



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 92992

(13) C2

(51) МПК-2011.01

A61K 33/44

A61N 5/06

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФОТОСЕНСИБІЛІЗОВАНІ МОДИФІКОВАНІ БАГАТОСТІННІ ВУГЛЕЦЕВІ НАНОТРУБКИ ЯК ПРОТИ-ПУХЛИННІ АГЕНТИ

1

2

(21) а200913924

(22) 30.12.2009

(24) 27.12.2010

(46) 27.12.2010, Бюл.№ 24, 2010 р.

(72) ПРИЛУЦЬКА СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА,  
БУРЛАКА АНАТОЛІЙ ПАВЛОВИЧ, ЛУКІН СЕРГІЙ  
МИКОЛАЙОВИЧ, ПРИЛУЦЬКИЙ ЮРІЙ ІВАНОВИЧ,  
МАТИШЕВСЬКА ОЛЬГА ПАВЛІВНА(73) КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

(56) US 2009/0304581 A1, 10.12.2009

US 2008/0175892 A1, 24.07.2008

CN 101239180 A, 13.08.2008

CN 1 686 165 A, 26.10.2005

CN 1 751 741 A, 29.03.2006

(57) Застосування нетоксичних модифікованих карбоксильними групами багатостінних вуглецевих нанотрубок, опромінених у ближній ІЧ-ділянці світла, як протипухлинних агентів.

Винахід, що заявляється, відноситься до онкології і може використовуватися для модифікації біологічної активності нетоксичних багатостінних вуглецевих нанотрубок (БВНТ) шляхом їх опромінення для генерування активних форм кисню (АФК).

У ряді публікацій [див. огляд 1] продемонстровано, що ВНТ незалежно від їх типу (одностінні ОВНТ чи БВНТ), кількості присутніх домішок металів у їх складі та стану агрегації у водній суспензії не генерують АФК, зокрема супероксидних радикал-аніонів, перекису водню, синглетного кисню і гідроксильних радикалів, а, навпаки, проявляють здатність їх нейтралізувати. Відомо, що ВНТ ефективно поглинають світло в ближній ІЧ-ділянці спектру. Враховуючи цей факт, автори роботи [2] досліджували продукування АФК немодифікованими ОВНТ (ОВНТ розташовувалися на кремнієвій підкладці; чистота зразків ОВНТ та їх довжина складала 90ваг.% і 5-10мкм відповідно) при їх опроміненні ближнім ІЧ-світлом (довжина хвилі - 1мкм) з використанням техніки рентгеноструктурного аналізу. Після опромінення ОВНТ зафіксували збільшення продукування ними АФК у 1,9 раз відносно контролю (неопроміненні ОВНТ). Однак обговорення можливого механізму генерування АФК ОВНТ залишилося поза увагою дослідників.

Отже, здатність ВНТ генерувати АФК під дією ближнього ІЧ-світла може бути використано для цілеспрямованого знешкодження пухлин шляхом контрольованого продукування в них АФК, які у великих кількостях здатні викликати окисний стрес

і загибель клітин шляхом апоптозу чи некрозу [3]. Цікавим об'єктом досліджень у цьому напрямку виявились саме БВНТ, розміри яких значно переважають розміри ОВНТ. Висока питома поверхня БВНТ збільшує їх адсорбційну ємність, що призводить до збільшення продукції АФК і пошкодження біологічних структур злоякісних утворень (ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, тощо). Саме тому нами було досліджено здатність БВНТ генерувати АФК після їх опромінення ближнім ІЧ-світлом.

Основною перешкодою для практичного застосування ВНТ у біомедицині є нерозчинність їх у водному середовищі. Для поліпшення розчинності ВНТ використовують різноманітні методи їх хімічної модифікації. У нашому випадку для отримання водних суспензій БВНТ 100мг БВНТ розмішували в 50мл води під дією струменю аргону протягом 48 год. Отриману суміш фільтрували через мембрану (розмір пори - 1,2мкм), на якій збиралися БВНТ. Фільтрат мав коричневий колір. Розчинність БВНТ у воді забезпечувалася присутністю карбоксильних груп (COOH) на кінцях і частково на поверхні БВНТ, що пов'язано з їх окисненням (шляхом кислотного титрування). Вміст карбоксильних груп (<3 ваг.%) реєстрували за допомогою рентгенівської фотоелектронної спектроскопії. Наявність БВНТ у розчині фіксували спектрофотометрично. Максимальне значення концентрації отриманих БВНТ у воді становило 2мг/мл. Діаметр БВНТ складав 8-12нм, а їх довжина не перевищувала 1мкм. Отримані водні суспензії БВНТ залишалися стабільними

(13) C2

(11) 92992

(19) UA

ми упродовж 3-4 місяців при зберіганні в інтервалі температур (4 - 40)°C.

