

ВПЛИВ C₆₀-ФУЛЕРЕНУ, ДОКСОРУБІЦИНУ І ЇХ КОМПЛЕКСУ НА ПУХЛИННІ ТА НОРМАЛЬНІ КЛІТИНИ МИШЕЙ ЛІНІЇ BALB/c

С. В. Прилуцька¹
Г. В. Діденко²
Ю. М. Кічмаренко¹
О. О. Круць¹
Г. П. Потебня²
В. В. Черепанов³
Ю. І. Прилуцький¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Україна

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

³Інститут фізики НАН України, Київ

E-mail: psvit@bigmir.net

Отримано 30.09.2013

Однією з головних стратегій у протипухлинній терапії залишається пригнічення проліферативної активності злоякісних клітин. Однак протипухлинна дія традиційних хіміопрепаратів завжди пов'язана з численними побічними ефектами, зокрема є токсичною щодо органів у нормі й у багатьох випадках сприяє прогресуванню пухлин. У зв'язку із цим виникає потреба розроблення альтернативних методів терапії пухлин та пошуку нових не/низькотоксичних (щодо нормальних клітин) пухлинотропних речовин, які спричиняють їх деструкцію. Токсична дія таких речовин на клітини пухлини може реалізовуватися стимуляцією їх загибелі внаслідок некрозу чи апоптозу. Для контролю цих процесів пропонують застосувати немодифіковані C₆₀-фулерени, які здатні у комбінованій терапії підвищувати протипухлинну активність традиційних протипухлинних препаратів, запобігаючи їх токсичній дії на організменому рівні внаслідок пригнічення реакцій переокиснення.

Оцінено токсичний ефект створеного комплексу немодифікованого C₆₀-фулерену з антибіотиком антрациклінового ряду доксорубіцином на пухлинні (асцитна карцинома Ерліха) та імунікомпетентні (лімфоцити і макрофаги) клітини й гепатоцити, який свідчить про потенційно високу ефективність його застосування у протипухлинній терапії.

Ключові слова: C₆₀-фулерен, доксорубіцин, комплекс C₆₀+Докс, токсичність *in vitro*.

Однією з актуальних проблем розвитку сучасної біотехнології є вирішення комплексного завдання, що лежить на стику хімії, фізики, матеріалознавства, біології та медицини і передбачає цілеспрямований дизайн, синтез і вивчення функціональних властивостей наноматеріалів (розміром до 100 нм, принаймні в одному з вимірів), яким притаманні висока біодоступність і біосумісність, низька токсичність та висока специфічна біологічна активність, для практичного застосування їх у лікуванні найпоширеніших захворювань. Очікується, що в найближчому майбутньому за допомогою запропонованих унікальних нанобіотехнологій буде вирішено проблему ранньої діагностики злоякісних пухлин із визначенням їх локалізації та адресного доставлення лікарських препаратів до органів-мішеней. Серед можливих

перспективних і ефективних біомедичних лікарських засобів важливе місце посідає C₆₀-фулерен.

C₆₀-фулерен — це молекула майже сферичної форми діаметром 0,72 нм, поверхня якої складається з 60 атомів вуглецю, поєднаних між собою одинарними і подвійними хімічними зв'язками [1]. Вона синтезується доступними хімічними методами, характеризується високою хімічною стабільністю й унікальними фотофізичними властивостями [2, 3]. Завдяки нанорозміру, поєднанню міцності з малою масою, анти/прооксидантним властивостям [4–6], біодоступності, здатності взаємодіяти з біомолекулами і проникати всередину клітин [7, 8] немодифіковані C₆₀-фулерени є потенційними фармацевтичними сполуками нового класу [9–13]. Однак поряд із широкими перспективами у вико-

ристанні таких речовин для профілактики і лікування захворювань на цьому шляху існують також певні проблеми й перестороги. Так, дані біологічних досліджень водних дисперсій C_{60} -фулеренів свідчать про їх можливий токсичний вплив на організм людини. З другого боку, наводяться аргументовані докази, що немодифіковані C_{60} -фулерени не є токсичними загалом або принаймні не виявляють гострої токсичної дії у системах *in vitro* та *in vivo* за низьких (фізіологічних) концентрацій [14–16]. Наразі достовірно встановлено, що токсичність молекул C_{60} істотно залежить від модифікації їхньої поверхні, умов синтезу і обробки, концентрації наночастинок у середовищі розчинника і, відповідно, розміру утворених з них агрегатів (кластерів). Припускають, що головними механізмами цитотоксичної дії C_{60} -фулеренів є зумовлене ними пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) та пов'язані з цим наслідки, зокрема хімічне ушкодження ДНК і некроз [17].

