

САМОАССОЦИАЦИЯ ФУЛЛЕРЕНА И ЕГО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ – ПЕРСПЕКТИВНОЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

Мосунов А.А., Сало В.А., Воронин Д.П., Евстигнеев М.П.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: aamosunov@sevsu.ru

Поступила в редакцию: 13.09.2019

Аннотация. Самоассоциация немодифицированного фуллера C_{60} и его комплексобразование с химиотерапевтическими препаратами (в частности, доксорубицином, цисплатином и ландомицином А) в водном растворе рассматриваются как возможная ключевая стадия механизма биологической синергии *in vivo* и *in vitro*, наблюдаемой при совместном применении препаратов с фуллереном C_{60} . Выполнена полная характеристика водного раствора фуллера, выдвинуты гипотезы о природе межмолекулярных сил, стабилизирующих конгломераты фуллера. Проведена оценка размеров кластеров фуллера, проведено сопоставление этого параметра с биологической активностью препарата и его комплексов с другими биологически активными соединениями. Впервые предложена математическая модель для расчета термодинамических параметров агрегации фуллера. Проанализированы результаты применения различных физико-химических методов, позволяющих лучше понять природу сил, стабилизирующих комплексы фуллера C_{60} с этими препаратами. Предложен физико-химический механизм, позволяющий, по крайней мере частично, объяснить биологическое взаимодействие препарата C_{60} .

Ключевые слова: фуллерен C_{60} , антибиотик, водный раствор, агрегация.

Фуллерены C_{60} интенсивно исследовались в последние десятилетия, главным образом, из-за широкого спектра их потенциальных применений в биомедицине [1, 2]. Благодаря своему нанометровому размеру немодифицированные фуллерены C_{60} способны взаимодействовать с биомолекулами и проникать через клеточную мембрану [3-5]. Они проявляют антиоксидантные свойства и, будучи нетоксичными (по крайней мере, в низких концентрациях) [6-10], оказывают специфическое воздействие на здоровье (например, подавляют рост злокачественных опухолей [11, 12]) и проявляют биологическую синергию с противоопухолевыми препаратами [13-15]. Хотя эти молекулы имеют чрезвычайно низкую растворимость в воде, они образуют стабильные коллоидные растворы, содержащие отдельные фуллерены C_{60} , а также агрегаты (кластеры) фуллера C_{60} в воде при длительном перемешивании, обработке ультразвуком или замене растворителя [16, 17]. Чтобы понять поведение фуллера C_{60} в биологической среде (на уровне клеток, тканей и органов) и его взаимодействие с лекарственными средствами, необходимо точно знать его концентрацию в воде (эффект дозы), распределение по размеру и форме (размерный эффект). Поскольку биомедицинские эффекты наночастиц фуллера C_{60} напрямую зависят от этих свойств [18, 19], их знания позволят понять, «какая форма фуллера C_{60} является биологически активной, а именно одна молекула или ее кластер?» И «как эта молекула взаимодействует» с другими препаратами в биологических средах?

В этой работе мы кратко рассмотрим последние достижения физико-химической характеристики немодифицированного фуллера C_{60} и его взаимодействия с противоопухолевыми препаратами в водных растворах.

Исследования поведения немодифицированных частиц фуллера C_{60} в водном растворе ведутся с конца 90-х годов, когда метод приготовления стабильных водных коллоидных растворов стал общедоступным [17, 20, 21]. К тому времени уже было известно много о свойствах фуллера C_{60} в органических растворителях, что отчасти способствовало аналогичным исследованиям в водных растворах.

Исходя из определения, водные растворы любых фуллеренов C_{60} должны обладать свойствами коллоидных систем, которые содержат ассоциаты сольватированных фуллеренов C_{60} разного размера. Теоретический анализ возможных гидратированных кластеров $(C_{60})_N$ показал, что наименьший стабильный кластер фуллера C_{60} (I_h группа симметрии) состоит из 13 молекул C_{60} [22, 23]. Его диаметр составляет 3,36 нм (с учетом молекулярного диаметра молекулы воды), что отлично согласуется с данными сканирующей туннельной микроскопии [24]. Дальнейший анализ показал, что диаметры кластеров регулярно увеличиваются в диапазоне от 3,4 до 36 нм, а именно 3,4, 7,1, 10,9, 14,5, 18,1, 21,8, 25,4, 28,8, 32,4 и 36,0 нм [24], то есть каждая следующая частица больше предыдущей на 3,4-3,8 нм. Дальнейшее исследование водного раствора фуллера C_{60} (C_{60} FAS) было разделено на характеристику структуры и морфологии кластеров и понимание механизма образования кластеров.

Различные физико-химические методы использовались для изучения специфики формирования кластеров фуллера C_{60} . Характеризация частиц фуллера C_{60} в водных растворах была выполнена с помощью УФ-видимой спектроскопии [22, 23, 25-28], электронной и туннельной микроскопии [25, 29-34], атомно-силовой микроскопии (AFM) [25, 35], дзета-потенциала [25, 31, 36, 37], динамического светорассеяния (DLS) [25, 29, 31-33, 38], Фурье инфракрасной/Рамановской спектроскопии [26-28, 34, 35], малоуглового рассеяния нейтронов (SANS) [16, 28, 35, 39] и некоторых других методов.

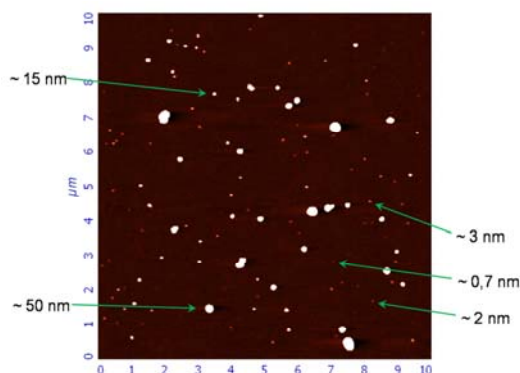


Рисунок 1. Пример экспериментально полученного методом атомно-силовой микроскопии изображения кластеров фуллерена C_{60}

УФ/видимая спектрофотометрия показала три широких полосы поглощения на длинах волн 208, 265 и 347 нм, которые характерны и для растворов фуллерена в органических растворителях [25, 26].

