

# ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

## ВЛИЯНИЕ АГРЕГАТНОГО СОСТОЯНИЯ И ПРИРОДЫ ПОЛИМЕРА-НОСИТЕЛЯ НА ФОТОТОКСИЧНОСТЬ ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> IN VITRO

М. Ю. Еропкин<sup>1</sup>, Л. Б. Пиотровский<sup>2</sup>, Е. М. Еропкина<sup>1</sup>, М. А. Думпис<sup>2</sup>,  
Е. В. Литасова<sup>2</sup>, О. И. Киселев<sup>1</sup>

Исследовали биологические эффекты водорастворимых комплексов включения C<sub>60</sub>/поливинилпирролидон (C<sub>60</sub>/ПВП) и C<sub>60</sub>/гамма-циклодекстрин (C<sub>60</sub>/γ-ЦД), а также твердофазного C<sub>60</sub> (поверхность, покрытая фуллереном) *in vitro*. Установлено, что как оба использованных комплекса включения в широком диапазоне концентраций, так и покрытая фуллереном поверхность нетоксичны в темноте для всех тестируемых клеточных линий. В противоположность этому, при интенсивном освещении УФА-светом комплекс C<sub>60</sub>/ПВП достоверно защищал клетки от УФА-повреждения, в то время как комплекс C<sub>60</sub>/γ-ЦД и покрытая фуллереном поверхность обладали выраженной фототоксичностью, причем твердофазный фуллерен вызывал фотодинамический эффект при облучении не только УФ-, но и видимым светом. Эффект облучения блокировался некоторыми антиоксидантами (гипоксен) и скэвенджером синглетного кислорода азидом натрия, что свидетельствует в пользу участия в фототоксичности активных форм кислорода, в частности <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Полученные данные свидетельствуют, что биологические свойства активных форм кислорода, в частности, фототоксичность фуллерена C<sub>60</sub> *in vitro* зависят от его агрегатного состояния и способа сольubilизации, а также, вероятно, природы сольubilизирующего соединения.

**Ключевые слова:** фуллерен C<sub>60</sub>, гамма-циклодекстрин, поливинилпирролидон, клеточные культуры, световое облучение

### ВВЕДЕНИЕ

Фуллерены как наноструктурная форма углерода всегда привлекали внимание фармакологов в качестве перспективного соединения для создания лекарств. Наиболее важными для их возможного медико-биологического применения физико-химическими свойствами фуллеренов являются: 1) способность генерировать синглетный кислород с высоким квантовым выходом под действием света видимого или УФ-диапазона; 2) высокая аффинность фуллеренового коагумента в отношении доноров электронов, которая определяет его способность быть скэвенджером свободных радикалов; 3) высокая липофильность молекулы C<sub>60</sub>. Таким образом, в биологических системах фуллерен C<sub>60</sub> может быть оксидантом (при освещении), антиоксидантом или мембранотропным агентом.

Мы исследовали биологические эффекты твердофазного C<sub>60</sub> (поверхность, покрытая фуллереном) и водорастворимых комплексов фуллерена C<sub>60</sub> с поливинилпирролидоном мол. массы 25 000 и γ-циклодекстрином как в темноте, так и при интенсивном ультрафиолетовом облучении *in vitro*.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Материалы:** фуллерен C<sub>60</sub> (99,5 %) — “НеоТехПродукт”, С.-Петербург; СОД (эрисод, рексод) — НИИ ОЧБ, С.-Петербург; гипоксен — корпорация “Олифен”, Москва, На-азид — ICN, США, резазурин, Хёхст 33342, МТТ — “Sigma”, США.

