

Received: 2012.09.15
Accepted: 2013.06.03
Published: 2013.08.23

Fulerenol – właściwości i zastosowanie w naukach biomedycznych*

Fullerenol – properties and applications in biomedical sciences

Jacek Grębowski¹, Paulina Kaźmierska², Anita Krokosz¹

¹ Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

² Katedra Neurobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Fulerenole, będące rozpuszczalnymi w wodzie, hydroksylowanymi pochodnymi fulerenów stały się w ostatnich latach obiektem licznych badań nad możliwością zastosowania ich w naukach biomedycznych. Dzięki hydrofilowym właściwościom oraz zdolności eliminowania wolnych rodników, związki te mogą w przyszłości stanowić poważną alternatywę dla obecnie stosowanych metod farmakologicznych w chemioterapii, w terapii chorób neurodegeneracyjnych czy w radiobiologii. W zależności od zastosowanego układu badawczego fulerenole mogą również działać jak prooksydanty. Dualistyczny charakter działania fulerenoli może w przyszłości być wykorzystany jako czynnik o działaniu cytotoksycznym wobec komórek nowotworowych lub ochronnym wobec komórek prawidłowych. Ze względu na kapsułkową budowę fulerenoli, dostrzega się również możliwość ich zastosowania w diagnostyce medycznej do przenoszenia związków kontrastujących czy też do transportu leków.

Podczas projektowania układów doświadczalnych, mających na celu zbadanie efektów promieniowania w połączeniu z pochodnymi fulerenów rozpuszczalnych w wodzie, należy uwzględnić możliwość wystąpienia „efektu stężeniowego”, który w znaczny sposób przyczynia się do uzyskania jednego z dwóch efektów: ochronnego lub toksycznego. Podobnie dzieje się w przypadku zastosowania tych związków jako potencjalnych neuroprotektorów. Fulerenol może bowiem chronić neurony pewnych obszarów mózgu, ale w określonych dawkach może także indukować śmierć komórkową.

Olbrzymi postęp w dziedzinie nanotechnologii nie tylko skłania naukowców do poszukiwania nowych zastosowań nanozwiązków, takich jak fulerenole, ale stawia również pytanie o ich szkodliwość na środowisko naturalne. Rosnące wykorzystanie trudno degradowalnych materiałów fulerenowych zwiększa prawdopodobieństwo przypadkowego uwolnienia tychże związków do systemów naturalnych i ich bioakumulacji.

Mimo przekonujących przesłanek na temat potencjalnych możliwości zastosowania fulerenoli w biomedycynie, wciąż dysponujemy zbyt małą wiedzą na temat mechanizmu działania tych cząsteczek oraz ewentualnych działań niepożądanych.

Słowa kluczowe: fulerenol • stres oksydacyjny • nanomedycyna

Summary

Fullerenols, the water-soluble derivatives of fullerenes, are currently being recently intensively studied in the context of the possibility of their application in the biomedicine. Due to their hydrophilic properties and the ability to eliminate free radicals, fullerenols may in the future provide a solid alternative to currently used pharmacological methods in chemotherapy,

*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu ze środków NCN 2011/03/N/ST4/01281.

treatment of neurodegenerative diseases and radiobiology. Depending on the research protocol applied, fullerenols may also act as pro oxidants. The dualistic nature of fullerenols may contribute to finding new biomedical applications of these agents in the future, by exerting a cytotoxic or protective effect respectively against cancer cells or healthy cells. Because of the encapsulated structure of fullerenols, there exists the possibility of their application in medical diagnostics in the transfer of contrast agents or in the drug transport. During the planning of an experiment designed to investigate the effects of radiation in combination with derivatives of water-soluble fullerenes, the possibility of appearance of the "dose-response effect" should be taken into consideration since it significantly contributes to one of the two possible effects: protection or sensitization. The same applies to the possibility of using these compounds as potential neuroprotectors. Fullerolol may protect neurons in the particular areas of the brain but in the defined certain doses it may also induce cell death. A giant leap in the field of nanotechnology not only leads scientists to search for new applications of nanomaterials such as fullerenols, but also raises the question about their harmful effect on the environment. High utilization of hardly biodegradable fullerenols increases the likelihood of their accidental release into natural systems and their bioaccumulation. Despite convincing evidences about the potential applications of fullerenols in biomedicine, we still have insufficient knowledge about the mechanism of action of these molecules and their possible side effects.

Key words: fullerolol • oxidative stress • nanomedicine

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1063743>

Word count: 4965
Tables: –
Figures: 4
References: 121

Adres autora: mgr Jacek Grębowski, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 90-236 Łódź; e-mail: jacek.grebowski@gmail.com