Для підбору умов фотозбудження були проаналізовані спектри поглинання БВНТ за їх різних концентрацій у водній суспензії. З Фіг.1 видно, що в ІЧ-ділянці спектра присутні інтенсивні смуги з максимумом поглинання при 985нм.

Для перевірки здатності БВНТ, опромінених в діапазоні 780 - 1400нм, продукувати АФК були використані метод ЕПР та технологія спінових уловлювачів, які проявляють високу спорідненість до супероксидного радикал-аніону [3].

З результатів представлених на Фіг.2, а видно, що за присутності у водній суспензії неопромінених БВНТ спостерігали незначні зміни у спектрі ЕПР спінового уловлювача, що вказує на незначне накопичення супероксидного радикал-аніону в середовищі. На нашу думку, цей ефект є результатом присутності невеликої кількості металу-катализатора ферроцину ( $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]$  менше 1ваг.%) всередині ВНТ, який у своєму складі містить залізо. Відомо, що залізо в результаті окиснення може виступати донором електронів для молекул кисню, що і призводить до утворення супероксидного радикал-аніону.

З Фіг.2, б, в видно, що після 30 с опромінення БВНТ ближнім ІЧ-світлом інтенсивність сигналів ЕПР зростає з часом, що свідчить про збільшення концентрації АФК у суспензії. На нашу думку, ці ефекти пов'язані з локальним нагріванням БВНТ внаслідок інтенсивного поглинання світла і наступним випромінюванням тепла в оточуюче середовище.

Проведені теоретичні розрахунки показують, що розсіювання світла досліджуваними БВНТ у досліджуваному діапазоні випромінювання (780-1400)нм не перевищує 4%. Отже, можна припустити, що якщо за відсутності БВНТ не можна активувати АФК падаючим випромінюванням, тоді цього не можливо досягнути також шляхом розсіяного поля. Як наслідок, локальне нагрівання досліджених зразків БВНТ може бути однією з причин утворення АФК в системі.

Згідно отриманих результатів, представлених на Фіг.3, встановлено, що БВНТ генерують АФК зі сталою швидкістю  $9,7 \pm 0,3$  нмоль/(мгхв), незалежно від їх концентрації у воді. Крім того, БВНТ за концентрації 0,1мг/мл (Фіг.3, крива 1), 0,05мг/мл (Фіг.3, крива 2) і 0,01мг/мл (Фіг.3, крива 3) генерували АФК протягом 47, 26 і 21хв, відповідно, після їх опромінення ІЧ-світлом. Після цього криві 1, 2 і 3 досягли насичення і залишалися незмінними протягом доби. Ці ефекти, на нашу думку, залежать від структурного стану БВНТ у водних суспензіях, тобто від їх здатності агрегувати зі зростанням концентрації БВНТ у воді. Згідно отриманих експериментальних результатів можна припустити, що за низьких концентрацій (0,01мг/мл) БВНТ знаходяться у суспензії як поодинокі структури. При підвищенні концентрації до 0,05мг/мл між гідрофобними структурами БВНТ виникають адсорбційні взаємодії, що призводить до утворення агрегатів. При подальшому підвищенні концентрації БВНТ (0,1мг/мл) у суспензії можуть утворюватись кластери більших розмірів. Збільшення розміру/маси

БВНТ призводить до зростання інтенсивності поглинання ними ІЧ-світла у досліджуваному діапазоні і, відповідно, до збільшення їх локального нагрівання, що спричиняє зростання тривалості випромінювання тепла в оточуюче середовище і генерування АФК.

Отже, БВНТ є перспективними наноматеріалами для використання у клінічній практиці з метою регулювання патологічних станів, викликаних порушенням механізмів регуляції метаболізму АФК, а також для фотодинамічної терапії злоякісних пухлин. Однак, ефективність генерування АФК фотозбудженими БВНТ у водній суспензії та біологічному середовищі може бути різною, тому наступним завданням було дослідити генерування АФК БВНТ у системі *in vitro*.

З використанням методу ЕПР та техніки спінових уловлювачів, які проявляють високу спорідненість до супероксидного радикал-аніону, було оцінено вміст АФК у суспензіях трансформованих клітин (клітини асцитної карциноми Ерліха (АКЕ) або лейкозу (L1210)). Встановлено, що у суспензії клітин АКЕ швидкість утворення АФК була вищою і становила  $1,2 \pm 0,1$  нмоль/хв  $\cdot 10^6$  клітин, порівняно із суспензією клітин L1210, де швидкість утворення АФК дорівнювала  $0,9 \pm 0,1$  нмоль/хв  $\cdot 10^6$  клітин.