**Приготовление покрытой C<sub>60</sub> поверхности:** покрытые фуллереном поверхности были получены упариванием на-

сыщенного раствора фуллерена C<sub>60</sub> в гексане в 48 лунках 96-луночного культурального планшета (“Sarstedt”). В каждую лунку наносили 0,25 мкл раствора, упаривали гексан при температуре 20 – 25 °С, и повторяли процедуру снова до получения желаемой концентрации фуллерена (10, 20 и 30 мкг/см<sup>2</sup>). Нанесение именно этого объема позволяет получать поверхность, покрытую фуллереном на дне лунки и на ее стенках на высоте не более 2 мм. Микроскопические исследования (световая и просвечивающая электронная микроскопия) показали, что поверхность покрыта неравномерно, на ней образуются отдельные изолированные кластеры. Таким образом, изучаемые нами модифицированные фуллереном поверхности представляет собой не сплошную пленку фуллерена на поверхности, а изолированные ассоциаты молекул фуллерена.

**Приготовление комплекса C<sub>60</sub>/поливинилпирролидон:** комплекс C<sub>60</sub>/ПВП получен по описанной ранее методике [2]. В качестве полимера-носителя использовали поливинилпирролидон фирмы “Merck” мол. массы 25 000 или фармакопейный препарат поливинилпирролидона “Энтеродез”. Содержание фуллерена C<sub>60</sub> в исследованных комплексах составляло 0,5 – 0,66 в. %.

**Комплекс C<sub>60</sub>/γ-циклодекстрин (C<sub>60</sub>/γ-ЦД)** получали согласно [17].

Культуры клеток: в качестве основной клеточной линии в работе использовали перевиваемую линию МА-104. В части исследований использовали также линию А-549.

Клетки выращивали в 96-луночных культуральных планшетах в среде Игла-МЕМ с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка (“Sigma”) в течение 24-х часов в СО<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5 % СО<sub>2</sub> до образования конфлуэнтного монослоя. Для дальнейших экспериментов ростовую сре-

<sup>1</sup> НИИ гриппа СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17.

<sup>2</sup> НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН.

ду заменяли на бессывороточную (“поддерживающую”) среду Игла-МЕМ.

УФ-облучение клеток осуществляли в стерильных условиях облучателем мощностью 400 W на расстоянии 30 см от планшета без пластиковой крышки. Спектр облучателя 220 – 400 нм. Для отвода тепла планшета была погружена на 1/3 в кювету с проточной водой, а также подвергалась постоянной вентиляции в течение всего времени экспозиции.

*Тестирование клеточной жизнеспособности и метаболизма.* Были выбраны несколько показателей клеточного метаболизма и/или жизнеспособности: восстановление Аламара голубого (резазурина) — отражает интегральную активность митохондриальных дегидрогеназ и клеточную жизнеспособность [4]. Восстановление тетразолиевого красителя МТТ (тиазолила голубого) — также показатель интенсивности дыхательного метаболизма [7]. Поглощение нейтрального красного — показатель активного мембранного транспорта и эндоцитоза [7]. Связывание флуоресцентного красителя Хехст-33342 (бис-бензimid), пропорциональное количеству ДНК, отражает скорость пролиферации клеток [5, 11]. Активность мембрано-связанного фермента NAD(P)H:хинон оксидоредуктазы (EC 1.6.99.2), одного из важных мембранных ферментов окислительно-восстановительных реакций и детоксификации — показателя окислительного стресса и мембранных функций [14]. Фотометрические и флуориметрические измерения проводили на многофункциональном планшетном анализаторе Chameleon (“Hydex”, Финляндия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами установлено [16], что покрытая  $C_{60}$  полипропиленовая поверхность во всем использованном диапазоне концентраций  $C_{60}$  (10 – 30 мкг/см<sup>2</sup>) нетоксична для клеток в культуре: клетки линии МА-104 (линия почечного эпителия зеленой мартышки) и А-549 (производное карциномы легкого человека) в среде Игла-МЕМ образуют на ней нормальный монослой, причем количество клеток и интенсивность их окислительного метаболизма не имеют достоверных отличий от контрольных клеток, выращенных на обычной пластиковой подложке. Аналогичные данные получены нами для комплекса  $C_{60}$ /ПВП и  $C_{60}$ /γ-ЦД. Комплекс

