

Fulereny – przyszłość zastosowań w medycynie i farmacji

dr n. farm. JOANNA GRABOWSKA
 Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
 Samodzielna Pracownia Analizy Leków
 Kierownik: dr n. farm. Wojciech Miltyk



Streszczenie:

Fulereny (alotropowa odmiana węgla), odkryte w 1985 roku, wykazują wiele interesujących właściwości. Istnieje przypuszczenie, że cząsteczki C_{60} mogą stać się potencjalnymi inhibitorami enzymu odpowiadającego za aktywność wirusa HIV [1]. Wbudowanie pochodnych fulerenu w cząsteczkę DNA czy błony lipidowe owocuje ciekawymi właściwościami fotochemicznymi tych układów [2,3]. Wzbudzone w nich fotonowo fulereny, dzięki zdolności przekształcania tlenu cząsteczkowego we wzbudzony stan singletowy [4], mogą być wykorzystane w terapii raka skóry. Niektóre pochodne fulerenu posiadają zdolność wychwytywania wolnych rodników, dając możliwość wykorzystania ich jako antyutleniaczy. W niniejszym artykule zostały krótko przedstawione biologiczne i biochemiczne aspekty zastosowań fulerenu.

Słowa kluczowe:

fulereny, antyoksydanty, nośniki leków, HIVP

Summary:

Fullerenes (family of carbon allotropes) discovered in 1985 have many interesting properties. Synthesized hydrophilic fullerene derivatives enabled researches on medical applications of those molecules. C_{60} molecules can be used as inhibitors of HIV protease [1]. Fullerene derivatives applied into DNA or lipid membranes exhibit interesting photochemical properties [2,3]. Exposed to light, fullerenes can produce singlet oxygen [4] and can be used in cancer therapy. Some fullerene derivatives are able to neutralize free radicals enabling usage of fullerenes as antioxidants. In this article biological and biochemical aspects of using fullerenes in medicine and pharmacy have been introduced.

Key words:

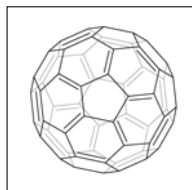
fullerenes, antioxidants, drug carriers, HIVP

Fulereny są – obok grafitu i diamentu – trzecią alotropową odmianą węgla. Nazwa ta obejmuje całą rodzinę cząsteczek o ogólnym wzorze C_{2n} ($n > 16$), w których atomy węgla położone są tylko na powierzchni bry-

ły. Wśród licznej rodziny fulerenu najbardziej rozpowszechnione, a zarazem najlepiej poznane, są fulereny zawierające 60 lub 70 atomów węgla. Cząstki te wykazują wiele ciekawych właściwości a ich właściwości, elektrochemiczne są szczególnie interesujące i intensywnie badane. Fulereny C_{60} i C_{70} ulegają 6-stopniowej jednoelektronowej odwracalnej redukcji w wyniku której tworzą się aniony C_{60}^{6-} lub C_{70}^{6-} [5].

Wieloatomowe węglowe bryły fulerenu są w środku zupełnie puste i mają wystarczająco dużą średnicę wewnętrzną, by zmieściły się w nich nawet największe atomy pierwiastków chemicznych. Takie związki określa się jako endohedralne. Do tej pory we wnętrzu węglowej sfery udało się badaczom umieścić wiele atomów metali [6,7], w tym także pierwiastków promieniotwórczych oraz atomów gazów szlachetnych.

Największym zainteresowaniem naukowców cieszy się cząsteczka fulerenu C_{60} , gdyż ze względu na swą budowę przestrzenną jest uważana za strukturę „idealną”. Cząsteczka fulerenu C_{60} ma kształt sferoidu, a dokładniej ściętego dwudziestościanu foremnego (z ang. *truncated icosahedron*), który posiada 60 wierzchołków, każdy stanowiący jeden atom węgla (Rys. 1).



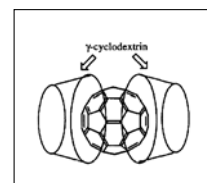
Rys. 1. Budowa przestrzenna cząsteczki fulerenu C_{60} .

