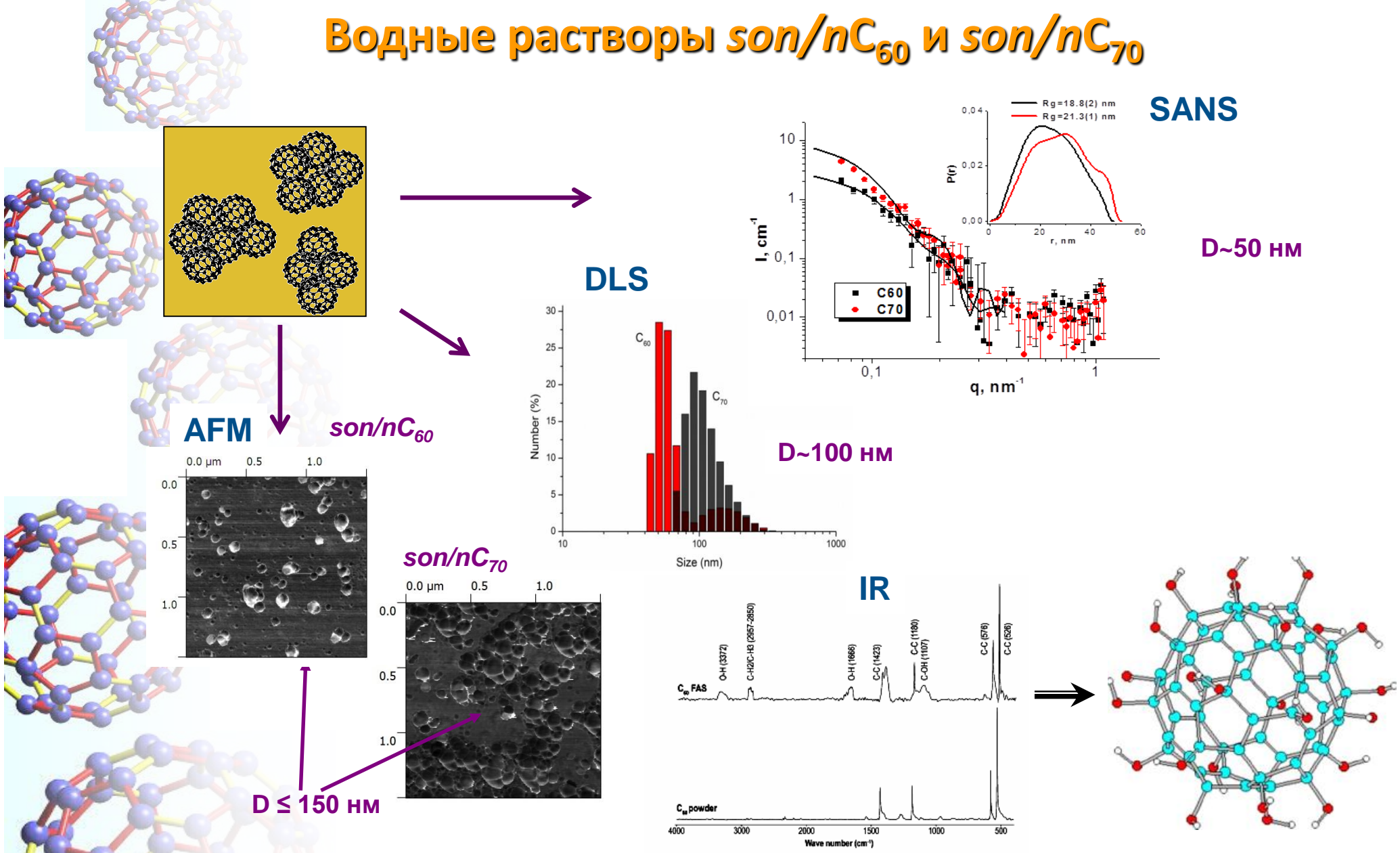


**Mass spectroscopy**



**При добавлении воды в растворе  $NMP/nC_{60}$  происходит уменьшение размеров агрегатов с выделением мономеров  $C_{60}$**

# Водные растворы $son/nC_{60}$ и $son/nC_{70}$



Растворы  $son/nC_{60}$  и  $son/nC_{70}$  содержат сферические кластеры со средним характерным размером до 150 нм. Выявлено гидроксирование фуллерена в воде.

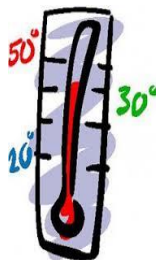
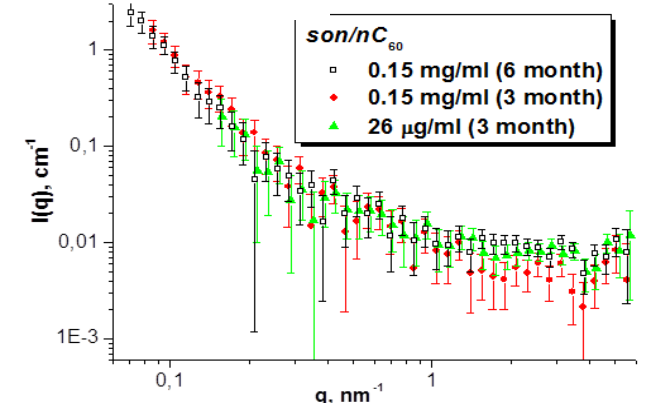


# Стабильность водных растворов $son/nC_{60}$ и $son/nC_{70}$



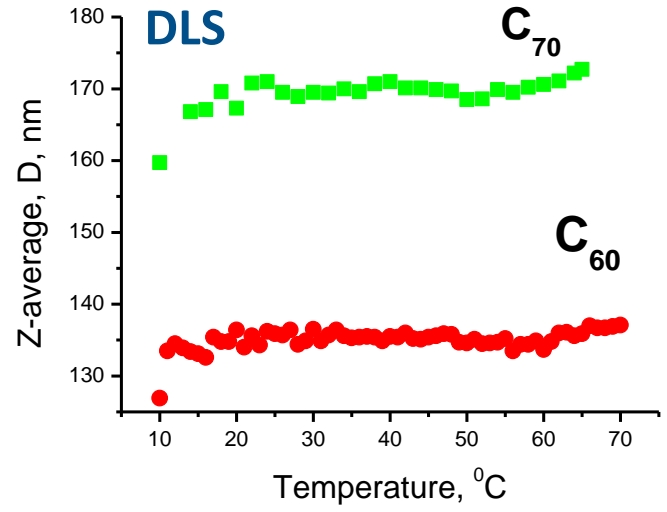
время

## SANS

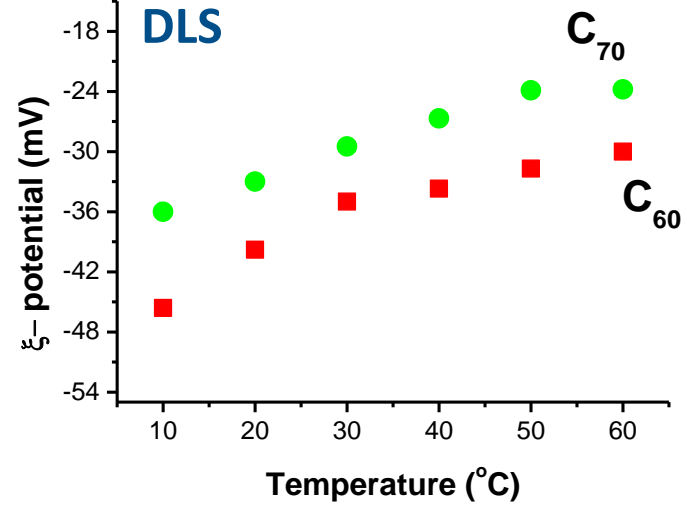


температура

## DLS



## DLS



Растворы обладают достаточной стабильностью для дальнейшего использования в медицине