$C_{60}$ /ПВП в концентрации до 5 мг/мл (при содержании  $C_{60}$  0,5 масс % то есть при концентрации 3,5 мкМ) и инкубации с клетками до 6 суток не оказывал влияния ни на плотность монослоя, ни на микроскопическую структуру клеток, ни на интенсивность дыхательного метаболизма в резазуриновом тесте, причем аналогичные данные получены для самого полимера-носителя — ПВП. Для более детального анализа использовали набор других показателей, описанных в методах (табл. 1).

Комплекс  $C_{60}$ /ПВП не влиял на клеточную пролиферацию, активный мембранный транспорт и эндоцитоз, активность мембранной хинон-оксидоредуктазы — важного фермента, связанного с окислительным стрессом и детоксификацией ксенобиотиков, и на суммарную активность митохондриальных дегидрогеназ. Единственным достоверным отличием было отличие проб с ПВП в тесте восстановления МТТ, но комплекс  $C_{60}$ /ПВП не вызывал достоверных изменений. Можно предположить, что усиливающий тканевое дыхание эффект ПВП связан с высокой концентрацией этого полиэлектролита, которая значительно превышает концентрацию в комплексе самого фуллерена. Это соединение широко используется в качестве главного компонента кровезаменяющих растворов, на его основе разработаны препараты, обладающие высокими сорбционными свойствами, связывающие различные токсические вещества и способствующие их быстрому выведению из организма [10, 12].

Комплекс  $C_{60}$ /γ-ЦД в исследованном диапазоне концентраций (0,02 – 2,5 мг/мл, что при содержании  $C_{60}$  около 21 масс. % дает молярную концентрацию последнего 5,8 – 729,2 мкМ) равно как и носитель γ-ЦД также не оказывали достоверного воздействия на клеточную жизнеспособность и дыхательный метаболизм, несмотря на то, что максимальная концентрация  $C_{60}$  в этом случае более чем в 200 раз превышала таковую в комплексе  $C_{60}$ /ПВП. Существенным отличием водорастворимых комплексов фуллерена  $C_{60}$  с органическими соединениями (ПВП, γ-циклодекстрин и т.п.) от других форм, используемых для биологических исследований, является низкая степень ассоциированности молекул фуллерена. В комплексе с γ-ЦД каждая молекула фуллерена заключена между двумя молекулами носителя и

Таблица 1. Различные метаболические показатели в культуре клеток МА-104 в присутствии  $C_{60}$ /ПВП (5 мг/мл) и ПВП (5 мг/мл)

Состав образцов	Хехст, <sup>1)</sup> относит. флуоресценция	Поглощение НК, <sup>2)</sup> опт. пл. 550 нм	NAD(P)H:хинон оксидоредукт. <sup>2)</sup> Допт. пл. 600 нм/10 мин	МТТ, <sup>2)</sup> опт. пл. при 550 нм
Контроль	1,37 ± 0,30	0,964 ± 0,080	0,262 ± 0,015	0,291 ± 0,026
ПВП	1,16 ± 0,18	0,960 ± 0,049	0,254 ± 0,012	0,376 ± 0,023*
$C_{60}$ /ПВП	1,23 ± 0,20	0,942 ± 0,050	0,260 ± 0,006	0,286 ± 0,019

<sup>1)</sup> — инкубация с препаратами 24 ч; <sup>2)</sup> — инкубация с препаратами 48 ч; \* — достоверное отличие от контроля ( $p < 0,01$ ).