Состав C_{60} FAS обычно контролировался методами АСМ и туннельной/электронной микроскопии [25, 29-35]. Типичная картина АСМ приведена на рисунке 1; подобные картины были зарегистрированы в течение последних 10 лет различными исследовательскими группами. На рисунке показаны случайно расположенные отдельные молекулы C_{60} диаметром $\sim 0,7$ нм и их объемные сферические агрегаты высотой 2-50 нм. Интересно, что некоторые отдельные агрегаты фуллерена C_{60} с высотой ~ 100 нм были также зарегистрированы на изображениях с помощью зондовой микроскопии, что указывает на полидисперсную природу C_{60} FAS, включая мономеры или агрегаты, имеющие диаметры в диапазоне от нескольких до сотен нанометров.

Результаты микроскопических изображений также были подтверждены данными DLS и SANS [16, 25, 28, 29, 31-33, 35, 38, 39]. Широкое распределение гидродинамических размеров частиц фуллерена C_{60} по интенсивности со средним $z \sim 70$ -120 нм наиболее прямо свидетельствует о полидисперсности, независимо подтвержденной методом SANS. Экспериментальные данные указывают на то, что структурные и морфологические особенности полидисперсных агрегатов фуллерена C_{60} , присутствующих в водном растворе, остаются практически одинаковыми для различных методов получения C_{60} FAS [35].

Величина зета-потенциала, которая связана со стабильностью коллоидного распределения, охватывает относительно широкий диапазон от -9 мВ до -38 мВ [21, 25, 36, 37] и свидетельствует о наличии отрицательного заряда на поверхность молекулы C_{60} в растворе. Высокий отрицательный заряд коллоидных кластеров (или, точнее, электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными кластерами) играет важную роль в стабилизации C_{60} FAS (он ухудшает агрегацию и делает раствор электрически устойчивым).

Наличие отрицательного заряда на поверхности фуллерена C_{60} является общепринятым фактом и считается ключевым, но не единственным фактором растворимости фуллерена C_{60} в водном растворе. Фурье инфракрасный-спектр C_{60} FAS (рис. 2) отображает типичную картину пиков, которые можно было бы отнести к С-С колебательным модам молекулы C_{60} . Однако отмечено, что дополнительные пики не зависели от метода приготовления C_{60} FAS и соответствовали растяжению связей С-О. Это свидетельствует в пользу того, что фуллерен C_{60} является гидроксированным, а гидроксилы, образующие спиртовые функциональные группы, существуют в структуре фуллерена C_{60} в воде. Следовательно, основным механизмом сольubilизации фуллерена C_{60} в воде может быть присоединение ОН-групп к углеродам фуллерена C_{60} [34, 35].

Ковалентное присоединение ОН-групп не исключает возможности переноса электрона с молекул воды к фуллерену C_{60} , что позволяет объяснить отрицательный заряд частиц фуллерена C_{60} . Отсюда следует, что предыдущую модель стабилизации гидратированного фуллерена C_{60} молекулами воды, соединенными сеткой водородных связей [26, 28], необходимо пересмотреть с обязательным учетом имеющихся результатов молекулярно-динамического моделирования гидратированных фуллеренов C_{60} [40-43].

Недавно было установлено, что агрегаты немодифицированных фуллеренов C_{60} обеспечивают превосходную матрицу для образования высокоупорядоченных комплексов с включением других молекул, что приводит к усилению их физико-химических или биологических свойств [44, 45]. Помимо интереса к физико-химическому процессу агрегации, недавно было обнаружено, что токсичность фуллерена C_{60} *in vitro* коррелирует

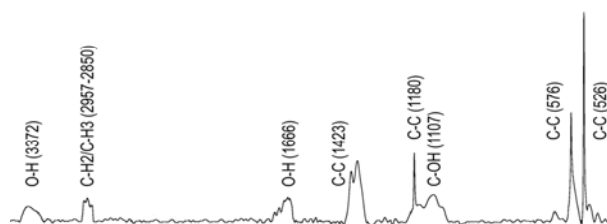


Рисунок 2. Пример экспериментально полученного фурье ИК-спектра фуллерена C_{60}

с его способностью подвергаться агрегации [46], и, в частности, агрегированные формы фуллерена C_{60} могут эффективно связываться с биополимерами [47]. Поэтому в настоящее время считается, что агрегация фуллерена C_{60} представляет общий интерес.

Определение термодинамических параметров агрегации, таких как равновесная константа агрегации или изменения энтальпии/энтропии/свободной энергии Гиббса, было выполнено всего в нескольких работах [40, 41, 48-50]. Возможные причины этого включают неполное понимание микроскопической картины образования кластера фуллерена C_{60} в растворе и, как следствие, трудности в построении теоретической модели агрегации фуллерена C_{60} . Например, было показано очень сложное взаимодействие ван-дер-ваальсовых, электростатических и гидрофобных взаимодействий при агрегации фуллерена C_{60} , которое, по-видимому, не следует классическому гидрофобному эффекту [40, 41, 51]. Это указывает на то, что общая термодинамическая картина агрегации фуллерена C_{60} в водном растворе отличается от классической агрегации малых молекул, что делает эту проблему все еще вакантной нишей для дальнейших исследований.

Предположительно, первая попытка измерить равновесную константу агрегации фуллерена C_{60} была осуществлена в [49] путем титрования водного раствора фуллерена C_{60} и регистрации усредненных по интенсивности распределений частиц, присутствующих в растворе, в эксперименте DLS. Эти данные позволяют рассчитать средний гидродинамический диаметр d_z (среднее значение z) и коэффициент поступательной диффузии D рассеивающих свет частиц.

В настоящее время принятая позиция по агрегации малых молекул в разбавленных водных растворах предполагает, что при увеличении концентрации растворенного вещества коэффициент трансляционной диффузии должен уменьшаться в результате увеличения размеров агрегатов [52, 53]. Качественно аналогичное представление существует и в отношении агрегации фуллерена C_{60} , что подтверждается теоретическим расчетом зависимости D от концентрации фуллерена C_{60} в толуоле [54].