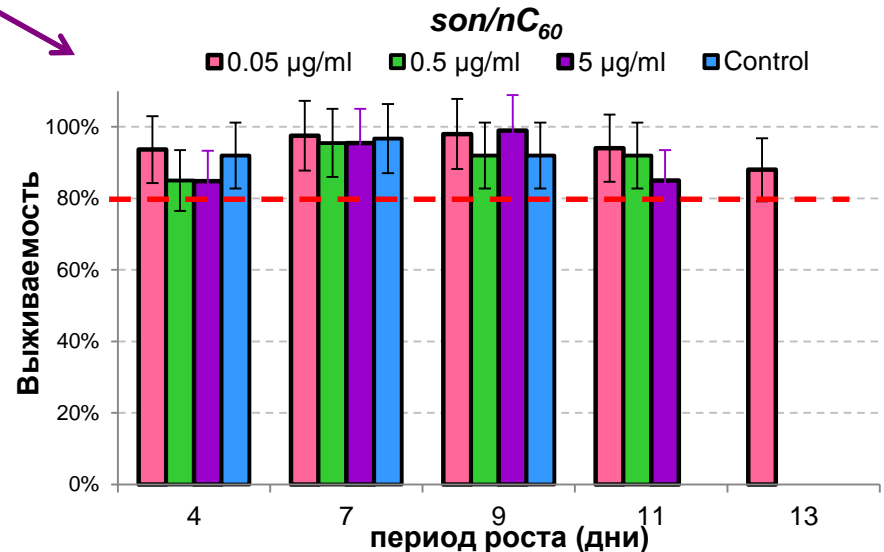
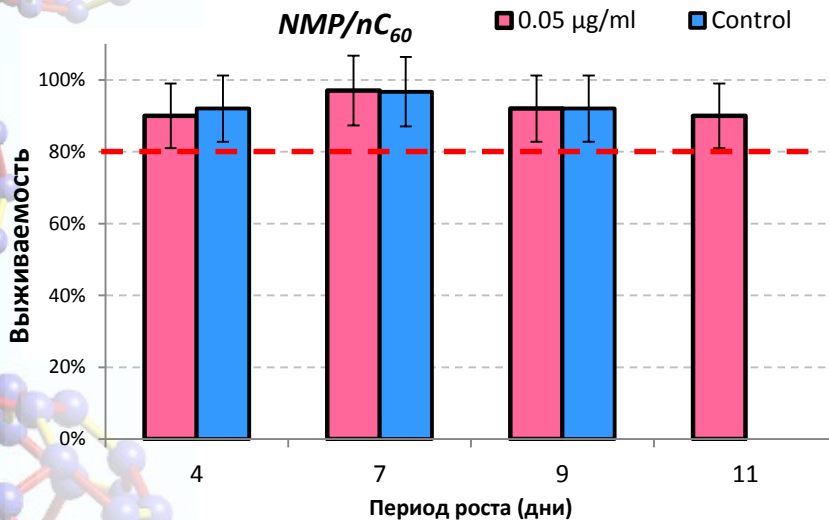
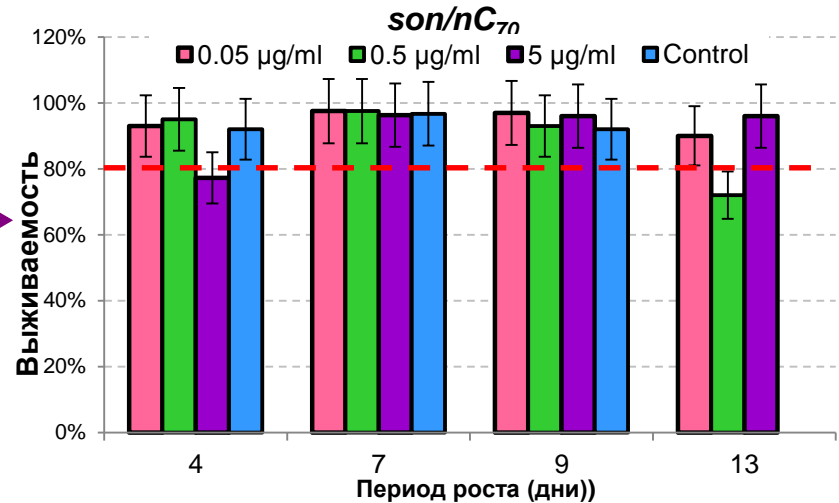
# In vitro исследования

Выживаемость клеток фибробластов китайского хомячка в течение 13 дней  
Концентрации фуллерена 0,05-5 мкг/мл

son/nC<sub>60</sub>  
D~90 нм

NMP/nC<sub>60</sub>  
D~30 нм

son/nC<sub>70</sub>  
D~130 нм



**В исследуемом диапазоне концентраций выживаемость клеток составила > 80%  
Корреляции между размерами агрегатов фуллерена в растворе и токсичности не выявлено.**

# Фуллерены в противоопухолевой терапии

По прогнозам Global Cancer Society до 2030 г. распространённость онкологических заболеваний в мире составит 21,4 млн новых случаев и 13,2 млн регистрируемых смертей.

**Целевая доставка**  
(мембранотропные свойства)

Nishiyama N. et al. // *Bioconjugate Chem* 14(2003)58  
Zhao B. et al. // *Toxicol Appl Pharmacol* 241(2009)163

**Увеличение эффективности препаратов**

(противоопухолевые, прооксидантные свойства)

Jiao F., Liu Y., Qu Y. et al. // *Carbon* 48(2010)2231  
Prylutska S. et al. // *Cancer Nanotechnol* 2(2011) 105

**Уменьшение побочных эффектов**

(антиоксидантные, иммуномодулирующие свойства)

Zhu J. et al. // *Small*. 4(2008)1168  
Injac R. et al. // *Biomaterials* 30 (2009) 1184