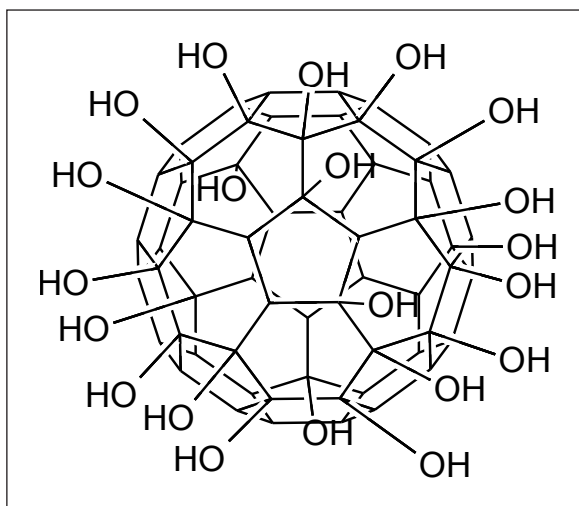
Wykaz skrótów: **ALAT (ALT)** – aminotransferaza alaninowa; **alfa-HBDH** – dehydrogenaza α -hydroksymaślanowa; **AMPA** – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazylopropionowy; **ASPAT (AST)** – aminotransferaza asparaginianowa; **ATP** – adenozylo-5'-trifosforan; **BUN** – stężenie azotu mocznikowego we krwi; **CAT** – katalaza; **CK** – kinaza keratynowa; **CREA** – kreatynina; **2CP** – 2-chlorofenol; **DA** – dopamina; **DNR** – daunorubicyna; **DOX** – doksorubicyna; **DPPH** – 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl; **EEG** – elektroencefalografia; **EKG** – elektrokardiografia; **EPR** – elektronowy rezonans paramagnetyczny (electron paramagnetic resonance; electron spin resonance); **FIFFF** – frakcjonowanie przepływowe w polu odśrodkowym; **FulOH** – fulerenol; **GABA_A** – klasa receptorów pobudzanych przez kwas γ -aminomasłowy; **GSH-Px** – peroksydaza glutationowa; **GST** – zredukowany glutation; **GT** – transferaza glutationowa; **HOMO** – najwyższy zajęty orbital molekularny (highest occupied molecular orbital); **KA** – kwas kainowy; **LDH** – dehydrogenaza mleczanowa; **LET** – liniowe przekazywanie energii (linear energy transfer); **LUMO** – najniższy niezajęty orbital molekularny (lowest unoccupied molecular orbital); **MAO_B** – monoaminooksydaza typu B; **MDA** – dialdehyd malonowy; **MPP⁺** – kation 1-metylo-4-fenylopirydyny; **MRI** – magnetyczny rezonans jądrowy (magnetic resonance imaging); **MTPT** – 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna; **NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy; **PBS** – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej; **PET** – pozytonowa emisyjna tomografia komputerowa (positron emission tomography); **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SA** – kwas salicylowy; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa; **SPECT** – tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (single-photon emission computed tomography); **TBARS** – stężenie końcowych produktów peroksydacji lipidów (thiobarbituric acid reactive substances) **TK** – tomografia komputerowa (computed tomography).

WSTĘP

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono badaniu potencjalnie bioaktywnych pochodnych fulereny rozpuszczalnych w wodzie, ze szczególnym uwzględnieniem ich właściwości pro- i antyoksydacyjnych [63,109,112,114]. Właściwości te wynikają z istnienia systemu zdelokalizowanych podwójnych wiązań π występujących w klatce fulereny. Słaba rozpuszczalność fulerenów w cieczach polarnych jest poważnym mankamentem w biomedycznym zastosowaniu „węglowych piłek”. Dlatego też rozpoczęto badania nad możliwością przyłączenia polarnych grup funkcyjnych do węglowej klatki fulereny w celu zwiększenia rozpuszczalności tych nanocząstek w rozpuszczalnikach polarnych, a przede wszystkim w wodzie. W celu otrzymania pochodnej fulereny o hydrofilowych właściwościach wykorzystano reakcję addycji grup hydroksylowych do C_{60} uzyskując w ten sposób polihydroksylowany fuleren $C_{60}(OH)_n$ (fulerenol; fulerol; $C_{60}(OH)_n$) [20,21,61,119]. Ogólny schemat budowy fulerenolu przedstawiono na ryc. 1.

Jedno z pierwszych doniesień na temat potencjalnych właściwości antyoksydacyjnych fulerenolu pochodzi z 1995 r., w którym Chiang i wsp. [22] dowodzą, że fulerenol skutecznie działa jako zmiatacz anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$), generowanego w układzie ksantyna-oksydaza ksantynowa. Nielsen i wsp. [86] oraz Markovic i Trajkovic [79] w swoich obszernych pracach przeglądowych opisali dotychczasowe wyniki badań dotyczących antyoksydacyjnych właściwości fulerenoli. Fulerenole wykazują również zdolność hamowania reakcji inicjowanych przez reaktywne formy azotu, reagując bezpośrednio z tlenkiem azotu (NO) [85].

Możliwy jest również inny mechanizm działania fulerenolu, zachodzący z udziałem światła widzialnego lub ultrafioletu, który polega na wzbudzeniu cząsteczki $C_{60}(OH)_n$ do stanu trypletowego. Powstała w ten sposób cząsteczka silnie reaguje z tlenem lub biomolekułami komórkowymi pośrednicząc w reakcjach fotosensybilizacji [90,109].



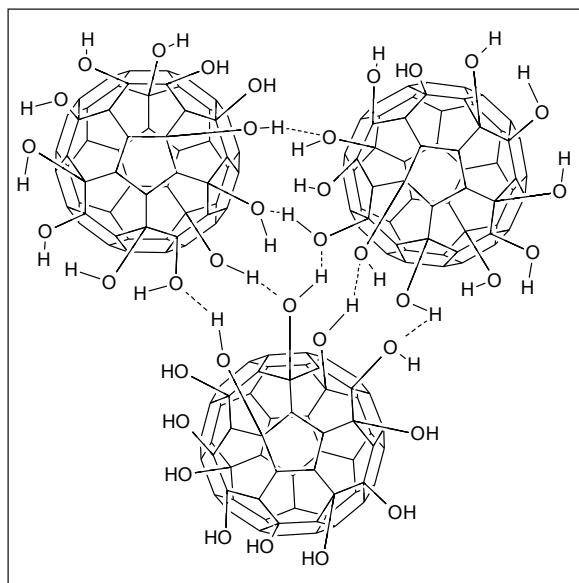
Ryc. 1. Budowa przestrzenna fulerenolu C_{60}

Dualistyczny charakter działania fulerenoli może pozwolić na zastosowanie tych związków jako czynników o działaniu cytotoksycznym wobec komórek nowotworowych lub ochronnym wobec komórek prawidłowych [79]. Ze względu na budowę kapsułkową fulerenoli dostrzega się możliwość ich wykorzystania w diagnostyce medycznej do przenoszenia związków kontrastujących i radiofarmaceutyków oraz w terapii do transportu leków.

FIZYKOCHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI FULERENOLU

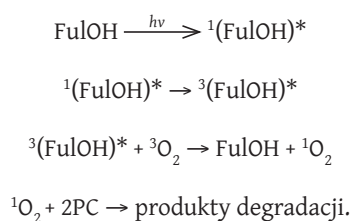
Właściwości fizykochemiczne fulereny znacząco zmieniają się po dołączeniu do jego powierzchni grup hydroksylowych. Zależy to również w dużym stopniu od miejsca przyłączenia tych grup funkcyjnych. W modelu zaproponowanym przez Guirado-López i Rincóna [44] zakładającym przyłączenie 26 cząsteczek OH, istnieją trzy możliwości ich usytuowania na powierzchni klatki fulereny: homogennie na całej powierzchni, w sposób skumulowany po jednej stronie lub poprzez tworzenie nieregularnych skupisk na powierzchni klatki. Typ rozmieszczenia, czy też stosunek poszczególnych izomerów determinuje takie właściwości jak różnice w poziomach energii między orbitalami HOMO i LUMO i wynikające stąd różnice w widmie absorpcji światła [44]. Badania wykazały, iż cząsteczki fulerenolu mają tendencje do agregacji w roztworach polarnych i tworzenia tzw. klastrów, mimo iż przyłączenie grup hydroksylowych do ich powierzchni utrudnia kontakt hydrofobowych rdzeni poszczególnych cząsteczek [4,89,108]. Tworzenie się agregatów zachodzi dzięki wiązaniom wodorowym pomiędzy grupami hydroksylowymi fulerenolu. (ryc. 2)

Tendencja do agregacji ujawnia się już przy zastosowaniu relatywnie niskich, mikromolarnych stężeń fulerenolu [108]. Narastanie objętości i powierzchni agregatów zmienia znacząco właściwości fizyczne (kolor, przewodnictwo, pochłanianie światła), chemiczne (reaktywność, genero-



Ryc. 2. Przypuszczalna struktura agregatów fulerenolu w roztworze wodnym

wanie RFT) oraz biologiczne (cytotoksyczność, cytostaticzność) roztworu. Można to wytłumaczyć tym, iż aktywność antyoksydacyjna fulerenolu w wodzie nie wzrasta liniowo wraz z jego stężeniem, lecz zgodnie z jego tendencją do tworzenia agregatów, których rozmiary zwiększają się przy rosnącym stężeniu [53]. Uważa się, że agregaty są wielocząsteczkowymi tworami o średnicy powyżej 100 nm [47], jednak Assemi i wsp. [4] wykazali, posługując się metodą frakcjonowania przepływowego w polu odśrodkowym (Flow Field-Flow Fractionation – FIFFF), iż klastry fulerenoli w roztworach wodnych są strukturami zaledwie kilkunanometrowej wielkości. Wielkość klastrów nie zależy od pH roztworu, natomiast wzrasta wraz z siłą jonową roztworu [4]. Większość prac jednak potwierdza rozmiary tworzących się agregatów rzędu dziesiątek i setek nanometrów, wskazując jednocześnie, iż wielkość i stabilność tych struktur jest zmienna w zależności od warunków, takich jak pH, temperatura czy moc jonowa rozpuszczalnika na tyle, że manipulacja wielkością agregatów staje się wręcz niemożliwa [13]. Tworzenie agregatów fulerenolu wpływa znacząco na możliwość i bezpieczeństwo zastosowania tego związku w praktyce. Przyłączenie grup hydroksylowych do powierzchni cząsteczki fulerenu nie zapobiega generowaniu tlenu singletowego, ale zwiększanie stopnia agregacji cząsteczek obniża zdolność do jego powstawania [47]. Agregacja fulerenolu powoduje zaburzenie równowagi między reakcjami fotochemicznymi typu I i II. Wykazano, iż agregaty fulerenolu po naświetleniu światłem widzialnym są w stanie zaburzać i deformować strukturę cytoszkieletu komórek glejaka, najprawdopodobniej przez wywoływanie silnego stresu oksydacyjnego [108]. W badaniach efektu, jaki wywołuje naświetlanie agregatów fulerenolu w obecności związków organicznych, takich jak etanol, 2-chlorofenol (2CP) oraz kwas salicylowy (SA), zaobserwowano silne utlenianie i degradację 2-chlorofenolu. Wybór tych trzech związków nie był przypadkowy, każdy z wybranych związków cechuje się swoistą wrażliwością w stosunku do poszczególnych reaktywnych form tlenu (rodnik hydroksylowy utlenia SA; tlen singletowy utlenia 2CP; anionorodnik ponadtlenkowy utlenia etanol). Z badań opisanych wyżej wynika, iż oksydacja spowodowana przez agregaty fulerenolu może zachodzić głównie z udziałem tlenu singletowego, a proces utleniania zależy od pH i temperatury. Proponowanym mechanizmem wywoływania stresu oksydacyjnego przez klastry fulerenolu jest przechodzenie poszczególnych jego cząsteczek we wzbudzony stan tripletowy, a następnie poprzez reakcję z tlenem, generowanie tlenu singletowego [18]. Powyższa reakcja zachodzi według schematu:



Badania na temat wpływu wodnych roztworów fulerenoli na komórki *in vitro* wykazały ich dużą cytoto-

szyczność, prawdopodobnie spowodowaną przez wywoływanie stresu oksydacyjnego w układzie badawczym [108]. Jednocześnie istnieje wiele doniesień na temat antyoksydacyjnych właściwości fulerenolu i jego protekcyjnego działania w warunkach stresu oksydacyjnego [15,34,70,96,115]. Udowodniono również, iż fulerenol w roztworze wodnym może przyjmować postać stabilnego anionorodnika. Odkrycie to wpływa znacząco na rozpatrywanie go jako związku bezpiecznego, mogącego znaleźć zastosowanie w badaniach dotyczących układów biologicznych [49]. Anderson i Barron [2] zwrócili uwagę, iż cząsteczki fulerenolu należą do wyjątkowo mało mobilnych, zatem usuwanie ich z układów biologicznych, takich jak tkanki lub ze środowiska naturalnego w przypadku zastosowania ich jako nanomateriałów, nastęrczałoby trudności. Udowodnili oni również, że hydroksylowane fulereny swobodnie wchodzą w reakcje z solami żelaza oraz miedzi, co skutkuje precypitacją produktów o różnej wielkości oraz reaktywności, zależnie od substratów reakcji oraz ich stężenia [2]. Dlatego też określenie właściwości fizykochemicznych roztworów fulerenoli, ze szczególnym uwzględnieniem roztworów wodnych, wydaje się głównym zadaniem przy rozważaniu biomedycznego zastosowania tych związków.

FULERENOL JAKO ZMIATACZ WOLNYCH RODNIKÓW

Fulereny są przez wielu autorów uznawane za skuteczne zmiatacze wolnych rodników. Przekonanie to opiera się na tym, iż fulereny mają dużą liczbę sprzężonych wiązań podwójnych i nisko położony najniższy niezapełniony orbital molekularny LUMO, który z łatwością może przyjąć elektron, co czyni fulereny bardzo podatnymi na ataki rodników [68]. Ich zdolność do przyłączania wolnych rodników jest na tyle duża, że nazwano je „gąbkami rodnikowymi (radical sponges) [113]. Jako zmiatacze wolnych rodników stosuje się najczęściej rozpuszczalne w wodzie pochodne C_{60} , takie jak PEG- C_{60} i PVP- C_{60} oraz $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$ [65]. Właściwości antyoksydacyjne fulerenolu $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ były testowane za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) przez pomiar zdolności do zmiatania stabilnego rodnika 1,1-difenyl-2-pikrylohydrozylowego (DPPH) i rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$) generowanego w reakcji Fentona. Przy zastosowaniu wysokich stężeń fulerenolu (0,71-0,88 mmol/l) zaobserwowano lepszy efekt zmiatania rodnika hydroksylowego (50-82%) niż rodnika DPPH (28-50%). Fulerenol może wykazywać właściwości antyoksydacyjne poprzez oddawanie atomu wodoru grupy hydroksylowej badanym rodnikom (DPPH i $\cdot\text{OH}$). Zostało to potwierdzone przez zarejestrowanie widma EPR rodnikowej postaci fulerenolu – $\text{C}_{60}(\text{OH})_{23}\text{O}^{\cdot}$. Interakcja między rodnikiem hydroksylowym i fulerenolem opiera się także na reakcji addycji 2n rodników $\cdot\text{OH}$ do pozostałych olefinowych wiązań podwójnych węgla, stanowiących rdzeń fulerenowy w reakcji: $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24} + 2n \cdot\text{OH}$ (n = 1-12). Mechanizmy te nie wykluczają się wzajemnie [30].

Praca Chianga i wsp. [22] prezentująca fulerenol jako skuteczny zmiatacz rodników tlenowych, a dokładnie anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$), generowane-

go w układzie ksantyna-oksydaza ksantynowa stała się obiecującą przesłanką do zbadania fulerenolu jako zmiatacza $O_2^{\cdot -}$ w układzie *in vivo*. Fulerenol zmniejszał stres oksydacyjny u psów w czasie transplantacji jelita cienkiego [70]. W czasie zabiegów transplantacyjnych dochodzi do powstania stresu oksydacyjnego w wyniku dwóch procesów. Pierwszym z nich jest czasowe wyłączenie narządów, skutkujące niedokrwieniem, co powoduje obniżenie poziomu tlenu dostarczanego do organizmu (hipoksja). Prowadzi to do spadku stężenia ATP, a w konsekwencji do gromadzenia nadmiernej ilości metabolitów purynowych, głównie hipoksantyny i ksantyny. Drugi proces to reperfuzja, czyli przywrócenie krążenia, co skutkuje „wybuchem tlenowym”. Podawanie fulerenolu przyczyniło się do zmniejszenia wysokiego stężenia RFT, spowodowanego wywoływaniem stanów niedokrwienia i reperfuzją, co wykazano poprzez pomiar poziomu MDA oraz zredukowanego glutationu (GSH) [69]. Fulerenol ($C_{60}(OH)_x$, $x=22-24$) chronił także hepatocyty szczurów przed uszkodzeniami indukowanym czterochlorkiem węgla (CCl_4) przez poprawę ich zdolności antyoksydacyjnych. $C_{60}(OH)_x$ normalizował poziom markerów uszkodzeń wątroby (ALT, AST) i nerek (BUN, CREA) w surowicy oraz korzystnie wpływał na stężenie zredukowanego glutationu w wątrobie [115].

Zdolności antyoksydacyjne fulerenolu $C_{60}(OH)_{22}$ były porównywane z fulerenem mającym przyłączone dwie reszty kwasu malonowego – $C_{60}(C(COOH)_2)_2$ oraz metalofulerenolem z włączonym gadolinem $Gd@C_{82}(OH)_{22}$, pod kątem ich zdolności do ochrony ludzkich komórek płuc linii A549 i szczurzych komórek mózgu linii rBCECs przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. W badaniach tych zastosowano, podobnie jak wyżej, technikę pułapkowania spinowego, która dostarczyła bezpośrednich dowodów na to, iż badane pochodne fulerenu mogą zmiatać powstające w warunkach fizjologicznych rodniki: $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ i 1O_2 oraz stabilny rodnik DPPH, zapobiegając tym samym peroksydacji lipidów [116].