Dwudziestościan foremny jest zbudowany z 20 ścian sześciokątnych i 12 ścian pięciokątnych. Każdy z 20 sześciokątów graniczy z trzema pięciokątami i trzema sześciokątami. Każdy z atomów węgla fulerenu C_{60} posiada identyczne otoczenie, zatem wszystkie atomy są równocenne i cząsteczka nie

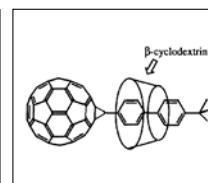
zawiera słabych punktów oddziaływań chemicznych. Mimo, że zwinieciu warstwy grafitowej w klatkę węglową towarzyszą naprężenia, to dzięki symetrii są one rozłożone równomiernie w całej cząsteczce [8].

Głównymi problemami dotyczącymi wykorzystania fulerenu w chemii medycznej była nierozpuszczalność w rozpuszczalnikach polarnych oraz tworzenie agregatów w rozpuszczalnikach wodnych. Jednak problemy te zostały rozwiązane poprzez szereg chemicznych modyfikacji cząsteczek fulerenu.

Fulereny mogą zostać zamknięte w cyklodekstrynach, które maskują sferę węglową zwiększając tym samym rozpuszczalność takich pochodnych w rozpuszczalnikach polarnych. W związku z rozmiarem C_{60} najbardziej powszechna z cyklodekstryn – β -cyklodekstryna – nie mogła być użyta bezpośrednio. Stąd do maskowania węglowej kuli używane są dekstryny większych rozmiarów, które tworzą z C_{60} kompleksy w stosunku 2:1 (Rys. 2) [9]. Aby stworzyć możliwość zastosowania β -cyklodekstryny do utworzenia kompleksu z cząsteczką C_{60} , fuleren przeprowadzono w bifenylową pochodną (Rys. 3) [10].



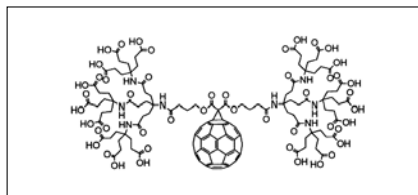
Rys. 2.



Rys. 3.

Pochodne fulerenu otrzymano także poprzez dołączenie do C_{60} różnych hydrofilowych grup. Im więcej takich grup cząsteczka fulerenu posiada, tym jej hydrofilowość jest większa. Przykładem takich pochodnych są dendrymeryczne pochodne fulerenu. Dendrymeryczna pochodna C_{60} posiadająca specyficznie grupy karboksy-

lowe (Rys. 4) wykazuje wysoki stopień rozpuszczalności w wodzie (34 mg/ml w pH=7,4) [11].

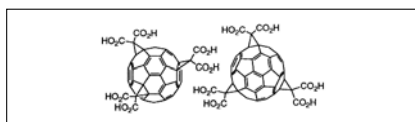


Rys. 4.

Wszystkie modyfikacje fulerenów przez dołączanie różnych grup funkcyjnych czy całych cząsteczek związków chemicznych mają na celu zwiększenie hydrofilowości pochodnych, ale także otrzymanie nowych związków wykazujących biologiczną i farmakologiczną aktywność. Właściwości nowych pochodnych są nieco odmienne, jednak nadal wykazują charakterystyczne fizyczne i chemiczne właściwości fulerenów.

Fulereny mogą pełnić rolę antyoksydantów i czynników chroniących komórki nerwowe. W przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, jak choroba Parkinsona, Alzheimer'a czy Lou Gehriga, obserwuje się nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). ROS są naturalnymi produktami metabolizmu i odgrywają ważną rolę w regulacji funkcji komórek, lecz niekiedy ich stężenie może gwałtownie wzrosnąć prowadząc do zjawiska zwanego stresem oksydacyjnym. Zbyt duża ilość ROS poprzez swoje działanie utleniające wywołuje kaskadę zdarzeń prowadzących do uszkodzenia lub też śmierci komórki neuronowej. W takich przypadkach korzystne jest wprowadzenie czynnika wychwytyjącego rodniki, który choć nie eliminuje ale znacznie obniża śmiertelność neuronów. Czynnikiem takim mogą być hydroksylowe pochodne fulerenów – fulerenole $[C_{60}(OH)_n]$, które są świetnymi antyoksydantami i są zdolne do neutralizowania rodników tlenowych atakujących lipidy, proteiny, DNA oraz inne makromolekuły. Fulerenole obniżają również toksyczność wolnych rodników w tkance nerwowej [12]. Natomiast inne pochodne fulerenowe – karboksyfulereny (Rys. 5) wykazują skuteczne przeciwdziałanie degradacji komórek neuronowych związanej ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS) [13].