Так, під час інкубації трансформованих гепатоцитів лінії HepG2 із C_{60} -фулеренами у водній суспензії за концентрації 0,46 мг/мл виявили незначне збільшення вмісту 8-окси-7,8-дигідро-2'-дезоксигуанозину [18]. Однак формування ковалентних аддуктів ДНК при цьому не відбувалось.

За оцінювання методом «ДНК-комет» ДНК-ушкоджувальної дії суспензій C_{60} -фулеренів у воді та етанолі щодо клітин лімфоцитів людини виявлено дозозалежну токсичність [19]. Порівняно з водною суспензією C_{60} -фулеренів ДНК-ушкоджувальна відповідь на дію C_{60} -молекул, суспендованих в етанолі, була нижчою за однакових концентрацій (2,2 мкг/мл). Припускають, що ця відмінність зумовлена різною концентрацією агрегатів C_{60} -фулеренів у суспензіях або збільшенням гідроксилуванням їхньої поверхні в етанолі. Ушкодження ДНК відбувалось унаслідок окисного механізму.

Додавання немодифікованих C_{60} -фулеренів у діапазоні концентрацій 10^{-6} – 10^{-5} М (розмір наночастинок не перевищував 3 нм) до суспензій тимоцитів не впливало на їхню життєздатність, накопичення продуктів ПОЛ у гомогенатах печінки і мозку та стійкість еритроцитів до гемолізу упродовж 24 год інкубації [20, 21].

Одним із найпоширеніших терапевтичних засобів у хіміотерапії раку є антибіотик антрациклінового ряду доксорубіцин (Докс) [22, 23]. Однак його головними недоліками є кардіотоксичність і невисока специфічність, що суттєво знижує ефективність лі-

кувального ефекту. Тому для поліпшення ефективності терапевтичної дії Докс виникає потреба розвивати альтернативні методи лікування злоякісних пухлин, включаючи цілеспрямований пошук нових субстанцій (зокрема, таргетних носіїв та агентів, які сприятимуть зниженню побічних ефектів). Можна припустити, що іммобілізація Докс на C_{60} -фулерені [24] запобігатиме його токсичній дії на інтактні клітини та посилюватиме проникнення його у клітини-мішені.

Метою роботи було оцінювання токсичного ефекту комплексу C_{60} -фулерену з доксорубіцином (C_{60} +Докс) на різні типи клітин (пухлинні, імунокомпетентні, гепатоцити) та порівняння його з дією C_{60} -молекул і Докс окремо за умов *in vitro*.

Матеріали і методи

Синтез C_{60} -фулерену. Вуглецеву сажу одержували шляхом випаровування карбонових стержнів (Fa. Schunk) в електричній дузі напругою 24 В в атмосфері гелію (0,2 бар). Сажу екстрагували упродовж 6 год у киплячому толуолі. Нерозчинні часточки сажі видаляли фільтруванням. Після цього фільтрат підігрівали у потоці азоту для випаровування розчинника. Розділення суміші C_{60} -та C_{70} -фулеренів проводили з використанням флеш-хроматографії на силікагелі/активованому вуглеці з використанням як елюенту толуолу. Чистота отриманої фракції C_{60} -фулерену становила >98%. Для подальшого розділення і аналізу суміш розчиняли в толуолі та фракціонували з використанням високоефективного рідинного хроматографа (Jasco PU-2086), приєднаного до багатохвильового УФ/ВИД-детектора (Jasco UV-2077) і автосамплера, а також колонки Cosmosil Buckyprep Packed Column з толуоловою мобільною фазою. Швидкість потоку становила 20 мл/хв. Чистота фракції C_{60} -фулерену — >99,5%. Слід зазначити, що подальше його очищення можливе шляхом високовакуумної сублимації.