Оскільки швидкість генерування АФК БВНТ після опромінення не залежить від їх концентрації у водному середовищі, тоді у подальших дослідженнях генерації АФК були використані БВНТ у концентрації 0,1мг/мл, за якої вони не виявляють значного токсичного ефекту [4]. Внесення БВНТ до клітинних суспензій без дії опромінення не впливало на продукцію АФК, що і було використано як контроль (Фіг.4, А). Однак після 30с опромінення ближнім ІЧ-світлом клітинних суспензій АКЕ і L1210 у присутності БВНТ спостерігалось зростання швидкості генерування супероксидних радикал-аніонів, яка становила  $5,4 \pm 0,4$  нмоль/хв  $\cdot 10^6$  клітин у суспензії АКЕ та  $4,8 \pm 0,6$  нмоль/хв  $\cdot 10^6$  клітин у суспензії L1210 (Фіг.4, Б).

Отже, виходячи з отриманих результатів досліджень встановлено, що швидкість генерування АФК у суспензіях трансформованих клітин за присутності 0,1мг/мл БВНТ після їх ІЧ-опромінення зростала у 4,5 рази у присутності клітин АКЕ та в 5,3 рази у присутності клітин L1210 відносно контролю. Ці результати відкривають перспективу використання ВНТ для знищення злоякісних пухлин.

Приклад:

Водну суспензію нетоксичних модифікованих карбоксильними групами БВНТ в об'ємі 200мкл за концентрації 0,1мг/мл опромінювали в діапазоні довжин хвиль (0,78-1,4) мкм інтенсивністю  $3,5 \text{ Вт/см}^2$  протягом 30с і *ex tempore* аналізували швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів з використанням радіоспектрометра ЕПР РЕ-1307 (Росія) і спінового уловлювача 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину [3]. Швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів фотозбудженими БВНТ складала  $(9,7 \pm 0,3) \text{ нМ/мг} \cdot \text{хв}^{-1}$ .

Водну суспензію нетоксичних модифікованих карбоксильними групами БВНТ в об'ємі 1мл вводили внутрішньочеревно мишам самцям гібридам

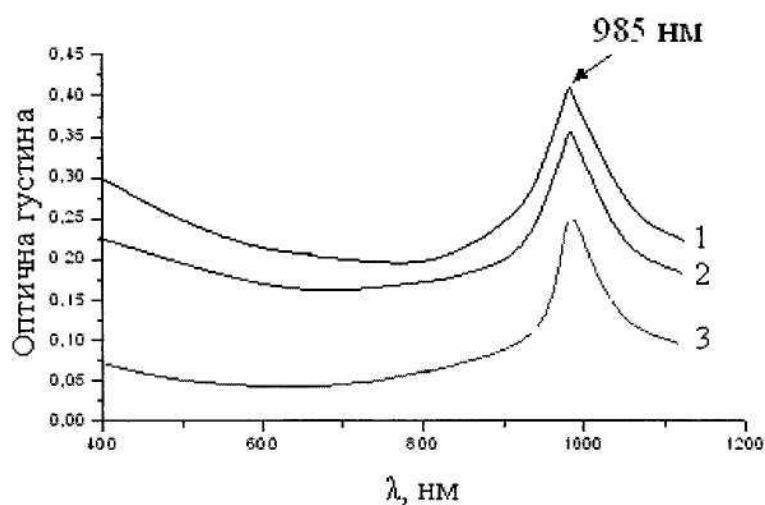
BDFi з перещепленими пухлинами (лейкемія P-388) в дозі  $50\text{мг/м}^2$  і *ex tempore* піддавали їх локальному опроміненню в діапазоні довжин хвиль (0,78-1,4)мкм інтенсивністю  $3,5\text{Вт/см}$  протягом 30с. Введення препаратів починали на 2-й день після перещеплення. Проводили 5-ти денний курс. У кінці курсового застосування БВНТ проводили аналіз протипухлинної активності. У результаті отримали 72% вилікуваних тварин.

1. Прилуцька С.В., Ременяк О.В., Гончаренко Ю.В., Прилуцький Ю.І. Вуглецеві нанотрубки як новий клас матеріалів для біонанотехнології II Біотехнологія. - 2009. - Т. 2, N 2. - С 55-66.