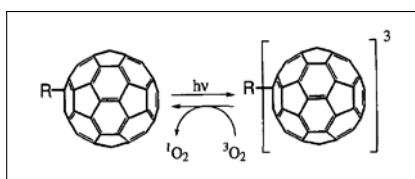
Fulereny mogą także zapobiegać apoptozie komórek. Apoptoza jest bio-



Rys. 5.

chemicznym procesem autodestrukcji komórki, w którym ważną rolę odgrywa TGF- β . Podczas tego procesu następuje indukcja ROS i jedyną drogą do zatrzymania a przynajmniej zmniejszenia skali destrukcji komórek jest zastosowanie antyoksydantów [1=]. Właściwości takie wykazują karboksylowe pochodne fulereny (Rys. 5). Mogą zapobiegać apoptozie w niektórych komórkach przez neutralizację reaktywnych form tlenu indukowanych TGF- β [14].

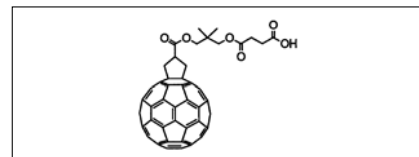
Przeprowadzono liczne badania nad procesem rozcinania łańcucha nukleotydowego w obecności pochodnych fulerenowych. Zjawisko to występuje jedynie w przypadku obecności światła i zostało zbadane w komórkach bakteryjnych (*Salmonella*) oraz plazmidach (pBr322). W obu przypadkach obserwowano fragmentację łańcuchów DNA i RNA [15]. Przypuszcza się, że jednym z etapów mechanizmu rozcinania łańcucha oligonukleotydowego jest fotonowe wzbudzenie fulereny, po którym następuje przekształcenie molekularnego tlenu we wzbudzony stan singletowy 1O_2 . Następnie fuleren wraca do stanu podstawowego i jednocześnie zachodzi interakcja reaktywnego 1O_2 z oligonukleotydem [16]. Proponowany mechanizm przedstawia Rys. 6. Proces ten może być również wykorzystany w fotochemioterapii [16], a w szczególności w leczeniu raka skóry.



Rys. 6. Schemat zastosowania fulereny z wykorzystaniem jego zdolności do tworzenia tlenu singletowego. R = pojedyncza nić DNA (w przypadku rozcinania DNA). Najpierw w wyniku fotowzbudzenia tworzy się $^3C_{60}$ (100% wydajności). Następnie przy udziale wzbudzonego fulereny i tlenu cząsteczkowego generowany jest tlen singletowy 1O_2 , podczas gdy wzbudzony fuleren wraca do stanu podstawowego. W efekcie może nastąpić rozcięcie nici DNA, jako rezultat działania 1O_2 [16].

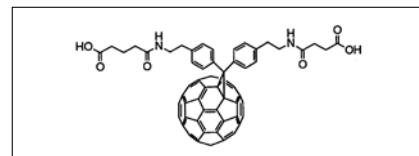
Niektóre pochodne fulereny (Rys. 7) mogą być inhibitorami enzymów takich jak proteazy cysteinowe (papaina, katepsyna) i proteazy serynowe (trypsyna, plazmina, trombina) [15]. Znalezione także fulerenowe inhibitory transferazy S-glutationu [17], P450-cytochromoza-

leżnej monoooksygenazy oraz mitochondrialnej ATP-azy [18]. Charakterystyczne właściwości fulerenów: hydrofobowość i elektrofilowość wraz z wysokim potencjałem redukcji są kluczowymi elementami ich aktywności wobec enzymów, lecz mechanizm działania na wyżej wymienione enzymy jest nadal nieznan.