Синтез водного колоїдного розчину C_{60} -фулерену. Для приготування водного колоїдного розчину використовували насичений розчин чистого C_{60} -фулерену в толуолі (чистота >99,5%), де його концентрація відповідала максимальній розчинності ~2,9 мг/мл, та однаковий об'єм дистилату у відкритому стакані [25, 26]. Дві утворені фази піддавали дії ультразвуку. Процедура виконували до повного випаровування толуолу і набуття водною фазою жовтого забарвлення.

Фільтрацією водного розчину відділяли потрібний продукт від нерозчиненого C_{60} -фулерену. За допомогою цього методу вдається отримати різні його концентрації у воді — від 0,01 до 1,2 мг/мл. Вимірювали спектри поглинання C_{60} -фулерену у воді в діапазоні довжин хвиль $\lambda = 200\text{--}700$ нм за кімнатної температури. Як виявилось, в УФ-ділянці спектра домінують дві інтенсивні широкі смуги поглинання з максимумами при 265 і 345 нм [25]. Одержаний водний колоїдний розчин цієї сполуки за максимальної концентрації 0,15 мг/мл є стабільним упродовж 12 місяців за температури 4 °С.

Характеристика стану C_{60} -фулерену у водному розчині за допомогою атомно-силової мікроскопії. Стан C_{60} -фулерену контролювали за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ; комерційна система Solver Pro M; NT-MDT, Росія) за кімнатної температури. Для цього на свіжосколоту підкладку зі слюди (V-1 Grade, SPI Supplies) наносили краплю водного колоїдного розчину C_{60} -фулерену за різних концентрацій. АСМ-вимірювання проводили з використанням зондів NSG10 (NT-MDT) після повного випаровування розчинника. Візуалізацію зразків здійснювали у напівконтактному режимі.

Приготування суміші C_{60} +Докс. В експериментах використовували Докс (Pfizer, Італія; ліофілізований порошок 10 мг), розчинений у фізрозчині (0,9% NaCl), за вихідної концентрації 0,15 мг/мл. Імобілізацію Докс на C_{60} -фулерені проводили згідно з методикою: вихідний водний розчин C_{60} -фулерену і Докс змішували в об'ємному співвідношенні 1:2. Одержану суміш обробляли на ультразвуковому диспергаторі упродовж 15 хв, після чого перемішували протягом 8 год на магнітній мішалці за кімнатної температури. Вимірювали спектри поглинання нативного Докс і суміші C_{60} +Докс в діапазоні довжин хвиль $\lambda = 400\text{--}600$ нм за кімнатної температури. Виразений гіпохромний ефект, що спостерігається в експерименті, свідчить про формування стабільного комплексу між Докс і C_{60} -фулереном [24].

Експеримент *in vitro*. Імунокомпетентні клітини і гепатоцити виділили з мишей (самці лінії Balb/c віком 2,0–2,5 міс масою 20–25 г), яким було перещеплено карциному Ерліха (внутрішньом'язово у кінцівку тварини; кількість пухлинних клітин $\sim 5 \times 10^5$). Лімфоцити і гепатоцити одержували методом центрифугування (1500 об/хв, 40 хв) у градієнті густини фіколверографіну ($\rho = 1,077$) [27] суспензії клітин селезінки і печінки, відповідно. Перитонеальні макро-

фаги з черевної порожнини тварин отримували шляхом промивання 89%-м середовищем RPMI 1640 з додаванням 10%-ї ембріональної телячої сироватки і 1%-го гепарину (5 од/мл) та наступним центрифугуванням (1 000 об/хв, 10 хв). 10 мкл водного розчину C_{60} -фулерену (0,15 мг/мл), Докс (0,15 мг/мл) і суміші C_{60} +Докс додавали до 100 мкл суспензії тест-клітин (у кількості $\sim 10^5$) та інкубували упродовж 18 год.

Цитотоксичний ефект досліджуваних препаратів і цитотоксичну активність імунокомпетентних клітин оцінювали за МТТ-тестом [28], який ґрунтується на здатності мітохондріальних дегідрогеназ конвертувати водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразоліум бромід (МТТ) у формазан, який кристалізується у клітині. Для візуалізації життєздатних пухлинних клітин також використовували МТТ.

Статистика. Статистичний аналіз вірогідності експериментальних даних проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента (за рівня значущості $P \leq 0,05$) з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова–Смирнова.