Przyłączenie do klatki fulerenu np. reszt kwasu malonowego czy grup hydroksylowych powoduje powstanie obszaru z niedoborem elektronów, co ułatwia wiązanie wolnych rodników [116]. Dowiedziono także, że $Gd@C_{82}$ wykazuje silniejsze działanie antyoksydacyjne niż „pusty” C_{60} . Prawdopodobnie jest to związane z wyższym powinowactwem elektronowym cząsteczek $Gd@C_{82}$ (3,14 eV) w porównaniu do C_{60} (2,7 eV).

W ostatnich latach zaobserwowano, że oprócz zmiatania klasycznych RFT, fulerenol może również bezpośrednio zmiatać tlenek azotu (NO) [85], syntetyzowany przez rodzinę enzymów syntazy tlenku azotu (NOS). Tlenek azotu zaangażowany jest w pełnienie ważnych funkcji fizjologicznych, takich jak regulacja napięcia naczyń krwionośnych czy neuromodulacja, lecz w wysokich stężeniach może działać cytotoksycznie [87]. Wyniki badań uzyskane przez Mirkova i wsp. [85] sugerują, że $C_{60}(OH)_{24}$ ma zdolność zmiatania NO *in vivo*. Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ podawany 30 min przed zadziałaniem NO zapobiegał obniżeniu

aktywności enzymów antyoksydacyjnych w komórkach śródmięszowych jąder dorosłych szczurów.

Przegląd literatury z ostatnich lat wskazuje na rosnące zainteresowanie badaczy wysoko hydroksylowanymi fulerenolami z liczbą grup hydroksylowych powyżej 30, w aspekcie ich właściwości antyoksydacyjnych. Kato i wsp. [57] dowodzą, że wysoko hydroksylowany fuleren $C_{60}(OH)_{32} \cdot 8H_2O$ chronił komórki przed stresem oksydacyjnym ze strony H_2O_2 . Fulerenol w teście na odbarwienie β -karotenu wykazał ochronne działanie wobec tego antyoksydanta błonowego. Autorzy sugerują, że znaczna ilość grup – OH może ułatwiać tworzenie stabilnej rodnikowej postaci fulerenolu $C_{60}-O^{\cdot}$. Istnienie takiego rodnika zostało potwierdzone przez zespół Djordjevica metodą EPR [30].

Dzięki swoim właściwościom fulerenole mogą znaleźć zastosowanie w radiobiologii, chemioterapii czy w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Zagadnienia te oraz informacje dotyczące toksyczności fulerenoli w różnych układach biologicznych zostały przedstawione w kolejnych rozdziałach artykułu.

FULERENOL W RADIOBIOLOGII

Podczas określania poradiacyjnej rozległości zmian w układach biologicznych w przypadku promieniowania o niskiej wartości LET, uważa się, że uszkodzenia popromienne spowodowane są głównie pośrednim działaniem promieniowania. Związane jest to z budową komórki. Znaczna zawartość wody w żywych komórkach (średnio komórka zawiera ~70% H_2O) sprawia, iż prawdopodobieństwo oddziaływania promieniowania na cząsteczki wody jest znacznie większe niż na inne cząsteczki. Oddziaływanie to polega na przekazaniu energii promieniowania cząsteczkom wody, w wyniku czego następuje ich wzbudzenie i rozpad. Zjawisko to określamy mianem radiolizy wody [65,66]. W wyniku radiolizy wody powstaje wiele reaktywnych indywiduów chemicznych, głównie o charakterze rodnikowym, które mają zdolność reagowania z cząsteczkami układu modyfikując ich właściwości. Do najbardziej reaktywnych utleniaczy należy rodnik hydroksylowy. Ma on bardzo wysoki potencjał redoks, dzięki czemu ma zdolność reagowania właściwie ze wszystkimi substancjami występującymi w organizmie [62,101].

W badaniach nad wykorzystaniem fulerenów w radioochronie, fulerenole zajmują ważną pozycję, bowiem obecność wiązań podwójnych ($C=C$), wysokie powinowactwo elektronowe, łatwość przyłączania rodników (wysoka stała szybkości reakcji z rodnikiem HO^{\cdot}), reakcje z podstawnikami nukleofilowymi oraz polarność cząsteczki sprawiają, iż fulerenol spełnia wszystkie warunki dobrego radioprotektora [39]. Radioochronne działanie fulerenolu potwierdzają badania prowadzone *in vitro* na ludzkich komórkach ostrej białaczki szpikowej linii K562. Komórki wstępnie inkubowane z $C_{60}(OH)_{24}$ o stężeniu 10 μM napromieniowano promieniowaniem X w dawce 24 Gy. Stwierdzono, że fulerenol wpływał ochronnie na liczbę komórek,

morfologię, a także zdolność tworzenia kolonii [50] oraz przyczyniał się do zahamowania radiacyjnej inaktywacji enzymów, takich jak dysmutaza nadadtlenkowa oraz peroksydaza glutationowa [10].