Rys. 7.

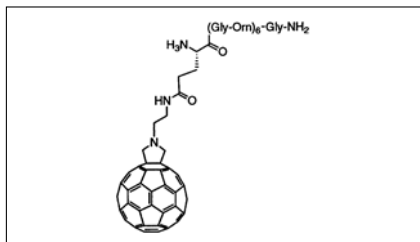
Fulereny stwarzają nadzieję na znalezienie skutecznego leku przeciwko AIDS. Udało się syntetyzować pochodną C_{60} , która jest inhibitorem HIV proteazy (HIVP) (Rys. 8) Cząsteczka pasuje do centrum aktywnego wirusowej proteazy i silnie oddziałuje z nią siłami Van der Waalsa [19]. Nadal trwają modyfikacje pochodnych fulerenowych mające na celu silniejsze oddziaływanie z HIVP i jak najskuteczniejsze blokowanie enzymu.



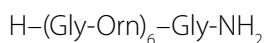
Rys. 8.

Lipofilowość węglowej sfery umożliwia wbudowywanie się C_{60} w błony biologiczne powodując ich destabilizację. Może to odgrywać znaczącą rolę w antybakteryjnym wykorzystaniu fulerenów [20]. Zadowolające rezultaty osiągnięto działając na bakterie takie jak: *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Mycobacterium avium* [21,22]. Dużą efektywność działania wykazywały sole fulerenowe. Na uwagę zasługują również fulereno-peptydy [23]. Peptydowa pochodna fulereny (Rys. 9) łącząc w sobie lipofilowe właściwości fulereny z hydrofilowością i zdolnością elektrostatycznego oddziaływania pochodzących od części peptydowej wykazuje właściwości antybakteryjne. Testom poddano bakterie *E.coli* oraz *E. aureus* które wykazały wrażliwość na działanie tej pochodnej. Analogiczny peptyd nie posiadający części fulerenowej (Rys. 10) nie wykazywał żadnej aktywności wobec tych bakterii [24]. Ponadto fulereno-peptydy mogą wykazywać zróżnicowane działanie w zależności od rodzaju bakterii – silniej działać

na bakterie Gram-dodatnie, a słabiej na bakterie Gram-ujemne [25].

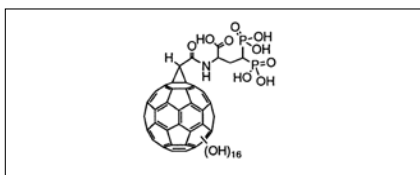


Rys. 9.



Rys. 10.

Planowane jest wykorzystanie fulerenów w leczeniu osteoporozy. Aktualnie stosowane są difosforanowe związki oraz anion F^- . Jednakże leki difosforanowe nie są efektywnie wchłaniane z przewodu pokarmowego, natomiast F^- , podawany w postaci NaF , jest silnie toksyczny [26-28]. Difosforanowa pochodna fulerenu $\text{C}_{60}(\text{OH})_{16}\text{AMBP}$ (Rys. 11) wykazuje zdolność do redukcji mineralizacji hydroksyapatytu o 50 proc. przy stężeniu 1mM [29]. Podobne badania dotyczące związku $\text{C}_{60}(\text{OH})_{30}$ wskazały na duże powinowactwo do hydroksyapatytu. Rezultaty te dają nadzieję na wykorzystanie fulerenów w terapii celowanej.



Rys. 11.