Результати та обговорення

Відомо, що немодифіковані C_{60} -фулерени мають виражену тенденцію до агрегації у водному розчині [29–31]. Тому правомірно постає питання: яка форма цієї наноструктури виявляє специфічну біологічну активність — поодинокі молекули чи її кластер? Для характеристики складу одержаного водного розчину C_{60} -фулерену проводили вимірювання АСМ. Одержані зображення АСМ (рис. 1) чітко вказують на присутність у воді як окремих C_{60} -молекул, так і їх агрегатів з характерним розміром 2–60 нм, що добре узгоджується з теоретичними розрахунками [29–32] і даними малокутового розсіяння нейтронів [25].

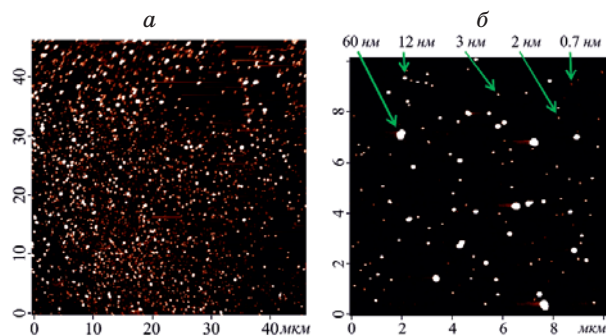


Рис. 1. АСМ-зображення структурованого стану C_{60} -фулерену у воді за різної концентрації: 0,15 (а) і 0,015 мг/мл (б)

Експерименти з визначення життєздатності клітин різного походження (асцитна карцинома Ерліха, лімфоцити, макрофаги та гепатоцити) за МТТ-тестом показали, що найбільш оптимальною є тестована концентрація C_{60} -фулерену у воді 0,15 мг/мл: саме в цьому разі виявляється максимальний токсичний ефект C_{60} -фулерену на клітини пухлини (28%) і водночас — його відсутність на макрофаги, лімфоцити і гепатоцити (вибірковість дії C_{60} -фулерену). Більш того, використання C_{60} -фулерену спричинювало стимуляцію функціональної активності лімфоцитів на 20%, що, можливо, зумовлено посиленням метаболізму або частковим зростанням їх проліферації.

Використання Докс у концентрації 0,15 мг/мл призвело до вираженого токсичного ефекту на пухлинні клітини і макрофаги (24%) та відсутності такого на лімфоцити і гепатоцити.

Застосування комплексу C_{60} +Докс порівняно з дією C_{60} -фулерену і Докс сприяло значному зростанню токсичного впливу на клітини пухлини (73%) та функціональної активності лімфоцитів (37%). Токсичний ефект комплексу C_{60} +Докс щодо макрофагів і гепатоцитів практично не змінювався порівняно з дією Докс. У разі введення C_{60} -фулерену токсична дія комплексу C_{60} +Докс на макрофаги зростала (23%) і взагалі не виявлялась щодо гепатоцитів.

Цитотоксичну активність лімфоцитів на клітини пухлини було використано як індикатор імунітету [33]. Із застосуванням МТТ-тесту з додаванням до пухлинних клітин аутологічних лімфоцитів (1:5) встановлено, що в контролі цитотоксична активність лімфоцитів становила близько 7%, тоді як додавання до тесту комплексу C_{60} +Докс призводило до значного зростання цієї величини — 90%. Мікроскопічні зображення, наведені на рис. 2, ілюструють результат токсичної дії лімфоцитів на клітини пухлини через 18 год інкубації у контролі та з додаванням комплексу C_{60} +Докс.

REFERENCES

1. Kroto H. W., Heath S., O'Brien S. C., Curl R. F., Smalley R. E. C_{60} : Buckminsterfullerene. *Nature*. 1985, V. 318, 162–163.
2. Eletsii A. V., Smirnov B. M. Fullerenes and structures of carbo. *Uspekhi Fiz. Nauk*. 1995, V. 165, 977–1009. (In Russian).
3. Dresselhaus M. S., Dresselhaus G., Eklund P. C. Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes: Their Properties and Applications. *New York: Academic Press*. 1996, 985 p.
4. Burlaka A. P., Sidorik E. P., Prylutska S. V., Matyshevskaya O. P., Golub A. A., Prylutskiy Yu. I., Scharff P. Catalytic system of the reactive