Зависимость $d_z(C_0/r)$ на рисунке 3, полученная с использованием стандартных методов приготовления C_{60} FAS, демонстрирует обратное поведение: увеличение концентрации растворенного вещества приводит к уменьшению значения d_z . К сожалению, прямое сравнение этих результатов с существующими литературными данными не представляется возможным, поскольку эти статьи ограничены работой с измерениями D (или d_z) фуллерена C_{60} в растворе в одной точке концентрации в каждом случае (например, [31, 47]). Однако анализ литературных данных, связанных с агрегацией малых молекул, позволяет предположить, что при достижении мицеллярных концентраций зависимость от концентрации непосредственно измеренного коэффициента трансляционной диффузии (например, с помощью DLS или аналогичного действующего метода) становится обратной [54, 55]. Этот результат обычно интерпретируется с точки зрения прямого взаимодействия мицелл друг с другом в растворе из-за нековалентных сил, эффект, который был известен в течение некоторого времени [54, 55]. Мицеллярное взаимодействие действует как дополнение к броуновскому движению и, следовательно, приводит к повышению коэффициента диффузии при увеличении концентрации растворенного вещества. Принимая во внимание полидисперсную природу C_{60} FAS и существование кластеров фуллерена C_{60} с диаметрами в диапазоне величин от 10 до 100 нм, было высказано предположение, что обратная зависимость кривой $d_z(C_0/r)$ на рисунке 3 является следствием эффекта взаимодействия кластеров $(C_{60})_n$ [49].

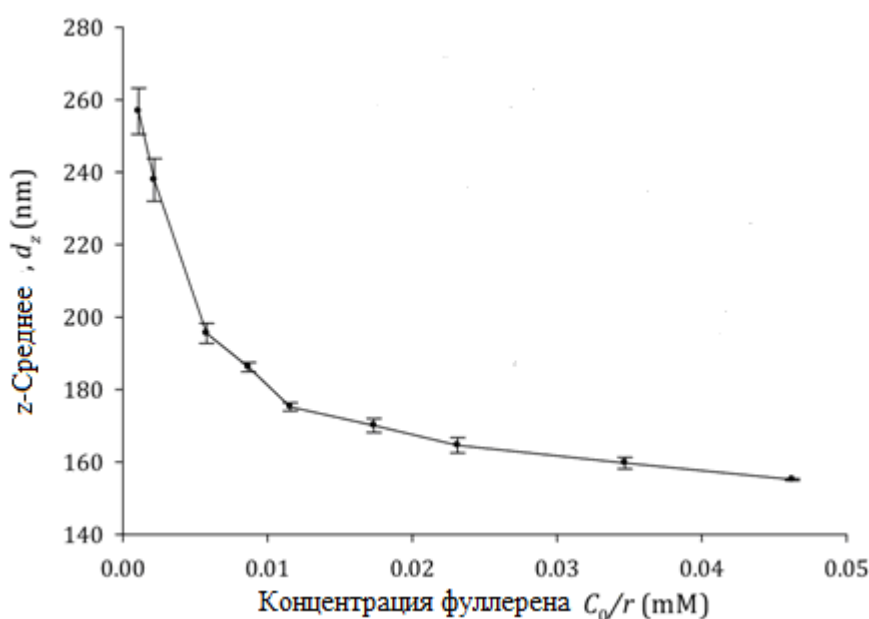


Рисунок 3. Экспериментальная зависимость среднего значения z от концентрации фуллерена C_{60}

Следовательно, форма кривой титрования на рисунке 3 определяется двумя противоположными тенденциями, а именно. агрегация, приводящая к увеличению dz , и взаимодействие кластеров, приводящее к уменьшению dz .

На основании эксперимента по титрованию DLS была предложена физическая модель агрегации фуллерена C_{60} [49] (так называемая «модель в увеличенном масштабе»). В соответствии с этой моделью агрегация происходит как одновременное связывание большого количества мелких частиц или мономеров фуллерена C_{60} (называемых «конгломератами») с большими кластерами фуллерена C_{60} (ядро кластера, которое считается не испытывающим диссоциации). В результате этого формируется равновесное распределение частиц фуллерена C_{60} по размерам, которое можно количественно определить в терминах равновесной константы агрегации K_F (или изменение свободной энергии Гиббса, ΔG_F). Полученное уравнение, позволяющее рассчитать экспериментальную кривую титрования на $d_z(C_0/r)$ рисунке 3, имеет вид [49]:

$$d_z = \frac{d_0}{1 + A' \frac{C'_{M0}}{r}} \cdot \frac{[1 + (B-1)BK_F C'_{R1}]^2 + B^3 K_F C'_{R1}}{(1 - BK_F C'_{R1})^3 \sum_{i=0}^{\infty} (1 + Bi)^{5/3} (BK_F C'_{R1})^i} \quad (1)$$

$$\text{где } C'_{R1} = \frac{r + C'_{M0} BK_F + (C_0 - C'_{M0}) K_F - \sqrt{(r + C'_{M0} BK_F + (C_0 - C'_{M0}) K_F)^2 - 4r K_F (C_0 - C'_{M0})}}{2r BK_F},$$

C'_{M0}, A', K_F, B, d_0 параметры поиска, полученные путем подгонки экспериментальной кривой на рисунке 3 к уравнению (1).

Полученное значение константы агрегации равно $K_F = 56000 \text{ M}^{-1}$ [49], что хорошо согласуется с теоретически рассчитанным изменением свободной энергии Гиббса в [48].