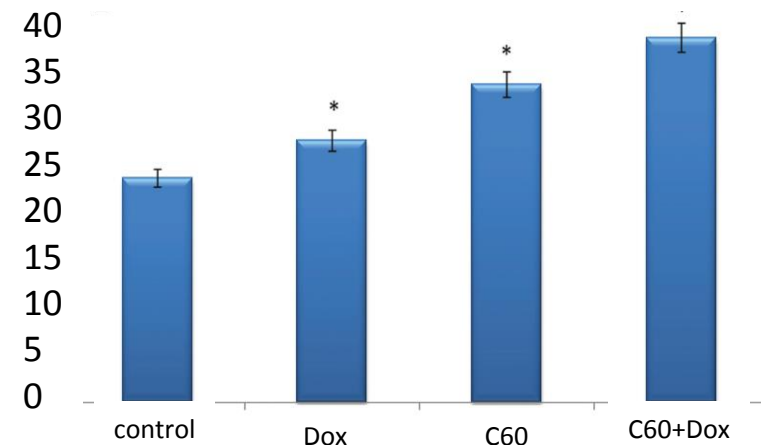
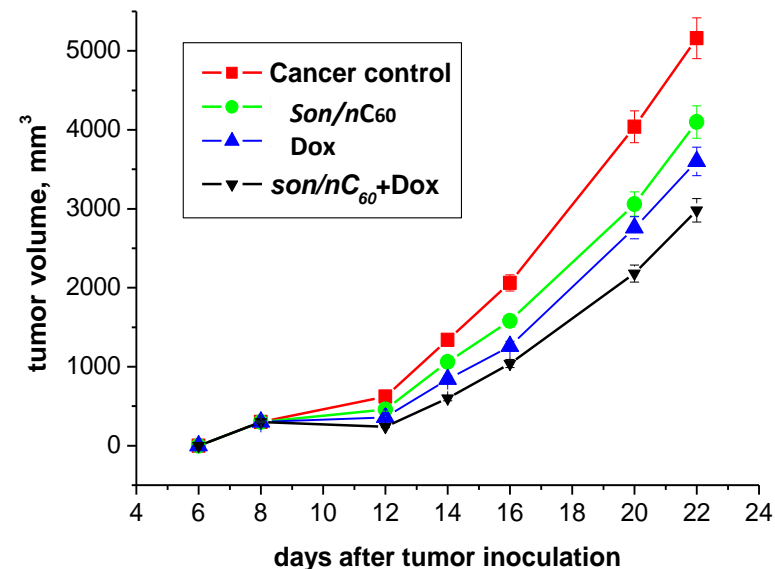
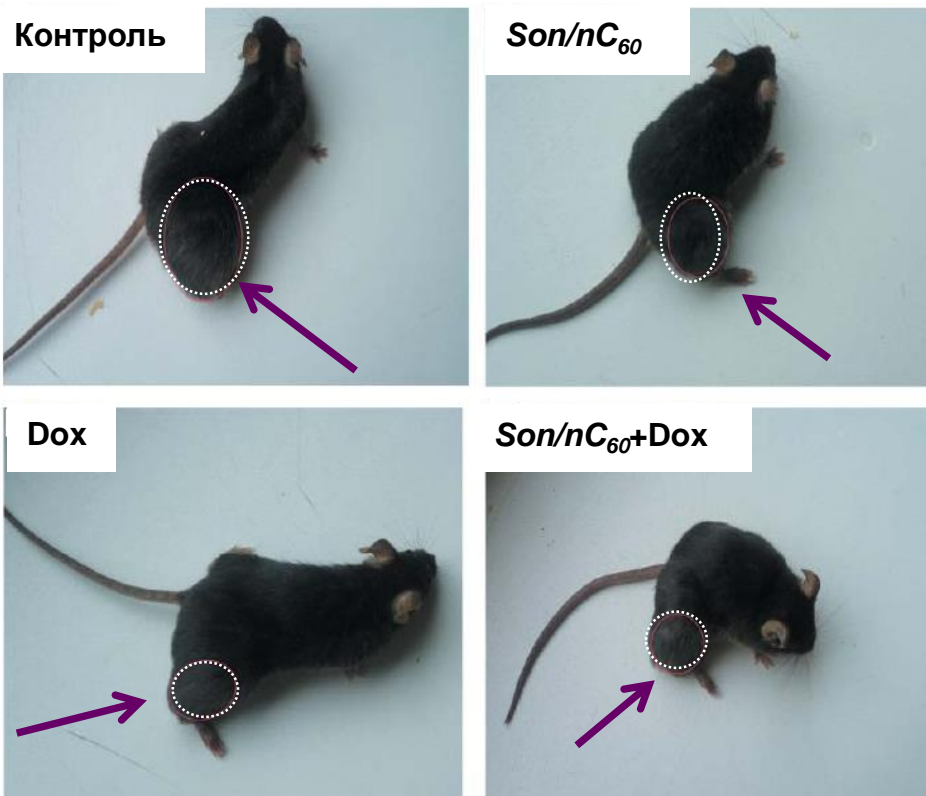
Улучшения качества и продолжительности жизни



# In vivo исследования

Визуальное сравнение роста опухоли карцинома Льюиса у мышей. Контроль - a), инъекции  $son/nC_{60}$  - b), инъекции Dox - c) и инъекции  $son/nC_{60}+Dox$  - d) через 20 дней после трансплантации опухоли.

Рост опухолевых клеток карцинома Льюиса печени у мышей, при воздействии  $son/nC_{60}$ , Dox и  $son/nC_{60}+Dox$ . Общая доза  $C_{60}$  - 25мг/кг (суточная 5мг/мл), Dox - 2,5 мг/мл (суточная 0,5мг/мл).