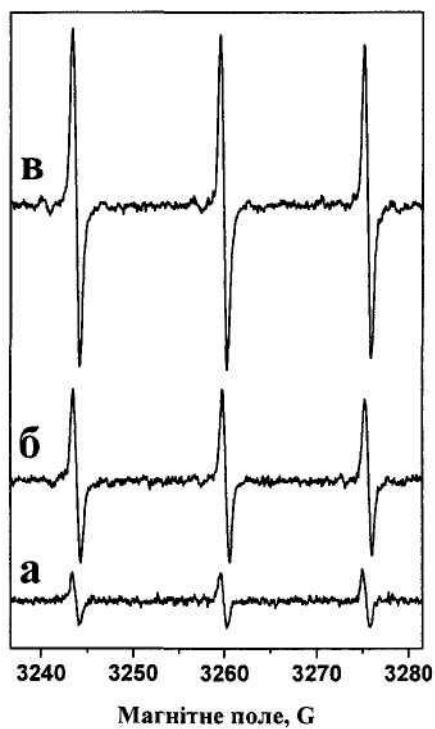
2. Ch. Lee, H. Kim, Y. Cho, W. I. Lee. The properties of porous silicon as a therapeutic agent via the new photodynamic therapy // J. Mat. Chem. - 2007. -Vol. 17.-P. 2648-2653.

3. Бурлака А.П., Сидорик Є.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. - Київ, Наук. Думка. - 2006. - 228 с.

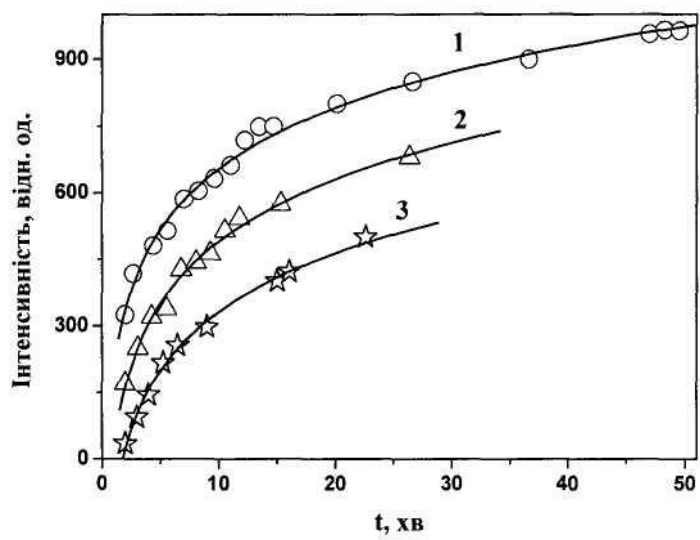
4. Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevska O.P., Yashchuk V.M., Prylutsky Yu.L, Ritter U., Scharff P. Estimation of multi-walled carbon nanotubes toxicity in vitro. II Physica E. - 2008. - Vol. 40, N 7. - P. 2565-2569.



Фіг. 1.



Фіг. 2



Фіг. 3

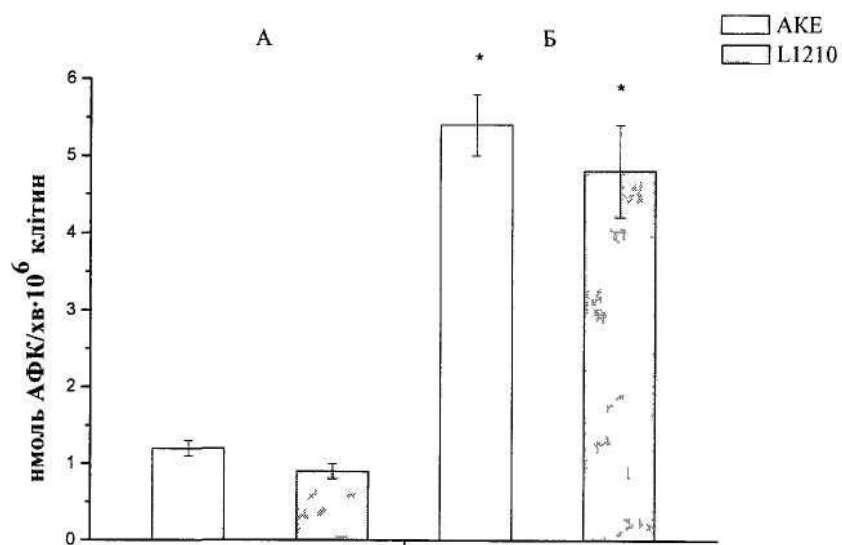


Fig. 4