Эксперимент по титрованию, рассмотренный выше и приведший к определению K_F , был дополнен оценкой энтальпии и изменения энтропии, связанных с процессом агрегации [50]. Прямое калориметрическое измерение теплового воздействия на разбавление и температурную зависимость z -среднего значения в эксперименте с DLS показало почти нулевое изменение энтальпии. Был сделан окончательный вывод о чисто энтропийном характере агрегации фуллерена C_{60} . Считается, что основной вклад в ΔG_F обусловлен гидрофобным взаимодействием, т.е. высвобождением молекул воды, слабо связанных с частицами фуллерена C_{60} , при образовании кластеров (то есть тех молекул, которые относятся к далеким гидратным оболочкам частицы фуллерена C_{60}). Важно, что в этом процессе первая гидратная оболочка, окружающая фуллерены C_{60} , остается практически неизменной, что приводит к тому, что контактное расстояние между поверхностями взаимодействующих частиц фуллерена C_{60} больше, чем наблюдается для типичного стэкинга ароматических молекул (около 0,5 нм). Теоретическое разложение ΔG_F на энергетические вклады от различных физических факторов показало, что чистые ван-дер-ваальсовы и электростатические термы оказываются относительно малыми из-за компенсаторного характера межмолекулярного взаимодействия и взаимодействия с растворителем при комплексообразовании [49], что дополнительно подтверждает энтропийная природа агрегации фуллерена C_{60} в водном растворе.

До настоящего времени возможность модификации биологических и/или физико-химических свойств фуллерена C_{60} или лекарственного средства рассматривалась главным образом путем ковалентного связывания молекул лекарственного средства с фуллереном C_{60} [44]. Как следствие, была синтезирована серия комплексов C_{60} с лекарственными средствами, обладающая улучшенными свойствами [56, 57]. С другой стороны, наличие в структуре молекулы C_{60} ароматической поверхности, состоящей из сопряженных углеродных колец, предполагает возможность ее эффективного взаимодействия посредством π -стэкинга с ароматическими фрагментами белков, оснований нуклеиновых кислот, ароматических витаминов, антибиотиков и др. соединения, которые могут присутствовать в биосистеме. Следовательно, нековалентное комплексообразование фуллеренов C_{60} с биорецепторами и ароматическими лекарственными средствами может в некоторой степени способствовать наблюдаемым биологическим эффектам на клеточном уровне и уровне организма. Косвенное обоснование этой гипотезы может исходить из хорошо известного факта, что некоторые клеточные эффекты воздействия ароматических биологически активных соединений можно интерпретировать с точки зрения их комплексообразования в физиологической среде [58]. За последние несколько лет появились два ряда сообщений, свидетельствующих о сильном биологическом взаимодействии *in vitro* и *in vivo* между фуллереном C_{60} и ароматическими противоопухолевыми препаратами, доксорубицином (Dox) [13-15, 59-61] и цисплатином (Cis) [62]. Особенностью этого взаимодействия было следующее: 1) наиболее выраженный эффект наблюдался при одновременном назначении лекарств и фуллерена C_{60} , 2) физико-химическое взаимодействие препарата с фуллереном C_{60} нековалентно, 3) отмечены предварительные показатели корреляции биологического эффекта *in vitro* с константой равновесия комплексообразования фуллерена C_{60} с ароматическими молекулами лекарственного средства [61]. Таким образом, знание того, как молекулы C_{60} взаимодействуют с ароматическими лекарственными средствами, важно для понимания механизма медико-биологического действия фуллеренов C_{60} .

Доступные в настоящее время данные о структуре и термодинамике взаимодействия между фуллеренами C_{60} и ароматическими молекулами недостаточны и ограничены системами, в основном изученными в неполярных растворах (см. работу [63] и ссылки в ней), и несколькими системами, изученными в водном

растворе. [13, 59, 62-67]. Ниже мы кратко рассмотрим основные результаты структурного и термодинамического анализа взаимодействия фуллерена C_{60} с Dox, Cis и новым ангуциклиновым антибиотиком ландомицином А (LA) [68] как системами, которые наиболее интенсивно исследованы на сегодняшний день по сравнению с другими.

Противоопухолевый антибиотик Dox относится к группе наиболее эффективных и широко применяемых препаратов при химиотерапии рака. Основным ограничением его использования является относительно высокая побочная токсичность, что создает давнюю проблему для поколений исследователей, пытающихся минимизировать этот недостаток. Как обсуждалось выше, было показано, что фуллерен C_{60} улучшает медико-биологический эффект Dox *in vivo* и *in vitro*, что делает комбинацию этих препаратов потенциально интересной для клинических исследований.

Обнаружение комплексообразования между фуллереном C_{60} и антибиотиком Dox проводилось различными физико-химическими методами [13, 59, 63, 65, 66]. Во всех этих исследованиях были получены противоречивые результаты. Так, АСМ-микроскопия в физиологических условиях и растворе с малой соленостью, гипохромный сдвиг в УФ-видимой спектроскопии, положительный сдвиг пика дзета-потенциала, изменение диффузного потенциала, измеренного методом DOSY ЯМР-спектроскопии, а также малоугловое рассеяние нейтронов показали образование комплексов между молекулами фуллерена C_{60} и Dox. В то же время, существует набор экспериментальных данных, свидетельствующих об отсутствии какого-либо комплексообразования между этими веществами. В частности, при высоких концентрациях фуллерена гипохромный сдвиг меняется гипохромным в УФ-видимой спектроскопии, в калориметрических исследованиях изотермического титрования (показан почти нулевой тепловой эффект при смешивании растворов), кроме того, в 1H ЯМР-эксперименте кривые титрования показали очень малый сдвиг [63, 65].

Наблюдаемое различие в результатах физико-химических методов, которые прямо свидетельствуют об образовании комплексов молекул, или, напротив, опровергают комплексообразование C_{60} -Dox, получили полную интерпретацию в [65]. Суть этого взгляда основана на двух основных утверждениях:

1) первая гидратирующая оболочка вокруг фуллеренов C_{60} не может быть отделена комплексом Dox, что приводит к большому расстоянию ($\sim 0,5 \text{ \AA}$) между поверхностями молекул Dox и C_{60} в комплексе. Как следствие, магнитное экранирование 1H ЯМР может быть минимальным (что и показано в эксперименте), и энтальпийный вклад Ван-дер-Ваальсовых и электростатических сил может быть ослаблен (как показано в эксперименте ИТС). Следовательно, комплексообразование C_{60} -Dox, по-видимому, обусловлено энтропийным вкладом, то есть главным образом определяется гидрофобной силой вследствие удаления молекул воды из гидратных оболочек второго и более высокого уровня вокруг частиц фуллерена C_{60} ;

2) связывание молекул Dox при умеренных и высоких концентрациях фуллерена C_{60} в основном происходит посредством адсорбции в большие кластеры фуллерена C_{60} , что приводит к эффекту, называемому «индуцированная лигандом агрегация фуллерена C_{60} ». Вкратце, положительно заряженные молекулы Dox, поглощаемые отрицательно заряженными кластерами фуллерена C_{60} , вызывают дополнительный рост кластеров из-за ослабления электростатического отталкивания между молекулами C_{60} . Это вызывает дополнительное рассеяние света (как доказано в эксперименте УФ-видимой спектроскопии) и приводит к обратному самодиффузионному поведению молекул Dox (как показано в эксперименте DOSY ЯМР).