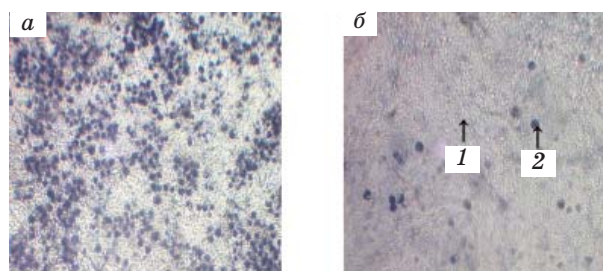


Рис. 2. Результат токсичної дії лімфоцитів на пухлинні клітини асцитної карциноми Ерліха через 18 год інкубації: у контролі (а) та з додаванням комплексу C_{60} +Докс (б); 1 — лімфоцити; 2 — клітини пухлини; збільшення $\times 160$

Отже, утворення комплексу C_{60} -фулерен+Докс [13, 24] слід розглядати як потенційно новий механізм фармакологічної дії протипухлинного препарату Докс за його комбінованого використання із C_{60} -фулереном, адже *in vitro* введення комплексу C_{60} +Докс призводить до значного підвищення як токсичного впливу на пухлинні клітини (майже втричі), так і функціональної активності лімфоцитів (майже вдвічі) порівняно з введенням цих препаратів окремо (синергічний ефект). Активація лімфоцитів, яка має місце у цьому разі, стимулює загибель клітин пухлини.

Окрім того, завдяки наявності унікальної системи спряжених подвійних зв'язків на поверхні C_{60} -фулерену він здатен нейтралізувати активні форми кисню (АФК), приєднуючи неспарений електрон та перетворюючись на стабільний радикал C_{60}^- , що може бути використано для запобігання цитотоксичним ефектам АФК, які продукуються в інтактних клітинах у випадку використання протипухлинного препарату Докс (антиоксидантна активність C_{60} -фулерену).

І нарешті, сам по собі C_{60} -фулерен може слугувати засобом доставлення протипухлинного агента Докс до клітин злоякісних пухлин.

- oxygen species on the C_{60} fullerene basis. *Exp. Oncol.* 2004, V. 26, 326–327.
5. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Matyshevskaya O. P., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Antioxidant properties of C_{60} fullerenes *in vitro*. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* 2008, V. 16, 698–705.
6. Scharff P., Ritter U., Matyshevskaya O. P., Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Golub A. A., Prylutskiy Yu. I., Burlaka A. P. Therapeutic reactive oxygen generation. *Tumori*. 2008, V. 94, 278–283.
7. Schuetze C., Ritter U., Scharff P., Bychko A., Prylutska S., Rybalchenko V., Prylutskiy Yu.