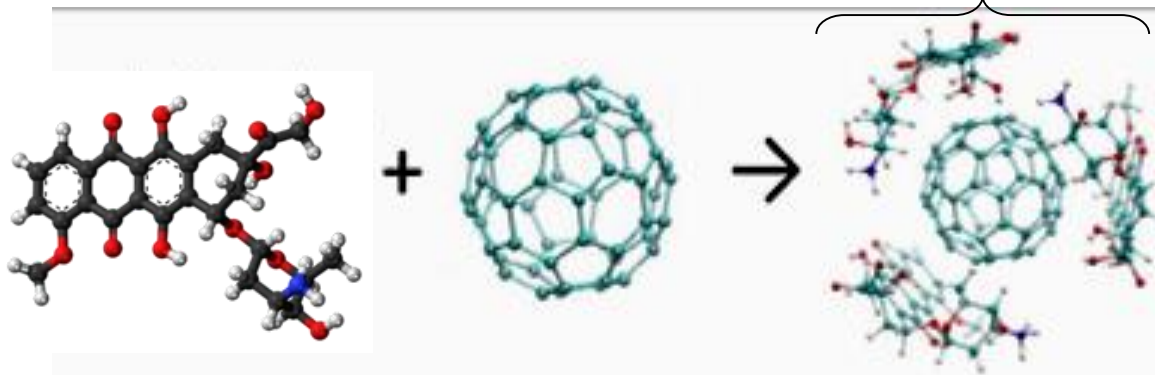
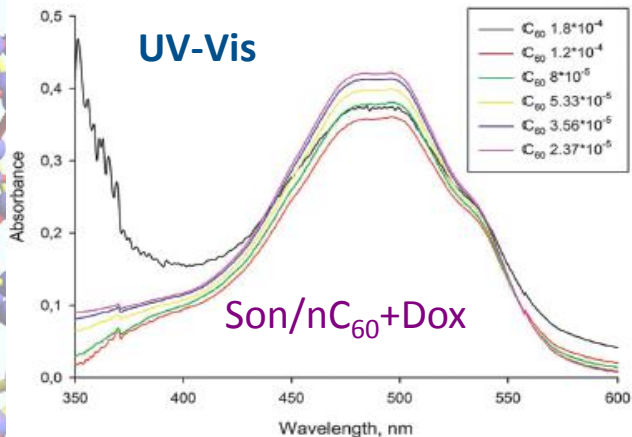
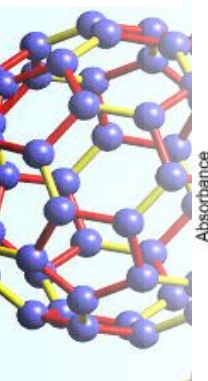
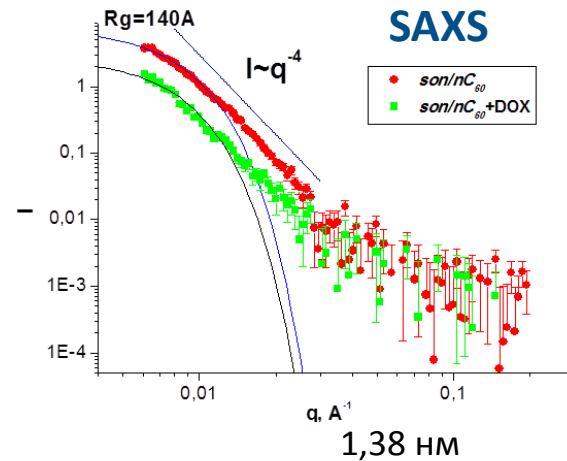
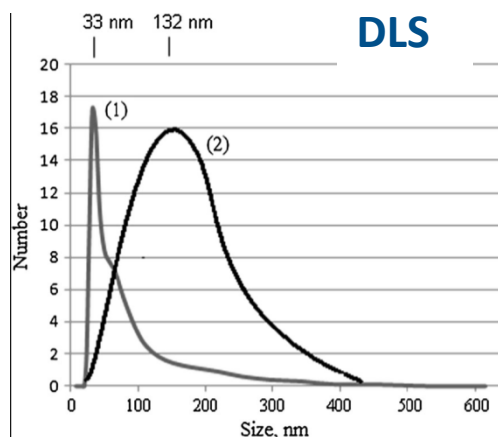
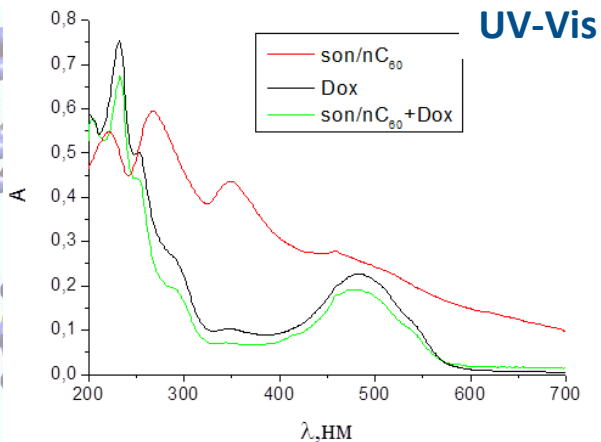
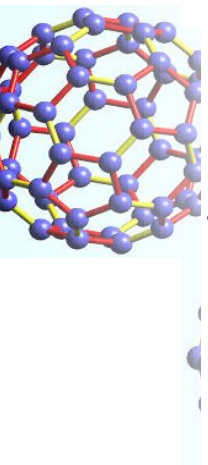
**Продолжительность жизни**

**Обнаружен синергетический эффект  $nC_{60}+Dox$  в ингибировании клеток опухоли и увеличении продолжительности жизни.**

# Son/nC<sub>60</sub>+ Doxorubicin

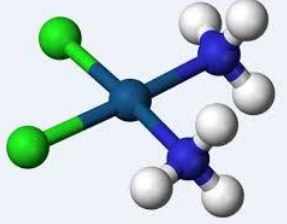


$\zeta = -28$  son/nC<sub>60</sub>  
 $\zeta = +45$  son/nC<sub>60</sub>+Dox.  
 $\zeta = 0$  - Dox



M.P. Evstigneev // *ChemPhysChem* (2013)14,568

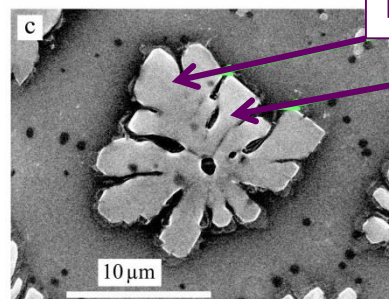
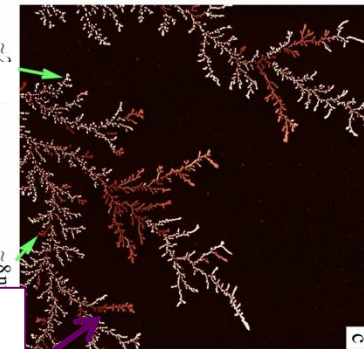
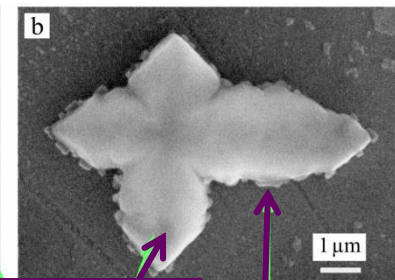
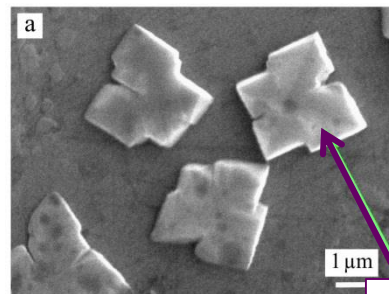
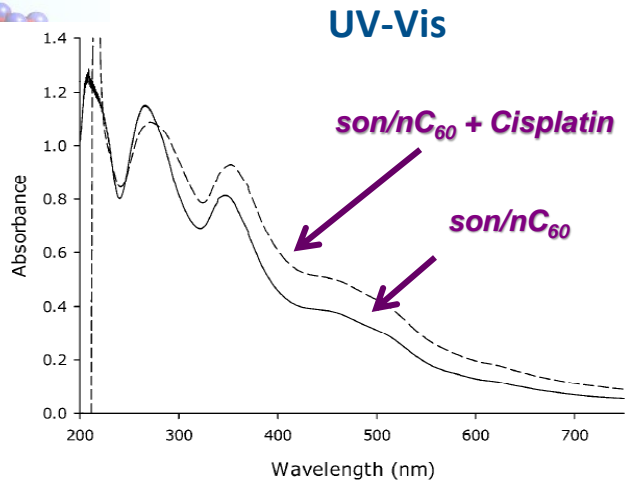
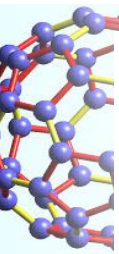
**Обнаружено комплексообразование nC<sub>60</sub> + Dox, что обуславливает увеличение эффективности комплекса по отношению к чистому антибиотику.**