Таблица 2. Действие комплекса  $C_{60}$ /ПВП (5 мг/мл) и ПВП (5 мг/мл) на вызванную УФ-облучением (400 W на расстоянии 30 см, 220 – 400 нм) фототоксичность в отношении культуры клеток МА-104. Оценка результатов в тесте восстановления резазурина

Длительность облучения, мин	Облучение через 60 мин после добавления реагентов, дополнительная инкубация 24 ч без смены среды, % от темнового контроля			Инкубация с реагентами 24 ч, облучение после смены среды, дополнительная инкубация 24 ч, % от темнового контроля		
	Контроль световой	ПВП	$C_{60}$ /ПВП	Контроль световой	ПВП	$C_{60}$ /ПВП
5	57,3 ± 5,0	76,2 ± 3,1*	106,3 ± 9,8* <sup>#</sup>	90,8 ± 4,8	112,1 ± 3,1*	112,7 ± 6,7*
10	53,5 ± 5,5	71,1 ± 8,9*	99,6 ± 8,2* <sup>#</sup>	84,2 ± 3,0	86,5 ± 4,9	100,4 ± 11,6* <sup>#</sup>
20	48,0 ± 6,0	61,0 ± 3,3*	84,4 ± 6,1* <sup>#</sup>	79,5 ± 4,6	79,5 ± 6,7	76,0 ± 10,8

\* — достоверное отличие от светового контроля ( $p < 0,01$ ); <sup>#</sup> — достоверное отличие  $C_{60}$ /ПВП от ПВП ( $p < 0,01$ ).

Таблица 3. Действие комплекса  $C_{60}/\gamma$ -ЦД на вызванную УФ-облучением (400 W на расстоянии 30 см, 220 – 400 нм) фототоксичность в отношении культуры клеток МА-104. Облучение через 60 мин после добавления комплекса, дополнительная инкубация 24 час без смены среды, % от темнового контроля. Оценка результатов в тесте восстановления резазурина

Длительность облучения, мин	Контроль световой	Процент живых клеток от темнового контроля							
		$\gamma$ -ЦД, концентрация, мкг/мл				комплекс $C_{60}/\gamma$ -ЦД, концентрация, мкг/мл			
		0,5	5	50	500	0,5	5	50	500
5	60,0 ± 3,5	68,7 ± 7,1	55,1 ± 4,1	45,3 ± 4,6*	67,8 ± 7,4	59,1 ± 2,8	52,4 ± 3,9*	43,1 ± 5,6*	58,9 ± 6,5
10	44,0 ± 3,6	40,5 ± 7,6	35,5 ± 3,4*	36,8 ± 2,9*	39,8 ± 4,8	35,7 ± 2,3*	31,9 ± 4,6*	30,7 ± 3,0* <sup>#</sup>	31,6 ± 6,7*

\* – достоверное отличие от светового контроля ( $p < 0,05$ ); <sup>#</sup> – достоверное отличие  $C_{60}/\gamma$ -ЦД от  $\gamma$ -ЦД ( $p < 0,05$ ).

мы имеем дело фактически с изолированными молекулами  $C_{60}$  [2].

УФА-облучение клеток в присутствии комплекса  $C_{60}/\text{ПВП}$  проводили по двух схемам: 1) через 1 ч после добавления в среду комплекса клетки облучали и оставляли в той же среде на 24 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, после чего определяли клеточную жизнеспособность; 2) инкубация культуры с комплексом 24 ч, полная замена культуральной среды, облучение и последующая инкубация 24 ч, после чего оценивалось состояние клеток в резазуриновом тесте. Очевидно, что во 2 варианте мы имели дело только с “внутриклеточным” фуллереном, проникшим в клетки и/или растворенном в липидной фазе мембран, а в 1 еще и с фуллереном, содержащимся в среде культивирования. При обеих схемах эксперимента наблюдался защитный эффект  $C_{60}/\text{ПВП}$  в отношении вызванной УФА фототоксичности (табл. 2). В 1 случае эффект был более выраженным, однако и при 2 схеме при длительности облучения 10 мин комплекс достоверно снижал фототоксический эффект УФА. При 1 схеме эксперимента эффект комплекса всегда был достоверно более выражен по сравнению с чистым ПВП, а при 2 — только при 10-минутном облучении. Таким образом, комплекс  $C_{60}/\text{ПВП}$  защищает клетки от повреждения УФА-облучением, что согласуется с ранее опубликованными данными [13], когда исследовали так называемую “губку для радикалов” (“Radical Sponge<sup>®</sup>”) — очищенный комплекс  $C_{60}$  с ПВП мол. массой 60 – 80 кДа