Fulereny mogą mieć również zastosowanie jako środki kontrastowe. Stosowane powszechnie środki kontrastowe – iohexal i lopamidol – są bezpieczne i efektywne, mimo to 2-8 proc. populacji osób badanych reaguje na nie alergicznie. Poszukuje się też środków, których czas działania byłby dłuższy, co wydłużyłoby czas obserwacji pacjenta. Specyficzność budowy klatki fulerenowej, która jest pusta w środku daje możliwość wykorzystania fulerenów i w tej dziedzinie medycyny. W środku węglowej sfery udało się umieścić wiele izotopów otrzymując endohedralne metalofulereny [30]. Takie cząsteczki charakteryzują się wysoką stabilnością i brakiem biotransformacji, co zapobiega uwalnianiu toksycznych izotopów podczas terapii. Podjęto próby wykorzystania endohedralnego metalofulerenu $^{166}\text{Ho}@C_{60}(\text{OH})_x$ jako środka kontrastowego. Czas obec-

ności związku w krwi wynosił ponad godzinę, a następnie został prawie całkowicie usunięty z ustroju i nie wykazywał toksyczności *in vivo* [31, 32]. Prowadzone są także badania nad wykorzystaniem endohedralnych metalofulerenów w obrazowaniu przy użyciu rezonansu magnetycznego.

Fulereny, ze względu na swoją strukturę i właściwości, mogą być również używane jako nośniki genów, białek lub substancji leczniczych [33]. Wykazano, że tetraaminofulerenowa pochodna może transportować plazmidowy DNA [34]. Inna pochodna fulerenu, $\text{C}_{60}(\text{CO}_2\text{H})_2$ posiada zdolność przenikania przez błony komórkowe i łączenia się specyficznie z organellami komórkowymi [35]. W przyszłości fulereny mogą być wykorzystane jako nośniki leków, a w szczególności silnie polarnych cząsteczek przyłączonych do sfery fulerenowej, takich jak C_{60} -oligo DNA. Fulerenowe nośniki leków mogą przenikać przez błony komórkowe transportując lek do wybranych tkanek [36].

Niezwykle ciekawe właściwości chemiczne i specyficzna budowa fulerenów dają wiele perspektywicznych możliwości wykorzystania tych węglowych piłeczek.

JOANNA GRABOWSKA
asia@umw.edu.pl

Bibliografia:

- [1] S.H. Friedman, P.S. Ganapathi, Y.K. Rubin, G.L. Kenyon, *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 2424.
- [2] H. Tokuyama, S. Yamago, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 7918.
- [3] K.C. Hwang, D. Mauzerall, *Nature*, 1993, 361, 138.
- [4] J.W. Arbogast, A.P. Darmanyan, C.S. Foote, Y. Rubin, F.N. Diederich, M.M. Alvarez, S.J. Anz, R.L. Wheetten, *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 11.
- [5] Q. Xie, E. Perez – Cordero, L. Echegoyen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 3978.
- [6] F.D. Weiss, S.C. O'Brien, J.L. Elkind, R.F. Curl, R.E. Smalley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 4464.
- [7] J. Chai, T. Guo, C. Jin, R.E. Haufner, L.P.F. Chibante, L. Wang, J.M. Aldorf, R.E. Smalley, *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 7564.
- [8] W. Przygocki, A. Włochowicz, *Fulereny i nanorurki*, Warszawa 2001.
- [9] T. Andersson, K. Nilsson, M. Sundahl, G. Westman, O. Wennerstrom, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, 604.
- [10] S.R. Wilson, Q. Lu, Y. Yang, L. Echegoyen, *Tetrahedron Lett.* submitted
- [11] M. Brettreich, A. Hirsch, *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 2731-2734.
- [12] L. Dungan, J. Gabrielsen, S. Yu, T. Lin, D. Choi, *Neurobiol. Dis.*, 1996, 3, 129-135.
- [13] L.L. Dugan, D.M. Turetsky, C. Du, D. Lobner, M. Wheeler, C.R. Almi, C.K.-F. Shen, T.-Y. Luh, D.W. Choi, T.-S. Lin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 9434-9439.
- [14] Y.L. Huang, C.K. Shen, T.Y. Luh, H.C. Yang, K.C. Hwang, C.K. Chou, *Eur. J. Biochem.*, 1998, 245, 38-43.
- [15] H. Tokuyama, S. Yamago, E. Nakamura, T. Shiraki, Y. Sugiera, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 7918-7919.
- [16] A.W. Jansen, S.R. Wilson, D.I. Schuster, *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, vol.4, 6, 767.
- [17] N. Iwata, T. Mukai, Y. Yamakoshi, S. Hara, T. Yanase, M. Shoji, T. Endo, N. Miyata, *Fullerene Sci. Technol.*, 1998, 6, 213-226.
- [18] T.H. Ueng, J.J. Kang, H.W. Wang, Y.W. Cheng, L.Y. Chiang, *Toxicol. Lett.*, 1997, 93, 29-37.
- [19] R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Dudl, J.A. Castoro, C. Wilkins, S.H. Friedman, D.L. DeCamp, G.L. Kenyon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 6510-6512.
- [20] S. Bosi, T. Da Ros, S. Castellano, E. Banfi, M. Prato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, 10, 1043-1045.
- [21] T. Da Ros, M. Prato, F. Novello, M. Maggini, E. Banfi, *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 9070-9072.
- [22] T. Mashino, K. Okuda, T. Hirota, M. Hirobe, T. Nagano, M. Mochizuchi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2959-2962.
- [23] A. Bianco, T. Da Ros, M. Prato, C. Toniolo, *J. Pept. Sci.*, 2001, 7, 208-219.
- [24] S. Bosi, T. Da Ros, G. Spalluto, M. Prato, *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, 38, 913-923.
- [25] D. Pantarotto, A. Bianco, F. Pellarini, A. Tossi, A. Giangaspero, I. Zelezetsky, J.-P. Brand, M. Prato, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 12543-12549.
- [26] M. Orme, V. Labrom, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1375-1380.
- [27] J.L. Meyer, G.H. Nancollas, *Calif. Tissue Res.*, 1973, 13, 295.
- [28] T. Willson, P. Charisfon, A. Baxter, N. Geddie, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 1043-1046.
- [29] K. Gonzalez, L. Wilson, W. Wu, G. Nancollas, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 1991.
- [30] H. Shinohara, *Rep. Prog. Phys.*, 2000, 63, 843-892.
- [31] D.W. Cagle, S.J. Kennel, S. Mirzadeh, J.M. Alford, L.J. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 5182-5187.
- [32] D.W. Cagle, T.P. Thrash, M. Alford, L.P.F. Chibante, G.J. Ehrhardt, L.J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 8043-8047.
- [33] X. Zhi Ping, Z. Qing Hua, L. Gao Qing, Y. Ai Bing, *Chem. Eng. Sc.*, 2006, 61, 1027-1040.
- [34] E. Nakamura, H. Isobe, N. Tomita, M. Sawamura, S. Jinno, H. Okayama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 4254-4257.
- [35] S. Foley, C. Crowley, M. Samaithi, C. Bonfils, B. Erllanger, P. Seta, P. Larroque, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2002, 294, 116-119.
- [36] S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura, K. Kikuchi, S. Kananishi, K. Sueki, H. Nakahara, S. Enomoto, F. Ambe, *Chem. & Biol.*, 1995, 2, 385-389.

Pytania testowe

1. Wybierz zdanie nieprawdziwe

- Fulereny to odmiana alotropowa węgla odkryta w 1985 roku
- Fulereny zawsze zawierają w swej strukturze 60 lub więcej atomów węgla
- Cząsteczka fulereny to węglowa sfera pusta w środku
- Najbardziej sferyczny jest fuleren C_{60}

2. Dobrą rozpuszczalność fulereny w wodzie zapewnia modyfikacja struktury poprzez przyłączenie:

- łańcucha węglowego
- lipidu
- grup karboksylowych
- drugiej cząsteczki fulereny

3. Właściwości utleniające posiadają pochodne fulerenowe:

- hydroksylowe
- karboksylowe
- aromatyczne
- posiadające długie rozgałęzione łańcuchy węglowe

4. Pochodne fulerenowe rodzące nadzieje na wykorzystanie ich jako środki kontrastowe:

- posiadają dołączoną część peptydową
- są pochodnymi dendrymerycznymi
- są tylko kompleksowo połączone z cykloodekstrynami
- mają umieszczone izotop wewnątrz węglowej sfery

(Odpowiedzi szukaj w numerze)