Физическая модель взаимодействия C_{60} -Dox, изложенная в этих двух утверждениях, позволила построить термодинамическую модель их взаимодействия и вычислить соответствующую равновесную константу гетероассоциации, $K_L \approx 6000 \text{ M}^{-1}$ [63]. Она была в дальнейшем использована для корреляции относительного биологического эффекта воздействия смеси C_{60} -Dox на клетки буккального эпителия человека *in vitro* [61] и для сравнения сродства фуллеренового гетерокомплекса C_{60} с различными лекарственными средствами [63].

Водорастворимое неорганическое производное двухвалентной платины, известное как цисплатин (цис-[Pt(II)(NH₃)₂Cl₂]), в настоящее время является одним из наиболее широко используемых химиотерапевтических препаратов для лечения рака. Как и в случае с Dox, основным недостатком Cis является его побочная токсичность, ограничивающая его использование в клинической практике. Однако успех в улучшении медико-биологического эффекта Dox путем смешивания его с фуллереном C_{60} (см. Выше) привел к аналогичным исследованиям со смесью C_{60} -Cis, дающей положительный результат *in vivo* и *in vitro* [62].

Исследование возможного комплексообразования между фуллереном C_{60} и Cis было проведено с использованием протокола, аналогичного в целом рассмотренному выше для взаимодействия C_{60} -Dox [67]. Следует отметить, что прямое комплексообразование между молекулами C_{60} и Cis, вероятно, должно быть относительно слабым по сравнению с системой C_{60} -Dox, поскольку в первом случае π -стэкинг отсутствовал бы. Как и ожидалось, спектры УФ-видимой спектроскопии дали незначительные признаки взаимодействия, а ИТС продемонстрировал практически нулевой тепловой эффект. Напротив, функция распределения пар, полученная методами малоуглового рассеивания нейтронов (рис. 4) подтвердила существование двух видимых статистически различных компонентов в водном растворе, один из которых был отнесен к комплексам C_{60} -Cis.

Этот вывод был частично подтвержден исследованиями SEM и DLS (рис. 5). Последнее исследование показало очевидный сдвиг распределения гидродинамических радиусов светорассеивающих частиц в более высокие числа при добавлении цисплатина к водному раствору фуллерена C_{60} . Показано, что *ab initio* структура комплекса C_{60} -Cis характеризуется стабильным минимумом энергии.

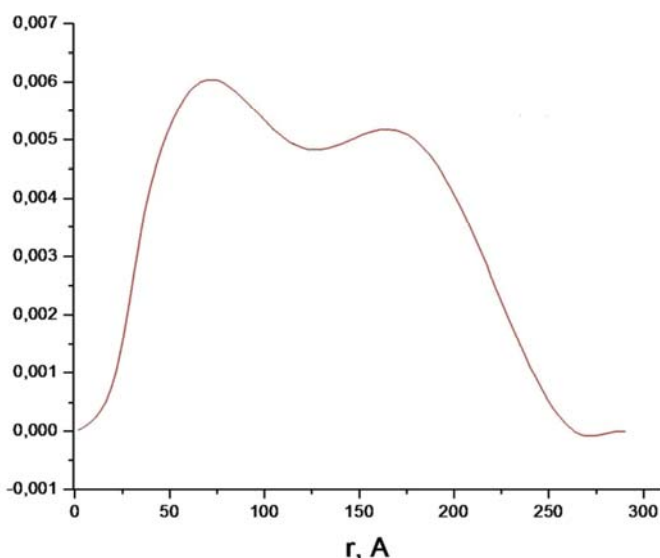


Рисунок 4. Экспериментально полученное значение размеров комплексов C_{60} -цисплатин, полученное методом малоуглового рассеяния нейтронов

В целом было обнаружено, что выявленные закономерности физико-химического взаимодействия фуллерена C_{60} с цисплатином во многом напоминают взаимодействие молекулы C_{60} с противоопухолевым антибиотиком Dox, рассмотренным выше. Комплексообразование Cis с фуллереном C_{60} является энтропийным по происхождению и полностью обусловлено гидрофобными взаимодействиями. Связывание цисплатина происходит в основном в большие кластеры фуллерена C_{60} посредством неспецифической адсорбции, хотя нельзя исключить существование слабых комплексов C_{60} -Cis размерности 1: 1.

Ландомицин А (ЛА) является новым противоопухолевым антибиотиком группы ангуциклинов, обладающим высокой противоопухолевой активностью в отношении раковых клеток различного происхождения, что вызывает ранний апоптоз в клетках-мишенях [69-72].

Данные DLS свидетельствуют о явном сдвиге среднего значения z при добавлении ЛА к C_{60} FAS. Однако наиболее интересным является сопутствующее изменение формы распределения светорассеивающих частиц, которое сужается и смещается в большие размеры. Это наблюдение означает, что раствор ЛА влияет на распределение кластеров фуллерена C_{60} и косвенно указывает на возможность взаимодействия между молекулами ЛА и C_{60} . Величина дзета-потенциала, измеренная для смеси C_{60} -ЛА, сместилась до -10 мВ от первоначального значения -22,1 мВ, измеренного для C_{60} FAS, дополнительно подтверждая возможность взаимодействия. И, наконец, эксперимент малоуглового рассеяния нейтронов также подтвердил изменение радиуса рассеяния в смеси C_{60} -ЛА.