# son/nC<sub>60</sub> + Cisplatin

SEM

AFM



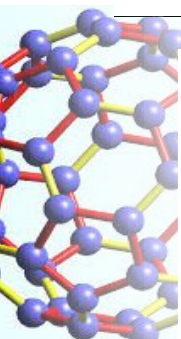
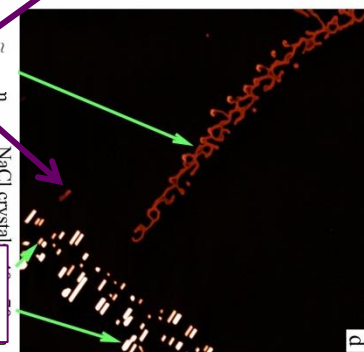
NaCl crystals

allocation of Cis

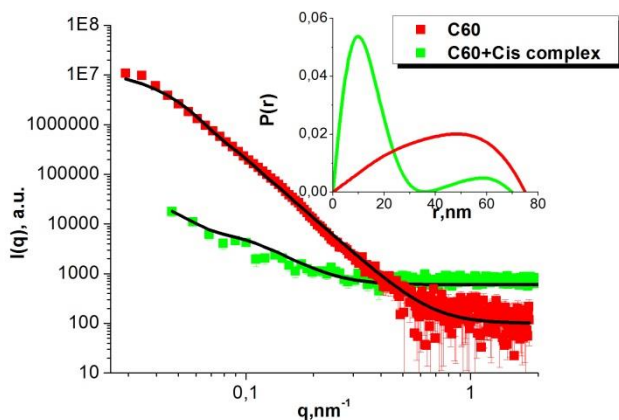
allocation of Cis and C<sub>60</sub>

$\zeta = -30,3 \text{ mV son/nC}_{60}$ ;  
 $\zeta = -17,6 \text{ mV son/nC}_{60} + \text{Cisplatin}$

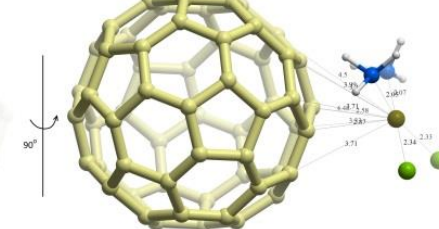
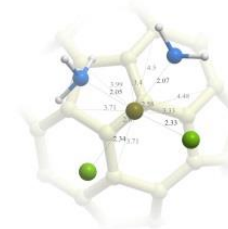
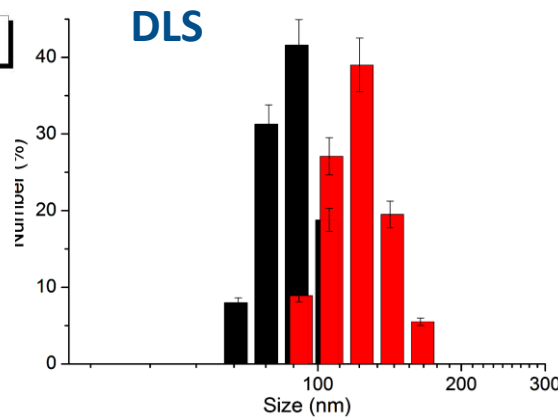
NaCl crystals  
40-70 nm



SAXS

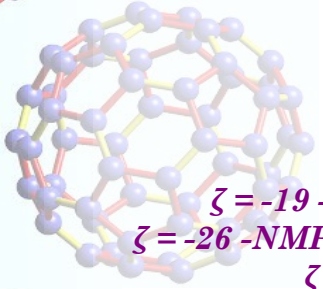
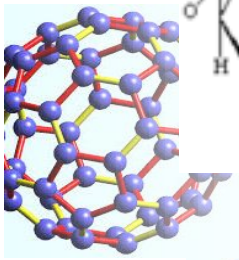
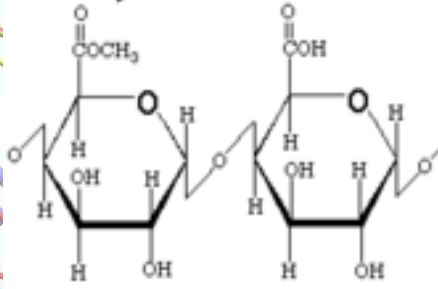
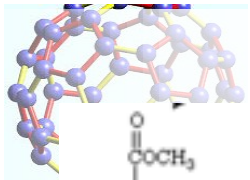


DLS

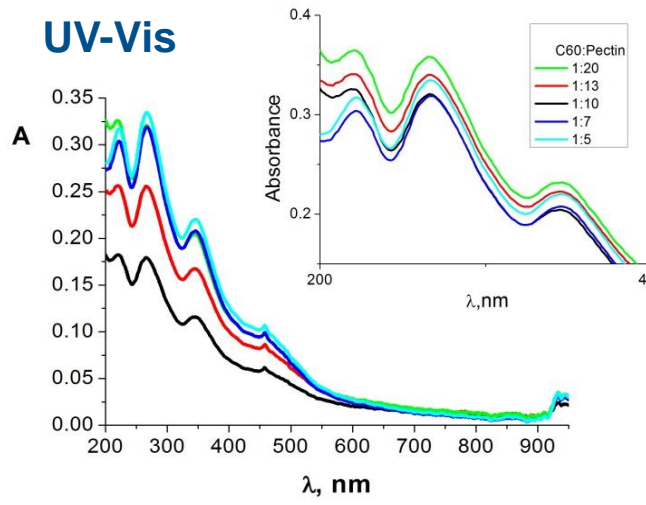


**Обнаружено изменение структуры агрегатов и электрокинетической константы при добавлении к son/nC<sub>60</sub> препарата Cisplatin**

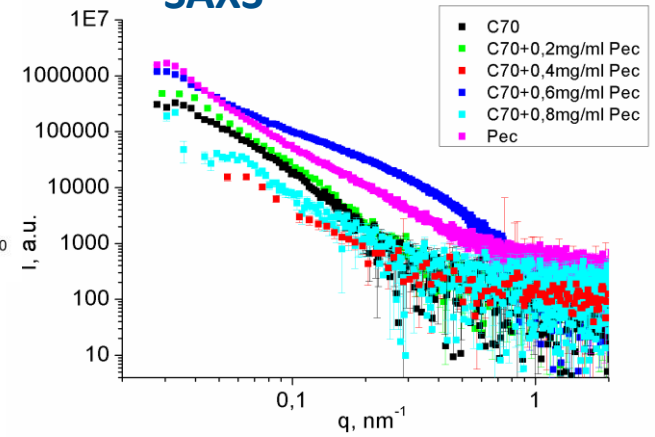
# NMP/nC<sub>60</sub>, son/nC<sub>70</sub>, son/nC<sub>60</sub>+ Пектин