- Interaction of N-fluorescein-5-isothiocyanate pyrrolidine-C₆₀ compound with a model bimolecular lipid membrane. *Mater. Sci. Engineer. C*. 2011, V. 31, 1148–1150.
8. Prylutska S., Bilyy R., Overchuk M., Bychko A., Andreichenko K., Stoika R., Rybalchenko V., Prylutskiy Yu., Tsierkezos N. G., 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, V. 8, 522–527.
 9. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp. Oncol.* 2011, V. 33, 162–164.
 10. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Klymenko P. P., Grynyuk I. I., Prylutskiy Yu. I., Schuetze Ch., Ritter U. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nanotechnol.* 2011, V. 2, 105–110.
 11. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Comparative study of antitumor effect of pristine C₆₀ fullerenes and doxorubicin. *Biotechnol.* 2011, V. 4, 82–87.
 12. Prylutska S. V., Kichmarenko Yu. M., Bogutska K. I., Prylutskiy Yu. I. C₆₀ fullerene and its derivatives as antitumor agents: prospects and problems. *Biotechnologiya*. 2012, 5(3), 9–17. (In Ukrainian).
 13. Panchuk R. R., Chumak V. V., Skorokhid N. R., Lehka L. V., Prylutska S. V., Heffeter P., Berger B., Stoika R. S., Prylutskiy Yu. I. Synergic antineoplastic effect of doxorubicin with C₆₀ fullerene as a means of its delivery to malignant human cells *in vitro* experiments: cellular and molecular mechanisms. *Biol. Studii*. 2013, 7(1), 5–18. (In Ukrainian).
 14. Andrievsky G., Klochkov V., Derevyanchenko L. Is the C₆₀ Fullerene Molecule Toxic?! *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* 2005, V. 13, 363–376.
 15. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007, V. 620, 168–180.
 16. Aschberger K., Johnston H. J., Stone V., Aitken R. J., Tran C. L., Hankin S. M., Peters S. A., Cristensen F. M. Review of fullerene toxicity and exposure-appraisal of a human health risk assessment, based on open literature. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010, V. 58, 455–473.
 17. Rouse J. G., Yang J., Barton A. R., Monteiro-Reviere N. A. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. in vitro*. 2006, V. 20, 1313–1320.
 18. Matsuda S., Matsui S., Shimizu Y., Matsuda T. Genotoxicity of colloidal fullerene C₆₀. *Environ. Sci. Technol.* 2011, V. 1, 4133–4138.
 19. Dhawan A., Taurozzi J. S., Pandey A. K., Shan W., Miller S. M., Hashsham S. A., Tarabara V. V. Stable colloidal dispersions of C₆₀ fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 2006, V. 40, 7394–7401.
 20. Prylutska S. V., Matyshevska O. P., Golub A. A., Prylutskiy Yu. I., Potebnya G. P., Ritter U., Scharff P. Study of C₆₀ fullerenes and C₆₀-containing composites cytotoxicity *in vitro*. *Mater. Sci. Engineer. C*. 2007, V. 27, 1121–1124.
 21. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Grebinyk S. M., Matyshevska O. P., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Siegmund C., Scharff P. Comparative study of biological action of fullerenes C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 2009, V. 40, 238–241.
 22. Hrelia S., Fiorentini D., Maraldi T., Angeloni C., Bordoni A., Biagi P. L., Hakim G. Doxorubicin induced early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Acta*. 2002, V. 64, 139–145.
 23. Abou El Hassan M. A., Verheul H. M., Jorna A. S., Schalkwijk C., van Bezu J., van der Vijgh V. J. F., Bast A. The new cardioprotector monohydroxyethylrutoside protects against doxorubicin-induced inflammatory effects *in vitro*. *Brit. J. Cancer*. 2003, V. 98, 357–362.
 24. Evstigneev M. P., Buchelnikov A. S., Voronin D. P., Rubin Yu. V., Belous L. F., Prylutskiy Yu. I., Ritter U. Complexation of C₆₀ fullerene with aromatic drugs. *Chem. Phys. Chem.* 2013, V. 14, 568–578.
 25. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L., Dmytruk I. M., Bilyi M. M., Golub O. A., Khavryuchenko A. V., Buzaneva E. V., Aksenov V. L., Avdeev M. V., Prylutskiy Yu. I., Durov S. S. Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon*. 2004, V. 42, 1203–1206.
 26. Prylutska S. V., Matyshevska O. P., Grynyuk I. I., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Biological effects of C₆₀ fullerenes *in vitro* and in a model system. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2007, V. 468, 265–274.
 27. Sashchenko L. P., Lukyanova T. I., Kabanova O. D., Mirkina I. I., Yatskin O. N., Pongor S., Gnuchev N. V. Different pathways of the release of cytotoxic proteins in LAK cells. *Immunol. Lett.* 1996, V. 53, 25–29.
 28. Campling B. G., Pym J., Baker H. M., Cole S. P., Lam Y. M. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *Br. J. Cancer*. 1991, V. 63, 75–83.
 29. Bulavin L., Adamenko I., Prylutskiy Yu., Durov S., Graja A., Bogucki A., Scharff P. Structure of fullerene C₆₀ in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000, V. 2, 1627–1629.
 30. Prylutskiy Yu. I., Durov S. S., Bulavin L. A., Adamenko I. I., Moroz K. O., Geru I. I., Dihor I. N., Scharff P., Eklund P. C., Grigorian L. Structure and thermophysical properties of fullerene C₆₀ aqueous solutions. *Int. J. Thermophys.* 2001, V. 22, 943–956.