Ландомицин А представляет собой ароматическое соединение, содержащее плоский хромофор бенз[ан]антрахинона. Как следствие, наиболее вероятное расположение молекул в комплексе C_{60} -ЛА 1:1 представляет собой структуру, удерживаемую π -стэкингом. Основной вклад в устойчивость такого комплекса дают взаимодействия между хромофором препарата и поверхностью фуллерена C_{60} , а роль дезоксиолигосахаридной цепи, по-видимому, незначительна.

Самоорганизация фуллерена C_{60} и его комплексообразование с химиотерапевтическими препаратами (в частности, доксорубицином (Dox), цисплатином (Cis) и ландомицином А (ЛА)) в водном растворе были

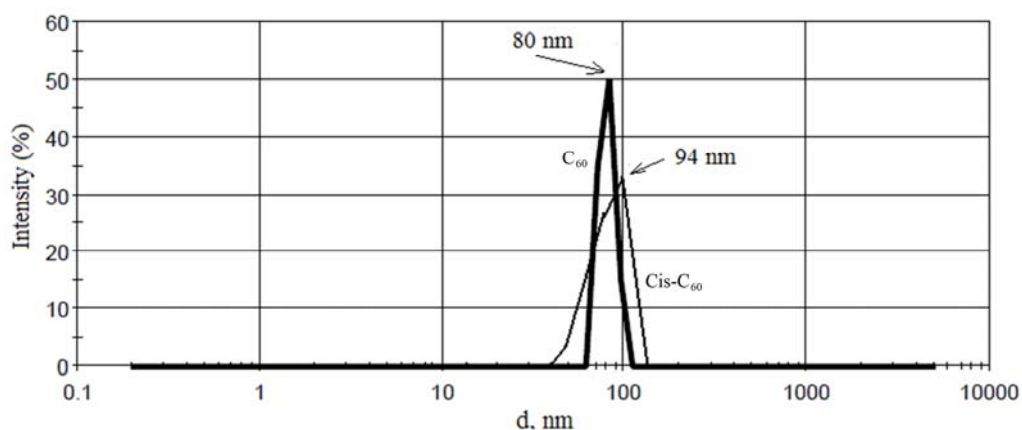


Рисунок 5. Спектр распределения гидродинамических радиусов светорассеивающих частиц

рассмотрены в этой работе как возможная ключевая стадия механизма биологического синергизма *in vivo* и *in vitro*, наблюдаемая, когда эти препараты вводятся совместно с фуллереном C₆₀. Хотя исследуемые препараты сильно различаются по химической структуре и свойствам, было обнаружено, что их термодинамические формы связывания с фуллереном C₆₀ в целом сходны. Помимо определенных особенностей связывания, было обнаружено, что комплексообразование, как правило, является неспецифическим, энтропийным по происхождению и происходящим в основном в большие кластеры фуллерена C₆₀. При этом ведущую роль в процессе играют гидрофобные взаимодействия. Этот физико-химический механизм может быть далее перенесен на биологическую систему, а именно при одновременном введении гидрофобные кластеры фуллерена C₆₀, включающие молекулы Cis, Dox или ЛА, защищают их от реакционной среды при движении в биологической жидкости. Следовательно, эти кластеры могут действовать как система доставки и повышать активную концентрацию лекарственного средства, которое вызывает биологический эффект. Такой механизм, по крайней мере, частично, объясняет биологическую синергию, наблюдаемую экспериментально для смесей C₆₀-Cis и C₆₀-Dox. По-видимому, это спекулятивная модель, которая требует дальнейшего изучения и может быть просто использована в качестве исходной гипотезы в дальнейших исследованиях биологических взаимодействий C₆₀-лекарственного средства. С другой стороны, использование фуллерена C₆₀ в качестве потенциальной системы доставки сейчас широко обсуждается в научной литературе (см. Обзор [44]). Таким образом, предложенная модель хорошо согласуется с механизмом захвата поверхностно-активных соединений кластерами фуллерена C₆₀ [73] и может, вероятно, пролить свет на механизм биологической синергии, наблюдаемой при одновременном введении фуллеренола с Dox [74], который до сих пор не получил объяснения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00157 «Агрегация фуллерена C₆₀ с биологически активными соединениями в водной среде как механизм индуцированной лигандами сборки фуллеренового наноконтейнера для адресной доставки лекарственных препаратов».

Список литературы / References:

1. *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes. Series: Carbon Materials: Chemistry and Physics.* F. Cataldo and T. Da Ros (Eds.), Springer, Netherlands, 2008.
2. Anilkumar P., Lu F., Cao L. et al. Fullerenes for applications in biology and medicine. *Current Med. Chem.*, 2011, vol. 18, p. 2045.
3. Turov V.V., Chehun V.F., Krupskaya T.V. et al. Effect of small addition of C₆₀ fullerenes on the hydrated properties of nanocomposites based on highly dispersed silica and DNA. *Chem. Phys. Lett.*, 2010, vol. 496, p. 152.
4. Foley S., Crowley C., Smaih M. et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 294, p. 116.
5. Prylutska S., Bilyy R., Overchuk M. et al. Water-soluble pristine fullerenes C₆₀ increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2012, vol. 8, p. 522.
6. Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P. et al. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2008, vol. 16, p. 698.
7. Andrievsky G., Klochkov V., Derevyanchenko L. Is the C₆₀ fullerene molecule toxic?! *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2005, vol. 13, p. 363.
8. Levi N., Hantgan R., Lively M. et al. C₆₀-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects. *J. Nanobiotechnol.*, 2006, vol. 4, p. 14.
9. Prylutska S.V., Matyshevskaya O.P., Golub A.A. et al. Study of C₆₀ fullerenes and C₆₀-containing composites cytotoxicity *in vitro*. *Mater. Sci. Engineer C*, 2007, vol. 27, p. 1121.
10. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, vol. 620, p. 168.
11. Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutsky Yu.I. et al. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp. Oncol.*, 2011, vol. 33, p. 162.
12. Prylutska S.V., Burlaka A.P., Klymenko P.P. et al. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nanotechnol.*, 2011, vol. 2, p. 105.
13. Panchuk R.R., Prylutska S.V., Chumak V.V. et al. Application of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo*. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2015, vol. 11, p. 1139.
14. Prylutska S., Skivka L., Didenko G. et al. Complex of C₆₀ fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy. *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, vol. 10, p. 499.
15. Prylutska S.V., Korolovych V.F., Prylutsky Yu.I. et al. Tumor-inhibitory effect of C₆₀ fullerene complex with doxorubicin. *Nanomed. Nanobiol.*, 2015, vol. 2, p. 49.
16. Avdeev M.V., Khokhryakov A.A., Tropin T.V. et al. Structural features of molecular-colloidal solutions of C₆₀ fullerenes in water by small-angle neutron scattering. *Langmuir*, 2004, vol. 20, p. 4363.
17. Mchedlov-Petrosyan N.O. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry. *Chem. Rev.*, 2013, vol. 113, p. 5149.
18. Rud Yu., Buchatsky L., Prylutsky Yu. et al. Using C₆₀ fullerenes for photodynamic inactivation of mosquito iridescent viruses. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2012, vol. 27, p. 614.