в молярном отношении 0,42 – 0,67:1 и показали его защитный эффект в культуре кератиноцитов человека в отношении фототоксичности, вызванной облучением УФА. Одновременно комплекс не вызывал какой-либо фототоксичности при облучении видимым светом. Оптимальная защитная концентрация комплекса составляла 10 – 40 мкМ. Авторы предположили, что защитный эффект  $C_{60}$  от УФ-повреждений связан с его способностью проходить через клеточные мембраны и локализоваться преимущественно в митохондриях, которые являются одним из основных источников активных форм кислорода при клеточном стрессе различной природы, в том числе вызванном УФА-облучением. Некоторые экспериментальные данные подтверждают такое внутриклеточное распределение  $C_{60}$  [9].

Нельзя не отметить (табл. 2), что сам по себе полимер-носитель ПВП также имел достоверное защитное действие и, учитывая его высокую концентрацию, значительно превосходящую долю в комплексе  $C_{60}$ , биологические эффекты комплекса  $C_{60}/\text{ПВП}$  могут хотя бы частично определяться свойствами полимера-носителя, использованного для солюбилизации фуллерена, нерастворимого в водной среде.

Эти результаты диаметрально отличаются от влияния на вызванную УФА фототоксичность комплекса  $C_{60}/\gamma$ -ЦД (табл. 3), который во всем диапазоне концентраций (0,5 – 500 мкг/мл) усиливал индуцированную УФА токсичность. Наибольшая активность наблюдалась при концентрациях 5 – 50 мкг/мл, однако только при концентрации комплекса 50 мкг/мл его действие достоверно отличалось от носителя —  $\gamma$ -ЦД. Таким образом, здесь действие комплекса в еще большей степени определялось химическим строением носителя несмотря на то что доля  $C_{60}$  в комплексе с  $\gamma$ -ЦД составляла около 21 масс. % и, следовательно, его конечная концентрация в среде была значительно выше, чем в случае комплекса  $C_{60}/\text{ПВП}$  — только при минимальной из использованных концентраций — 0,5 мкг/мл (концентрация  $C_{60}$  – 5,8 мкМ) она близка с таковой в  $C_{60}/\text{ПВП}$  (3,5 мкМ).

Полученные результаты находятся в соответствии с данными литературы [6], однако в цитируемой работе фототоксичность комплекса  $C_{60}/\gamma$ -ЦД была гораздо более выражена — уже при концентрации 1 мкМ и облучении УФА 10 мин авторы наблюдали почти полную гибель эпителиальных клеток хрусталика человека в культуре, в то время как в области видимого света препарат не обладал фототоксичностью. Таким образом, в зависимости от природы носителя, используемого для солюбилизации фуллерена  $C_{60}$ , последний может являться фотосенсилизатором или фотопротектором. Показано, что ПВП, который по физико-химическим свойствам подобен сывороточному альбумину, снижает за счет этого токсичность различных соединений и, возможно, токсичность АФК, генерируемых фуллеренами при облуче-

Таблица 4. Фотодинамический эффект кристаллического фуллерена  $C_{60}$  (10 мкг/см<sup>2</sup>) на культуру клеток МА-104 под воздействием азида Na и некоторых антиоксидантов