## UV-Vis



## SAXS

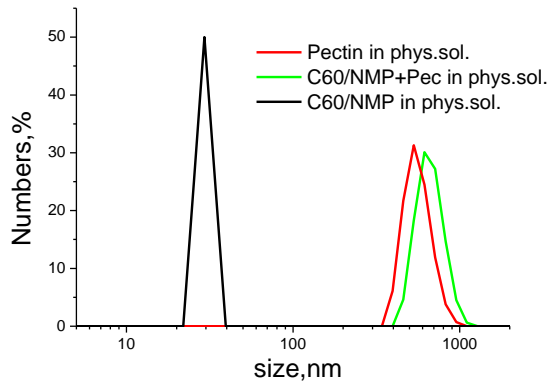


$\zeta = -19$  -NMP/nC<sub>60</sub>  
 $\zeta = -26$  -NMP/nC<sub>60</sub>+Pec  
 $\zeta = -21$  - Pec

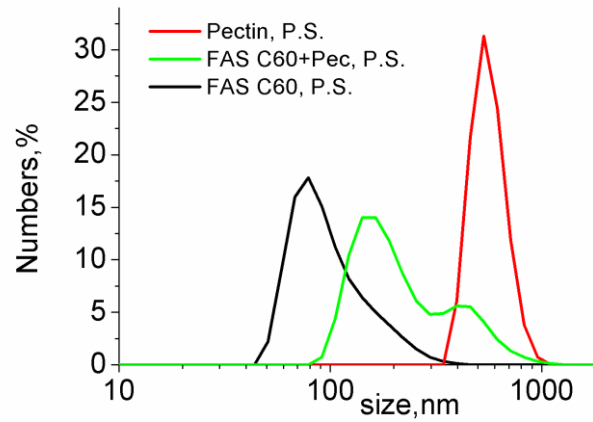
$\zeta = -25$  -son/nC<sub>60</sub>  
 $\zeta = -14$  -son/nC<sub>60</sub>+Pec  
 $\zeta = -21$  - Pec

$\zeta = -32$  - son/nC<sub>70</sub>  
 $\zeta = -20$  -son/nC<sub>70</sub>+Pec  
 $\zeta = -21$  - Pec

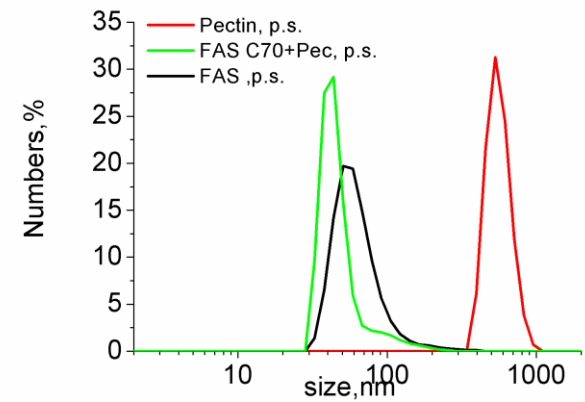
## DLS



## DLS



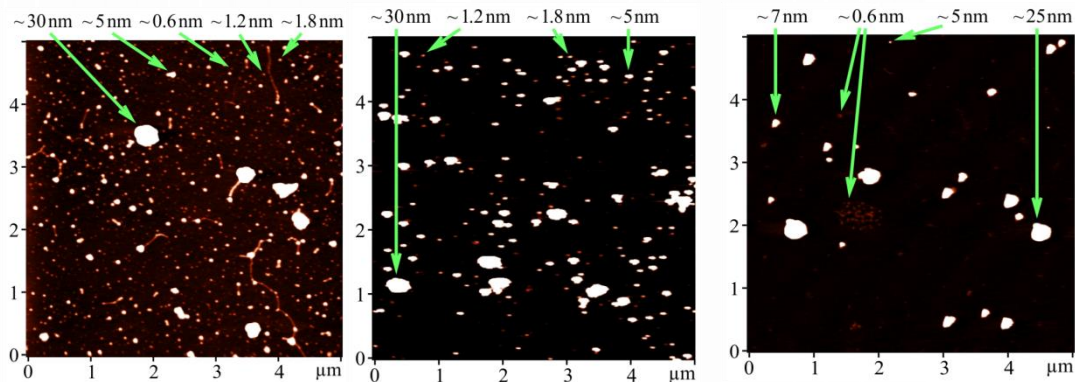
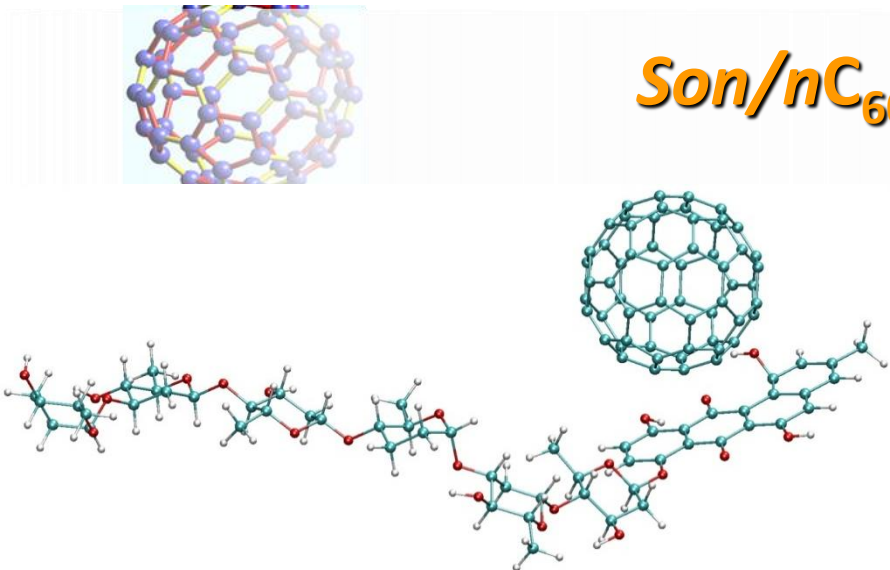
## DLS



**Гиперхромный эффект, изменение электрокинетического потенциала и размеров агрегатов в смесях фуллеренов с пектином указывают на формирование комплексов**