19. Chen Z., Mao R., Liu Y. Fullerenes for cancer diagnosis and therapy: preparation, biological and clinical perspectives. *Curr. Drug Metabolism*, 2012, vol. 13, p. 1035.
20. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.H. et al. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, vol. 12, p. 1281.
21. Deguchi S., Alargova R.G., Tsujii K. Stable dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀, in water. Preparation and characterization. *Langmuir*, 2001, vol. 17, p. 6013.
22. Prylutsky Yu.I., Durov S.S., Bulavin L.A. et al. Structure and thermophysical properties of fullerene C₆₀ aqueous solutions. *Int. J. Thermophys.*, 2001, vol. 22, p. 943.
23. Bulavin L., Adamenko I., Prylutsky Y. et al. Structure of fullerene C₆₀ in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, vol. 2, p. 1627.
24. Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Karyakina E.L. et al. Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C₆₀ by electron microscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 1999, vol. 300, p. 392.
25. Ritter U., Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P. et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2015, vol. 23, p. 530.
26. Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Bordyuh A.B., Dovbeshko G.I. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C₆₀ fullerene with help of FTIR reflectance and UV-Vis spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 2002, vol. 364, p. 8.
27. Prilutski Y., Durov S., Bulavin L. et al. Study of structure of colloidal particles of fullerenes in water solution. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1998, vol. 324, p. 65.
28. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L. et al. Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon*, 2004, vol. 42, p. 1203.
29. Labille J., Brant J., Villieras F. et al. Affinity of C₆₀ fullerenes with water. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2006, vol. 14, p. 307.
30. Chen K.L., Elimelech M. Relating colloidal stability of fullerene (C₆₀) nanoparticles to nanoparticle charge and electrokinetic properties. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 7270.
31. Brant J., Lecoanet H., Wiesner M.R. Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. *J. Nanopart. Res.*, 2005, vol. 7, p. 545.
32. Chen K.L., Elimelech M. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Langmuir*, 2006, vol. 22, p. 10994.
33. Brant J.A., Labille J., Bottero J.Y., Wiesner M.R. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry. *Langmuir*, 2006, vol. 22, p. 3878.
34. Labille J., Masion A., Ziarelli F. et al. Hydration and dispersion of C₆₀ in aqueous systems: the nature of water-fullerene interactions. *Langmuir*, 2009, vol. 25, p. 11232.
35. Prylutsky Yu.I., Petrenko V.I., Ivankov O.I. et al. On the origin of C₆₀ fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir*, 2014, vol. 30, p. 3967.
36. Wierzbicki M., Sawosz E., Grodzik M. et al. Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.*, 2013, vol. 8, p. 195.
37. Mchedlov-Petrosyan N.O., Klochkov V.K., Andrievsky G.V. Colloidal dispersions of fullerene C₆₀ in water: some properties and regularities of coagulation by electrolytes. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1997, vol. 93, p. 4343.
38. Meng Z., Hashmi S.M., Elimelech M. Aggregation rate and fractal dimension of fullerene nanoparticles via simultaneous multiangle static and dynamic light scattering measurement. *J. Colloid Interface Sci.*, 2013, vol. 392, p. 27.
39. Khokhryakov A.O., Avdeev M.V., Aksenov V.L., Bulavin L.A. Structural organization of colloidal solution of fullerene C₆₀ in water by data of small angle neutron scattering. *J. Mol. Liq.*, 2006, vol. 127, p. 73.
40. Li L., Bedrov D., Smith G. A molecular-dynamics simulation study of solvent-induced repulsion between C₆₀ fullerenes in water. *J. Chem. Phys.*, 2005, vol. 123, p. 204504.
41. Li L., Bedrov D., Smith G.D. Water-induced interactions between carbon nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, p. 10509.
42. Wang C.I., Hua C.C., Chen S.A. Dynamic solvation shell and solubility of C₆₀ in organic solvents. *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, p. 9964.
43. Choi J., Snow S.D., Kim J.-H., Jang S.S. Interaction of C₆₀ with water: first-principles modeling and environmental implications. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, vol. 49, p. 1529.
44. Montellano A., Da Ros T., Bianco A., Prato M. Fullerene C₆₀ as a multifunctional system for drug and gene delivery. *Nanoscale*, 2011, vol. 3, p. 4035.
45. Li Z.-Q., Zhang Y.-M., Guo D.-S. et al. Supramolecular assembly with multiple preorganised π -electronic. *Cages Chem. Eur. J.*, 2013, vol. 19, p. 96.
46. Lyon D.Y., Adams L.K., Falkner J.C., Alvarez P.J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. *J. Environ. Sci. Tech.*, 2006, vol. 40, p. 4360.
47. Song M., Liu S., Yin J., Wang H. Interaction of human serum albumin and C₆₀ aggregates in solution. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, p. 4964.
48. Zhao X., Striolo A., Cummings P.T. C₆₀ binds to and deforms nucleotides. *Biophys. J.*, 2005, vol. 89, p. 3856.
49. Prylutsky Yu.I., Buchelnikov A.S., Voronin D.P. et al. C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, p. 9351.