Контроль	Контроль + препарат	$C_{60}$	$C_{60}$ + препарат
	Азид Na <sup>1</sup>		
100,0 ± 3,7	80,0 ± 2,8*	36,7 ± 0,35*	62,1 ± 1,3* <sup>+</sup>
	СОД <sup>2</sup>		
100,0 ± 2,7	108,8 ± 3,4*	89,4 ± 3,1*	87,4 ± 3,0*
	СОД + глутатион-SH <sup>3</sup>		
100,0 ± 3,2	—	45,5 ± 1,8*	45,2 ± 2,5*
	Гипоксен <sup>4</sup>		
100,0 ± 3,3	100,0 ± 1,7	51,7 ± 2,0*	96,8 ± 2,1 <sup>+</sup>

Клетки выращивали 1 сутки, далее ростовая среда заменялась на бессывороточную и добавлялись соответствующие реактивы, после чего планшеты облучали галогеновой лампой (около 45 мW/см<sup>2</sup>) и дополнительно инкубировали в темноте 24 час. Тест-метод определения клеточной жизнеспособности – восстановление резазурина. Результаты представлены в % от контроля (интактные клетки).

\* – достоверное отличие от контроля ( $p < 0,01$ ); + – достоверное отличие от  $C_{60}$  без препаратов ( $p < 0,01$ ).

<sup>1</sup> – азид Na в конц. 25 мМ, облучение 15 мин.;

<sup>2</sup> – рекомбинантная СОД из дрожжей (рексоД) 10 мкг/мл (около 0,34 мкМ), облучение 10 мин;

<sup>3</sup> – эритроцитарная человеческая СОД (эрисод) 10 мкг/мл плюс восстановленный глутатион 100 мкг/мл (325 мкМ), облучение 30 мин;

<sup>4</sup> – гипоксен (олифен) 40 мкг/мл, облучение 10 мин.

нии.  $\gamma$ -ЦД — циклический олигосахарид, состоящий из 8 молекул глюкозы, связанных  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  связями, легко образует комплексы включения с рядом гидрофобных молекул, поскольку его внутренняя тороидальная полость менее полярна, чем наружная поверхность молекулы. Формирование этих комплексов легко обратимо. Сам по себе  $\gamma$ -ЦД нетоксичен [15]. Однако биологические эффекты  $C_{60}$  в составе комплексов с  $\gamma$ -ЦД и с ПВП при облучении УФ разнонаправлены как по нашим данным так и по данным других авторов [6, 13].

Что касается действия фуллерена  $C_{60}$  в кристаллическом состоянии, мы изучали его при нанесении на поверхность культуральных лунок при выпаривании из гексана. При полном отсутствии влияния на ростовые свойства и жизнеспособность клеток в темноте, такая “покрытая фуллереном поверхность” обладала ярко выраженной фототоксичностью, причем не только при действии УФА, но и видимого света высокой интенсивности (облучение 10–30 мин, 38–45 мВт/см<sup>2</sup>, 370–750 нм) [1, 16]. Эффект облучения блокировался некоторыми антиоксидантами (гипоксен) и скэвенджером синглетного кислорода азидом натрия, что явно свидетельствует в пользу того, что повреждающим клетки агентом является <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, а не другие АФК (табл. 4). Таким образом, “чистый” фуллерен проявляет фототоксичность, аналогичную комплексу включения  $C_{60}/\gamma$ -ЦД, однако его фотодинамический эффект более выражен и проявляется также и при облучении видимым светом.

## ВЫВОДЫ

1. Биологические свойства, в частности, фототоксичность фуллерена  $C_{60}$  *in vitro* зависят от его агрегатного состояния и способа солубилизации, а также, вероятно, природы солубилизирующего соединения.