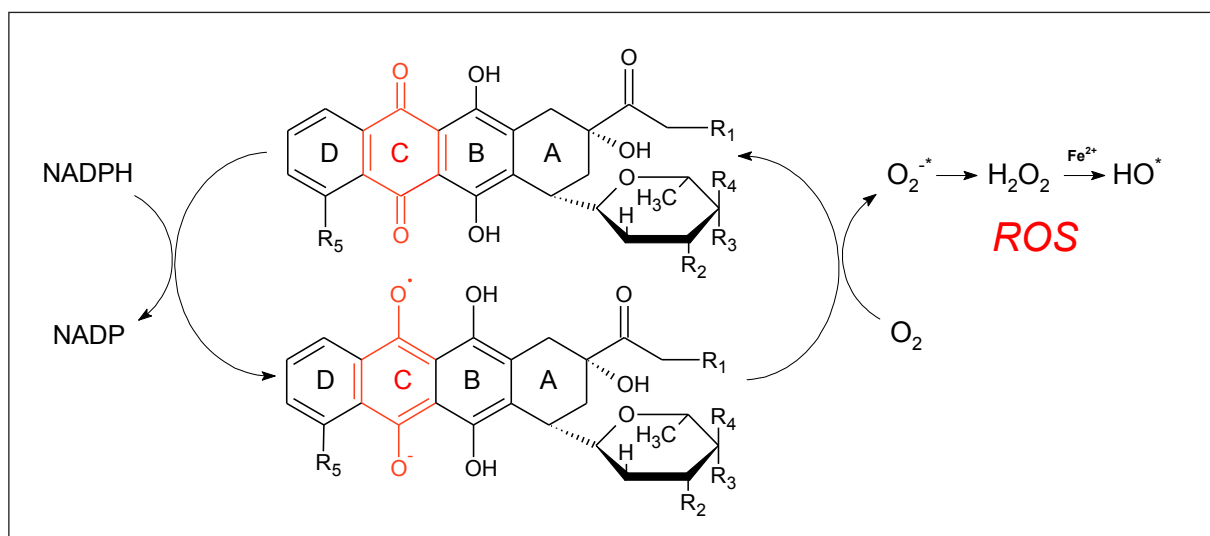
Kolejnym krokiem było wykazanie radioochronego działania fulerenolu w układach *in vivo*. Mysiom poddanym działaniu promieniowania X w dawce 6-8 Gy, podano 30 min przed napromieniowaniem fulerenol w stężeniach: 10 mg/kg i 100 mg/kg. W stężeniu 100 mg/kg fulerenol wykazywał ochronne działanie na wysokie dawki promieniowania w porównaniu do grupy kontrolnej. Fulerenol podany w stężeniu 10 mg/kg nie wykazywał znaczącego efektu ochronnego [104].

Radioochronne działanie fulerenolu wykazano także u szczurach szczepu Wistar [105]. Działanie to było porównywane z efektem uzyskanym po podaniu amifostyny, związku cytoprotekcyjnego podawanego pacjentom podczas radioterapii. Amifostyna (WR 2721) jest organicznym tiofosforanem, który ulega uaktywnieniu przez defosforylację, w wyniku której powstaje wolny aktywny tiol (WR 1065). Proces defosforylacji katalizowany jest przez fosfatazę alkaliczną, której stężenie w tkankach prawidłowych jest znacznie wyższe niż w tkance zmienionej nowotworowo [12,26,80,102]. Zarówno amifostyna jak i fulerenol wydłużały czas życia szczurów powyżej 30 dni po napromieniowaniu dawką letalną 8 Gy. Ponadto fulerenol w dawce 100-300 mg/kg był bardziej skuteczny w ochronie białych krwinek niż amifostyna w pierwszym i drugim tygodniu od napromieniowania. Dodatkowo wykazano, że działanie radioprotekcyjne powyższych związków było selektywne, bowiem fulerenol efektywniej chronił śledzionę, jelito cienkie i płuca, podczas gdy amifostyna była skuteczniejsza w ochronie serca, wątroby i nerek [105]. Powyższe dane uzyskane pozostają w zgodzie z wynikami, które otrzymali Cai i wsp. [15]. Fulerenol podawano myszom codziennie przez 2 tygodnie w dawce 40 mg/kg. Następnie naświetlano zwierzęta dawką letalną promieniowania γ równą 8 Gy i określano przeżywalność po

30 dniach od napromieniowania. Analizowano zaburzenia czynności mitochondriów, uszkodzenia oksydacyjne, takie jak: poziom MDA, GSH, aktywność SOD, liczbę grup karbonylowych w komórkach wątroby. Przeżywalność w grupie zwierząt poddanych działaniu fulerenolu przed napromieniowaniem wynosiła 73%, podczas gdy w grupie kontrolnej, której nie podano fulerenolu, wynosiła 0%. Fulerenol chronił dysmutazę nadadtlenkową (SOD) i zapobiegał utlenianiu glutationu (GSH) oraz zmniejszał peroksydację lipidów w wątrobie. Było to najprawdopodobniej związane ze zdolnością $C_{60}(OH)_{24}$ do zmiatania RFT i rodników lipidowych. Fulerenol chronił przed utlenieniem białka mitochondrialne, wpływał na zachowanie potencjału błonowego mitochondriów oraz hamował indukcję apoptozy przez promieniowanie jonizujące. W świetle powyższych wyników należy jednak zaznaczyć, iż ochronny charakter fulerenolu może być uwarunkowany stężeniem, jaki działa na badany układ. Zhao i wsp. [121] stosując stężenie 0,25 mg/ml zaobserwowali radiouczulające działanie fulerenolu $C_{60}(OH)_n$, $n=18-22$ przejawiające się obniżeniem aktywności dysmutazy nadadtlenkowej, katalazy oraz zwiększeniem poziomu peroksydacji lipidów u pierwotniaków *Stylonychia mytilus*. Fulerenol w stężeniach poniżej 0,06-0,1 mg/ml wykazywał działanie radioochronne przed promieniowaniem gamma z ^{60}Co aż do dawki 1500 Gy. Opisane zjawisko „efektu stężeniowego” fulerenolu może mieć decydujące znaczenie przy projektowaniu układu doświadczalnego, w którym w zależności od zastosowanej dawki, może dominować efekt radiouczulający lub radioochronny.