# Son/nC<sub>60</sub> + Ландомицин А

AFM

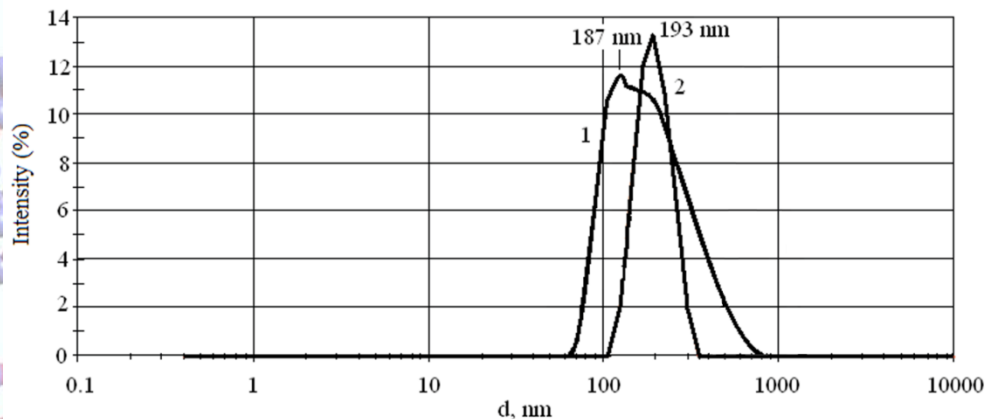


Landomycin A

Son/nC<sub>60</sub>

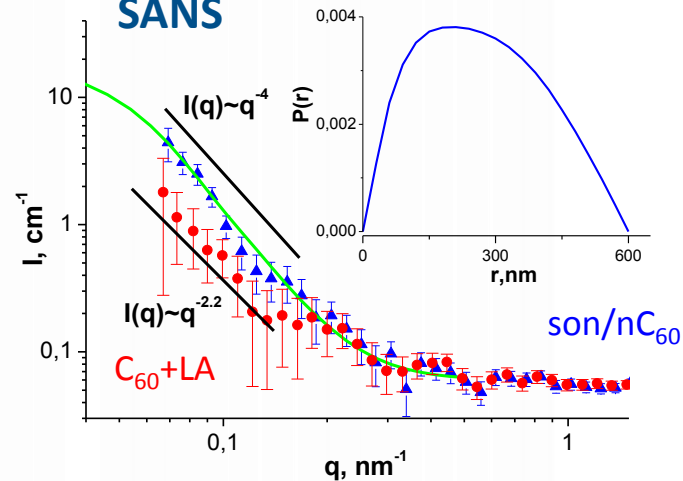
C<sub>60</sub>-Landomycin A  
1:1

DLS



C<sub>60</sub> (1) , C<sub>60</sub> +Landomycin A (2)

SANS



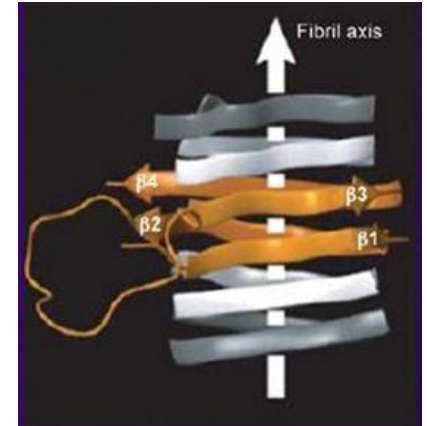
**Обнаружено комплексообразование водных nC<sub>60</sub> + Ландомицин А, что отвечает за увеличение противоопухолевой активности антибиотика**



# Фуллерены в терапии нейродегенеративных заболеваний

Нейродегенеративные заболевания обусловлены отложением в органах и тканях амилоидных фибрилл

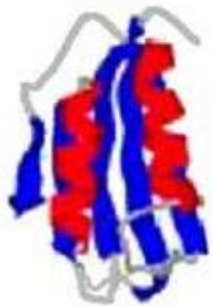
Амилоидные фибриллы – упорядоченные агрегаты свернутых белков



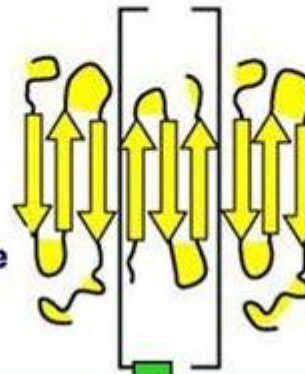
Белок в нативном состоянии

Предшественники фибриллярных агрегатов

Амилоидные фибриллы



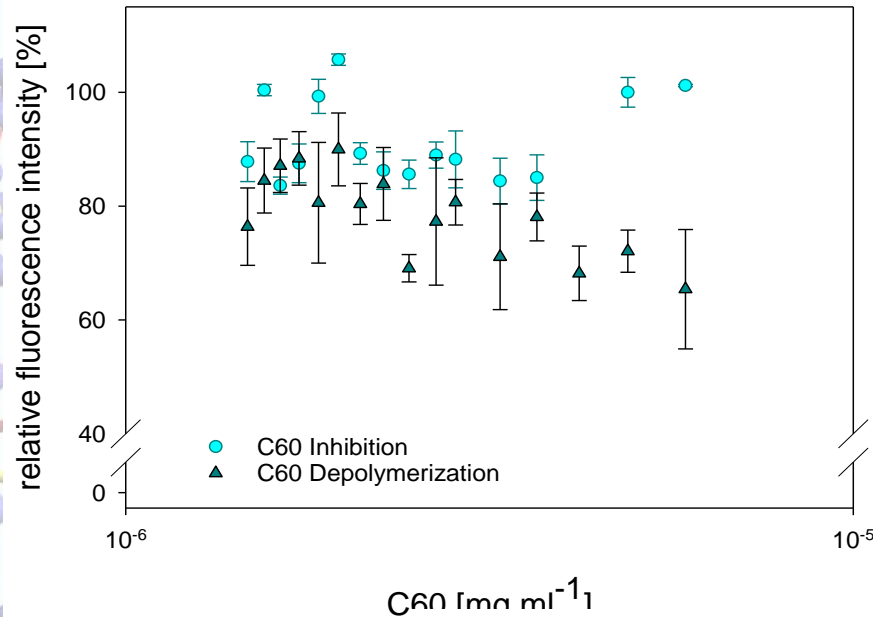
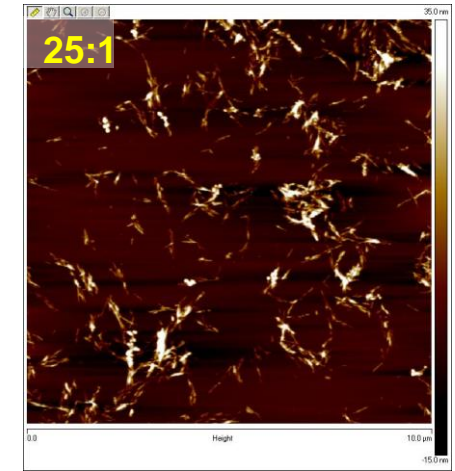
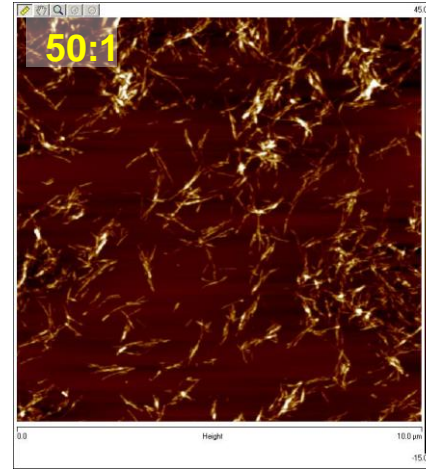
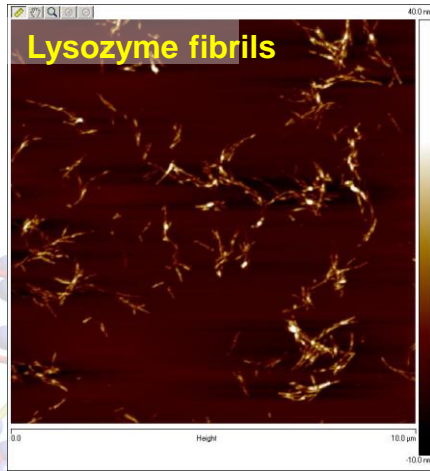
Дестабилизирующие условия