2. Фототоксичность фуллерена определяется образованием под его воздействием АФК [ультрафиолет диапазона А (310–400 нм)], а именно синглетного кислорода.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Ю. Еропкин, Л. Б. Пиотровский, Д. Н. Николаев, Е. М. Еропкина, О. И. Киселев, *Вестн. Рос. Военно-мед. академии*, **23**(3), 483–484 (2008).
2. Л. Б. Пиотровский, О. И. Киселев, *Фуллерены в биологии*, Ростов, С.-Петербург (2006).
3. Л. Б. Пиотровский, К. Н. Козелецкая, Н. А. Медведева и др., *Вопр. вирусол.*, № 3, 38–42 (2001).
4. M. J. Andrews, M. J. Garle, R. H. Clothier, *ATLA*, **25**, 641–653 (1997).
5. D. J. Arndt-Jovin and T. M. Jovin, *J. Histochem. Cytochem.*, **25**(7), 585–589 (1977).
6. Baozhong Zhao, Yu-Ying He, C. F. Chignell, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **22**(4), 660–667 (2009).
7. E. Borenfreund, H. Babich, N. Martin-Alguacil, *Toxicol. In Vitro*, **2**(1), 1–6 (1988).
8. Y. Doi, A. Ikeda, M. Akiyama, et al., *Chemistry*, **14**(29), 8892–97 (2008).
9. S. Foley, C. Crowley, M. Smaih, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, p. 116 (2002).
10. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/temp/~VG99vO:6>
11. S. A. Latt and G. Stetten, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**(1), 24–33 (1976).
12. R. Lefaux, *Practical Toxicology of Plastics*, CRC Press, Cleveland (1968).
13. Li Xiao, H. Takada, Xue hui Gan, N. Miwa, *Bioogr. Med. Chem. Letts*, **16**, 1590–1595 (2006).
14. A. N. Malviya, P. Mandel, M. Mersel, *Biochim. Biophys. Acta*, **849**(2), 288–292 (1986).
15. I. C. Murno, P. M. Mewberne, V. R. Young, A. Bär, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **39**(Suppl. 1), 3–13 (2004).
16. L. Piotrovsky, M. Eropkin, E. Eropkina, M. Dumpis, O. Kiselev, in: “*Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*”, Eds. F. Cataldo and T. da Ros, Springer, 139–155 (2008).
17. K. I. Priyadarsini, H. Monan, A. K. Tyagi, J. P. Mittai, *J. Phys. Chem.*, **98**, 4756–4759 (1994).

Поступила 22.04.10

## EFFECT OF THE NATURE OF POLYMER MATRIX AND STATE OF FULLERENE C60 ON ITS PHOTOTOXICITY STUDIED *IN VITRO*

M. Yu. Eropkin, L. B. Piotrovskii, E. M. Eropkina, M. A. Dumpis, E. V. Litasova, and O. I. Kiselev

Institute of Influenza, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Prof. Popova 15/17, St. Petersburg, 197376, Russia

Biological effects of water-soluble inclusion complexes of fullerene  $C_{60}$  with poly(vinyl pyrrolidone) ( $C_{60}/PVP$ ) and gamma-cyclodextrin ( $C_{60}/\gamma$ -CD) as well as solid  $C_{60}$  ( $C_{60}$ -coated surface) on cell viability have been studied *in vitro*. It is established that both inclusion complexes (in a broad range of concentrations) and solid fullerene coatings are nontoxic in the dark for the cell of all lines tested. In contrast, under intense UV illumination, the  $C_{60}/PVP$  complex reliably protected test cells from the UV radiation damage, whereas the  $C_{60}/\gamma$ -CD and fullerene-coated surface exhibited pronounced phototoxicity. Moreover, solid fullerene caused a photodynamic effect under irradiation with both UV and visible light. The radiation damage could be blocked by some antioxidants (e.g., hypoxen) and singlet-oxygen scavenger (sodium azide). This is evidence for the participation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> in phototoxicity manifestations. The results indicate that the biological properties of fullerene  $C_{60}$  *in vitro* depend on its aggregate state, form of solubilization, and, probably, the nature of solubilizing medium.

**Key words:** Fullerene  $C_{60}$ ,  $\gamma$ -cyclodextrin, poly(vinyl pyrrolidone), cell culture, illumination, phototoxicity