50. Voronin D.P., Buchelnikov A.S., Kostjukov V.V. et al. Evidence of entropically driven C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *J. Chem. Phys.*, 2014, vol. 140, p. 104909.
51. Walther J.H., Jaffe R.L., Kotsalis E.M. et al. Hydrophobic hydration of C₆₀ and carbon nanotubes in water. *Carbon*, 2004, vol. 42, p. 1185.
52. Hazafy D., Salvia M.-V., Mills A. et al., NMR analysis of Nile Blue (C. I. Basic Blue 12) and Thionine (C. I. 52000) in solution. *Dyes Pigments*, 2011, vol. 88, p. 315.
53. Santiago A.A.H., Buchelnikov A.S., Rubinson M.A. et al. Shape-independent model (SHIM) approach for studying aggregation by NMR diffusometry. *J. Chem. Phys.*, 2015, vol. 142, p. 104202.
54. Corti M., Degiorgio V. Quasi-elastic light scattering study of intermicellar interactions in aqueous sodium dodecyl sulfate solutions. *J. Phys. Chem.*, 1981, vol. 85, p. 711.
55. Attwood D., Blundell R., Mosquera V. Light scattering studies on the association of phenothiazine drugs in aqueous solutions of low ionic strength. *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 157, p. 50.
56. Lu F., Haque S.A., Yang S.-T. et al. Aqueous compatible fullerene–doxorubicin conjugates. *J. Phys. Chem. C*, 2009, vol. 113, p. 17768.
57. Liu J.-H., Cao L., Luo P.G., et al. Fullerene-conjugated doxorubicin in cells. *Appl. Mater. Interfaces*, 2010, vol. 2, p. 1384.
58. Evstigneev M.P. Hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 2014, vol. 33, p. 229.
59. Prylutsky Yu., Borowik A., Gołuński G. et al. Biophysical characterization of the complexation of C₆₀ fullerene with doxorubicin in a prokaryotic model. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, 2016, vol. 47, p. 92.
60. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O. et al. C₆₀ fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs R&D*, 2014, vol. 14, p. 333.
61. Skamrova G.B., Laponogov I.V., Buchelnikov A.S. et al. Interceptor effect of C₆₀ fullerene on the *in vitro* action of aromatic drug molecules. *Eur. Biophys. J.*, 2014, vol. 43, p. 265.
62. Prylutska S., Panchuk R., Gołuński G. et al. C₆₀ fullerene enhances anticancer activity and overcomes tumor cells drug resistance. *Nano Res.*, 2017, vol. 10, p. 652.
63. Evstigneev M.P., Buchelnikov A.S., Voronin D.P. et al. Complexation of C₆₀ fullerene with aromatic drugs. *Chem. Phys. Chem.*, vol. 14, p. 568.
64. Buchelnikov A.S., Kostjukov V.V., Yevstigneev M.P., Prylutsky Yu.I. Mechanism of complexation of the phenothiazine dye methylene blue with fullerene C₆₀. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2013, vol. 87, p. 662.
65. Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Pashkova I.S. et al. Characterization of C₆₀ fullerene complexation with antibiotic doxorubicin. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, vol. 16, p. 23164.
66. Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Cherepanov V.V. et al. Structural organization of C₆₀ fullerene, doxorubicin and their complex in physiological solution as promising antitumor agents. *J. Nanopart. Res.*, 2015, vol. 17, p. 45.
67. Prylutsky Yu.I., Cherepanov V.V., Evstigneev M.P. et al. Structural self-organization of C₆₀ and cisplatin in physiological solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, vol. 17, p. 26084.
68. Rohr J., Hertweck C. *Comprehensive Natural Products II – Chemistry and Biology*. Mander L. and Liu H.-W. (Eds.). Elsevier: Oxford, 2010, pp. 227-303.
69. Ostash B., Korynevskaya A., Stoika R., Fedorenko V. Chemistry and biology of landomycins, an expanding family of polyketide natural products. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2009, vol. 9, p. 1040.
70. Kharel M.K., Pahari P., Shepherd M.D. et al. Angucyclines: biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 2012, vol. 29, p. 264.
71. Lehka L.V., Panchuk R.R., Berger W. et al. The role of reactive oxygen species in tumor cells apoptosis induced by Landomycin A. *Ukr. Biochem. J.*, 2015, vol. 87, p. 72.
72. Yang X., Fu B., Yu B. Total synthesis of Landomycin A, a potent antitumor angucycline antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, p. 12433
73. Dalavalle M., Leonzio M., Calvaresi M., Zerbetto F. Explaining fullerene dispersion by using micellar solutions. *Chem. Phys. Chem.*, 2014, vol. 15, p. 2998.
74. Injac R., Perse M., Cerne M. et al. Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials*, vol. 30, p. 1184.

**SELF-ASSEMBLY OF FULLERENE AND ITS COMPLEXES WITH CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS -
PERSPECTIVE ANTINEOPLASTIC AGENTS****Mosunov A.A., Salo V.A., Voronin D.P., Evstigneev M.P.**

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: aamosunov@sevsu.ru

Abstract. The self-association of unmodified C₆₀ fullerene and its complexation with chemotherapeutic drugs (in particular, doxorubicin, cisplatin and landomycin A) in aqueous solution are considered as a possible key stage of the *in vivo* and *in vitro* biological synergy mechanism observed with the combined use of drugs with C₆₀ fullerene. A complete characterization of the aqueous fullerene solution has been performed; hypotheses have been put forward on the nature of the intermolecular forces stabilizing the fullerene conglomerates. The sizes of fullerene clusters were estimated, and this parameter was compared with the biological activity of the drug and its complexes with other biologically active compounds. For the first time, a mathematical model is proposed for calculating the thermodynamic parameters of fullerene aggregation. The results of the application of various physicochemical methods are analyzed, which makes it possible for better understanding the nature of the forces stabilizing the complexes of fullerene C₆₀ with these drugs. A physicochemical mechanism is proposed which allows, at least partially, explain the biological interaction of the drug C₆₀.

Key words: fullerene C₆₀, antibiotic, aqueous solution, aggregation.