# Влияние водного раствора $son/nC_{60}$ на амилоиды

INHIBITION

ratio lysozyme :  $son/nC_{60}$



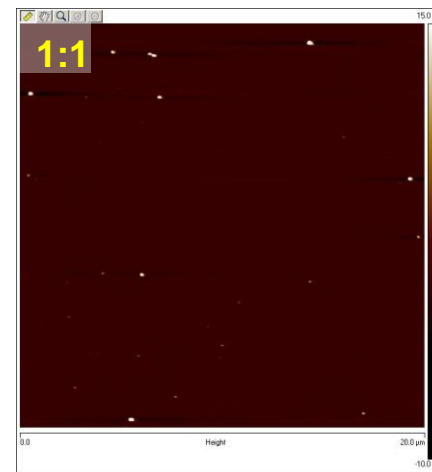
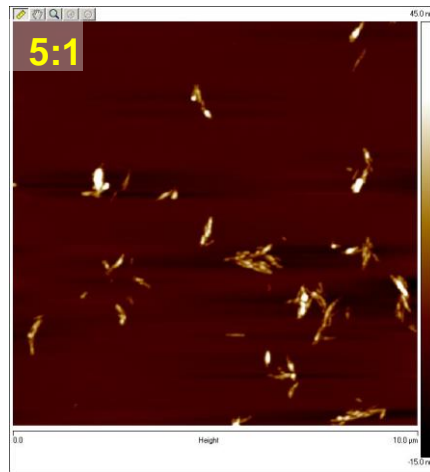
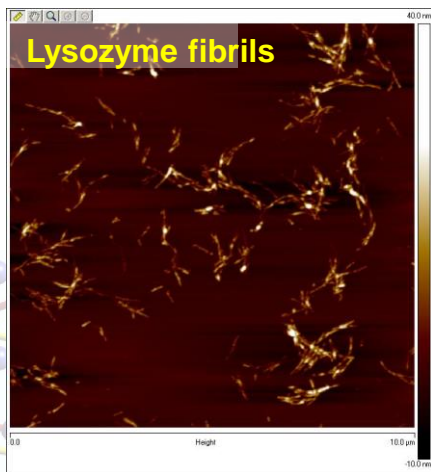
Влияния водного раствора  $son/nC_{60}$  на агрегаты амилоидов лизоцима – ингибирование (круг) и на формирование фибрилл – деполимеризация (треугольник).

**Влияние  $son/nC_{60}$  на амилоиды не выявлено !**

# Влияние водного раствора $NMP_{son}/nC_{60}$ на амилоиды

INHIBITION

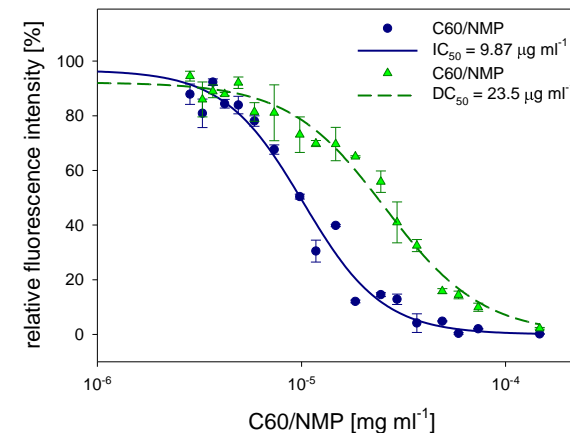
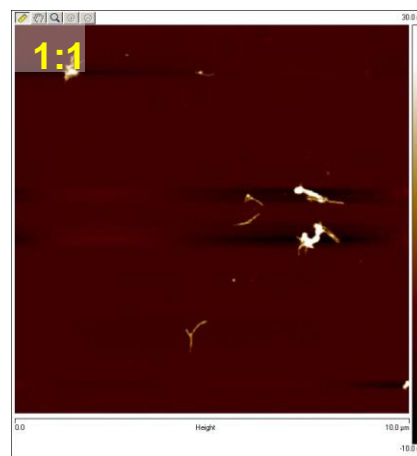
ratio lysozyme :  $NMP_{son}/nC_{60}$



DEPOLYMERIZATION

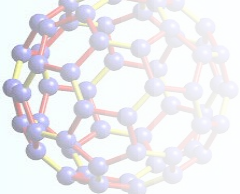
ratio lysozyme fibrils :  $NMP_{son}/nC_{60}$

$IC_{50}$  value (inhibition)  
 $DC_{50}$  value (depolymerization)

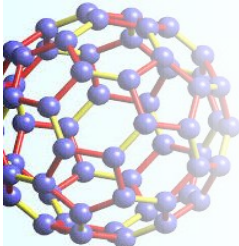


**$NMP_{son}/nC_{60}$  препятствует образованию амилоидных агрегатов и приводит к разрушению уже сформировавшихся амилоидов**

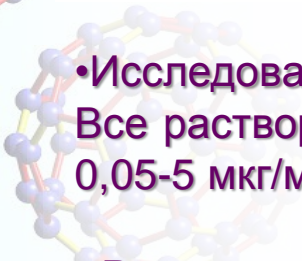
## Выводы



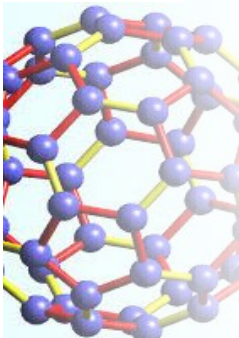
• На основе комплексного анализа (МУРН, МУРР, ДСР, АСМ, ИК, УФ-Вид, МС) проведена детальная структурная характеристика водных растворов фуллеренов  $C_{60}$  и  $C_{70}$  для медико-биологического назначения. Показана хорошая воспроизводимость растворов и их временная и температурная стабильность. Описан механизм стабилизации фуллеренов в воде.



• Исследована возможная связь размеров кластеров фуллеренов с цитотоксичностью. Все растворы показали низкую цитотоксичность в широком диапазоне концентраций 0,05-5 мкг/мл.



• Результаты структурных исследований смесей фуллерена  $C_{60}$  с противоопухолевыми препаратами указывают на формирование комплексов, что объясняет увеличение терапевтического эффекта смеси по сравнению с применением чистых препаратов.



• Водный раствор  $NMP_{son}/nC_{60}$  показал эффективное разрушение сформировавшихся амилоидов, а также препятствует их образованию на этапе роста в экспериментах *in vitro*.



*Спасибо за внимание!*