FULERENOL A CHEMIOTERAPIA

Chemioterapia jest, oprócz radioterapii, podstawową metodą leczenia chorób nowotworowych. Stosowana jest także pomocniczo po operacyjnym usunięciu guza i w radioterapii. Jednym z najczęściej stosowanych leków w terapii przeciwnowotworowej są antybiotyki antracyklinowe. Działanie antracyklin na komórki nowotworowe opiera się na modyfikacji struktury DNA poprzez kompleksy interkalacyjne i wiązania kowalencyjne, ale także na wprowadzaniu



Ryc. 3. Cykl redoks antybiotyków z grupy antracyklinowych (na podstawie [78], zmodyfikowano)

zmian w strukturze zasad azotowych. To ostatnie polega na oksydacyjnym modyfikowaniu zasad i jest wynikiem działania reaktywnych form tlenu powstających w reakcjach redoks z udziałem antracyklin. Cykl redoks antybiotyków z grupy antracyklinowych przedstawia ryc. 3 [8,84,100].

Leczenie z użyciem antracyklin mimo skutecznego działania przeciwnowotworowego nie pozostaje obojętne dla organizmu. Terapia antracyklinami indukuje ogólnoustrojowy stres oksydacyjny, który zakłóca efektywność leczenia, wywołując wiele skutków niepożądanych, m.in. obciążenie mięśnia sercowego. Spowodowane jest to tym, iż tkanka mięśniowa serca wykazuje małą aktywność enzymów antyoksydacyjnych, co z kolei prowadzi do zwiększonej wrażliwości mięśnia sercowego na stres oksydacyjny [81]. Kardioprotekcyjne działanie fulerenolu $C_{60}(OH)_{24}$ zostało wykazane w warunkach *in vivo* na szczurach szczepu Wistar [51,103]. Pomiaru odruchu bradykardii w zapisie EKG wykazały poprawę pracy serca zwierząt traktowanych fulerenolem wraz z dokсорubicyną. W grupie zwierząt leczonych DOX wzorzec zapisu EKG był istotnie dłuższy niż w grupie kontrolnej oraz w grupie traktowanej połączeniem fulerenolu i DOX (w dawkach 30 mg/kg i 100 mg/kg). Zanotowano również poprawę w poziomie enzymatycznych markerów stanu zapalnego, takich jak LDH, ALAT, ASPAT, CK i alfa-HBDH w grupach traktowanych DOX i fulerenolem. Co ciekawe, sam fulerenol nie wpływał na wartości badanych parametrów. Badanie histopatologiczne serca szczurów również potwierdziło pozytywny wpływ fulerenolu podanego łącznie z antracykliną [103]. Badacze tłumaczą korzystne właściwości fulerenolu na gruncie rodnikowego mechanizmu działania DOX. Fulerenol prawdopodobnie wpływał ochronnie na komórki przez zmiatanie RFT i/lub usuwanie wolnego żelaza w postaci kompleksu fulerenol-żelazo. Antyoksydacyjne właściwości fulerenolu w połączeniu z dokсорubicyną potwierdzono również w badaniach tkanek jąder oraz nerek u szczurów. W 2010 r. Srdjenovic i wsp. [99] badając wpływ fulerenolu na powyższe narządy stwierdzili zmniejszony poziom markerów stresu oksydacyjnego, takich jak TBARS, czy utlenianie GSH. Fulerenol chronił enzymy systemu antyoksydacyjnego: SOD, CAT, GSH-Px, GST oraz GT u zwierząt leczonych dokсорubicyną i fulerenolem. Innym przykładem korzystnego współdziałania fulerenolu i dokсорubicyny jest zastosowanie obu związków wobec komórek raka sutka. Badania prowadzono na liniach komórkowych nowotworu piersi MCF-7 i MDA-MB-231, w których stwierdzono zmniejszenie tempa proliferacji komórek nowotworowych traktowanych fulerenolem. Zaobserwowano również zmniejszoną cytotoxycywność dokсорubicyny, a także innych leków przeciwnowotworowych, takich jak cisplatyna, taxol, tiazofuran w obecności fulerenolu. Fulerenol nie wykazywał genotoksycywności wobec badanych linii komórkowych [60]. Korzystny wpływ fulerenolu został potwierdzony również w badaniach aktywności enzymów antyoksydacyjnych erytrocytów szczura po podaniu pojedynczej dawki dokсорubicyny [83] oraz na hepatocytach szczurów z rakiem jelita grubego [51] i z rakiem sutka [52].

Nowe spojrzenie na potencjalne możliwości leczenia raka z użyciem fulerenolu opiera się na jego wykorzystaniu jako nośnika do transportu dokсорubicyny. Chaudhuri i wsp. [19] uzyskali koniugat fulerenolu z dokсорubicyną (Ful-DOX). Koniugat Ful-DOX uznany został za stosunkowo stabilny w roztworze PBS, lecz po inkubacji z lizatem komórek czerniaka zaobserwowano uwalnianie się dokсорubicyny z koniugatu. Koniugat Ful-DOX tłumiał proliferację komórek nowotworowych *in vitro* poprzez blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2-M, kierując komórki na drogę apoptozy. Ponadto, w badaniach *in vivo* na modelu mysim koniugat Ful-DOX wykazywał skuteczność przeciwnowotworową podobną do tej, jaką wywoływała wolna dokсорubicyna, lecz bez toksyczności układowej.

Duża liczba grup hydroksylowych na powierzchni fulerenolu umożliwia nie tylko przyłączenie różnych związków, m.in. cząsteczek leku, ale także tworzenia wielu wiązań wodorowych z różnymi komponentami systemów biologicznych np. z domenami białkowymi błony plazmatycznej lub hydrofilowymi głowami lipidowymi [41].