31. Prylutskiy Yu. I., Buchelnikov A. S., Voronin D. P., Kostjukov V. V., Ritter U., Parkinson J. A., Evstigneev M. P. C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, V. 15, 9351–9360.
32. Prilutski Yu. I., Durov S. S., Yashchuk V. N., Ogul'chansky T. Yu., Pogorelov V. E., Astashkin Yu. A., Buzaneva E. V., Kirghizov Yu. D., Andrievsky G. V., Scharff P. Theoretical predictions and experimental studies of self-organization C₆₀ nanoparticles in water solution and on the support. *Europ. Phys. J. D.* 1999, V. 9, 341–343.
33. Ohno M., Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Meth.* 1991, V. 145, 199–203.

**ВЛИЯНИЕ C₆₀-ФУЛЛЕРЕНА,
ДОКСОРУБИЦИНА И ИХ КОМПЛЕКСА
НА ОПУХОЛЕВЫЕ И НОРМАЛЬНЫЕ
КЛЕТКИ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c**

С. В. Прилуцкая¹, Г. В. Диденко²,
Ю. М. Кичмаренко¹, А. А. Круць¹,
Г. П. Потєбня², В. В. Черепанов³,
Ю. И. Прилуцкий¹

¹Киевский национальный университет имени
Тараса Шевченко, Украина

²Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии

им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

³Институт физики НАН Украины, Киев

E-mail: psvit@bigmir.net

Одной из основных стратегий в противоопухолевой терапии остается угнетение пролиферативной активности злокачественных клеток. Однако противоопухолевое действие традиционных химиопрепаратов всегда связано с многочисленными побочными эффектами, в частности является токсичным относительно органов в норме и во многих случаях способствует прогрессированию опухолей. В связи с этим возникает необходимость разработки альтернативных методов терапии опухолей и поиска новых не/низкотоксичных (относительно нормальных клеток) опухолетропных веществ, которые вызывают их деструкцию. Токсическое действие таких веществ на клетки опухоли может реализовываться стимуляцией их гибели вследствие некроза или апоптоза. Для контроля этих процессов предлагается использовать немодифицированные C₆₀-фуллерены, которые способны в комбинированной терапии повышать противоопухолевую активность традиционных противоопухолевых препаратов, предотвращая их токсическое действие на организменном уровне вследствие ингибирования реакций перекисления.

Оценен токсический эффект созданного комплекса немодифицированного C₆₀-фуллере-на с антибиотиком антрациклинового ряда доксорубицином на опухолевые (асцитная карцинома Эрлиха) и иммунокомпетентные (лимфоциты и макрофаги) клетки и гепатоциты, свидетельствующий о потенциально высокой эффективности его применения в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: C₆₀-фуллерен, доксорубицин, комплекс C₆₀+Докс, токсичность *in vitro*.

**EFFECT OF THE C₆₀ FULLERENE,
DOXORUBICIN AND THEIR COMPLEX
ON CANCER AND NORMAL CELLS
OF BALB/c MICE**

S. V. Prylutska¹, G. V. Didenko²,
Yu. M. Kichmareno¹, O. O. Kruts¹,
G. P. Potebnya², V. V. Cherepanov³,
Yu. I. Prylutskiy¹

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv

²Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology

of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

³Institute of Physics of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: psvit@bigmir.net

One of the main strategies in anticancer therapy is inhibition of the proliferative activity of cancer cells. However, antitumor action of conventional chemotherapy is always associated with numerous side effects, in particular it is toxic with respect to normal organs and in many cases promotes the progression of tumors. In this regard, there is a need to develop alternative therapies of tumors and the search of new non/low toxic (relative to normal cells) tumoricidal substances, which cause their degradation. Toxic effects of these substances on cancer cells can be realized by stimulating their death due to necrosis or apoptosis. To controlling these processes the use of pristine C₆₀ fullerenes, which are capable in *combination therapy* to improve the antitumor activity of traditional antitumor drugs, preventing their toxic effect on the organ level by inhibiting reactions of peroxidation, is proposed.

The toxic effect of the created pristine C₆₀ fullerene with an antibiotic anthracyclines doxorubicin (Dox) complex on tumor (Ehrlich ascites carcinoma) and immune (lymphocytes and macrophages) cells and hepatocytes was evaluated. It demonstrates the potential for high efficiency of C₆₀+Dox complex use in cancer therapy.

Key words: C₆₀ fullerene, doxorubicin, C₆₀+Dox complex, toxicity *in vitro*.