Fulerenol może adsorbować się do białek cytoszkieletu w erytrocytach [40]. Zdolność ta może zostać wykorzystana do transportu leków z wykorzystaniem erytrocytów i fulerenolu. Wydłużanie czasu przebywania substancji (leku) w krwiobiegu jest możliwe poprzez przyłączenie jej do obszarów powierzchniowych białek błon erytrocytów, takich jak białko pasma 3 czy glikoferyna. Metoda ta została opisana przez Krantza [64] i zakłada istnienie tzw. „kotwicy”, tj. substancji zawierających na swojej powierzchni grupy funkcyjne wykazujące silne powinowactwo do któregoś z białek cytoszkieletu erytrocytów. Fulerenol mając na powierzchni polarne grupy -OH może pełnić funkcję „kotwicy” między lekiem a erytrocytem [40].

NEUROPROTEKCYJNE WŁAŚCIWOŚCI FULERENOLU

Tkanka mózgowa charakteryzuje się nasilonym utlenianiem biologicznym, czemu towarzyszy powstawanie produktów utleniania oraz względnie mała wydajność mechanizmów antyoksydacyjnych i naprawczych [5,95,117]. Komórki nerwowe z dużą zawartością lipidów, przewagą metabolizmu tlenowego (zużywającego 20% tlenu pobranego przez organizm) oraz niewielką aktywnością enzymów eliminujących RFT, stanowią główny cel dla prooksydacyjnych reakcji wolnorodnikowych [9]. Stres oksydacyjny może pośredniczyć w ekscytotoksycznym uszkodzeniu neuronów, będącym konsekwencją m.in. nadmiernej stymulacji receptorów glutaminergicznych [33], ale także może prowadzić do apoptotycznej śmierci neuronów [42]. Poza naturalnym udziałem w procesie neurogenezy, apoptoza może się przyczyniać również do patologicznej utraty neuronów w stanach chorobowych, takich jak niedokrwienie mózgu, choroba Huntingтона czy choroba Alzheimera [17,31].

Niektóre komórki nerwowe, a zwłaszcza astrocyty i oligodendrocyty, takich struktur mózgowia jak jądra podstawy czy formacja hipokampa, wykazują zdolność do akumulacji

cji jonów żelaza w postaci związków wysokocząsteczkowych, stąd ich podatność na stres oksydacyjny [32]. Toksyczność jonów żelaza jest spowodowana ich zdolnością do reinicjowania procesu peroksydacji lipidów. Proces ten polega na ponownym rozkładzie nadtlenków lipidów, czyli nierodnikowych produktów peroksydacji, który prowadzi do powstania produktów wolnorodnikowych [6,45]. Podwyższone stężenie jonów żelaza zaobserwowano w istocie czarnej u pacjentów dotkniętych chorobą Parkinsona [36], podczas gdy u chorych cierpiących na chorobę Alzheimera ponadto odnotowano podwyższone zawartości jonów miedzi i cynku w chorobowo zmienionych obszarach mózgu [1,110].

Ze względu na dotychczasowy brak efektywnych metod leczenia chorób o podłożu neurodegeneracyjnym wciąż poszukuje się alternatywnych związków chemicznych mających przeciwdziałać negatywnym skutkom stresu oksydacyjnego w mózgu. Do związków tych zaliczyć należy fulerenole, które są obecnie obiektem badań jako czynniki antyoksydacyjne i zabezpieczające przed formowaniem się blaszek amyloidowych w chorobie Alzheimera [48,58,73,91,92], czy w przebiegu innych chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, których przyczyny mogą tkwić w zachwianiu równowagi oksydacyjnej komórki. Huang i wsp. [48] wykazali, że fulerenol widocznie redukuje wpływ β -amyloidu na zwiększenie dokomórkowego prądu wapniowego, zapobiegając tym samym zaburzeniu funkcjonowania szlaku sygnałowego w komórce.

Fulereny mają zdolność do gromadzenia się w mitochondriach [24,38], a ich pochodne rozpuszczalne w wodzie, takie jak fulerenol i pochodne kwasu malonowego (karboksypochodne) zmiatają RFT bardziej wydajnie od konwencjonalnych antyoksydantów. Dlatego też hydrofilowe pochodne fulerenów są obiecującymi kandydatami na czynniki protekcyjne i antyoksydacyjne. Potwierdzają to badania z 2000 r., w których wykazano że fulerenole wpływają neuroprotektoryjnie na neurony w hodowlach *in vitro* poprzez blokowanie receptorów glutaminergicznych oraz obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia [55]. Podobne wyniki uzyskał Dugan i wsp. [34], którzy w badaniach elektrofizjologicznych dowiedli, że dwie pochodne fulereny: $C_{60}(OH)_{12}$ i $C_{60}(OH)_{18-20}O_{3-7}$ wykazywały doskonałe właściwości przeciwutleniające potwierdzone metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Pochodne te obniżały wywołaną ekscytotoksycznie śmierć neuronów pochodzących z kory nowej myszy nawet o 80% oraz działały antyapoptotycznie.

Ciekawym jest również to, iż karboksylowa pochodna C_{60} skutecznie chroniła neurony dopaminergiczne przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego, wywołanego neurotoksynami [75]. Upośledzenie neuroprzeżywalności dopaminergicznego ma zasadnicze znaczenie w patogenezie choroby Parkinsona [28]. Za jedną z przyczyn śmierci neuronów istoty czarnej w przebiegu tej choroby uważa się utlenianie dopaminy (DA). Może to się zdarzyć w wyniku reakcji enzymatycznego utleniania DA z udziałem monoaminooksydazy typu B (MAO_B), jak i samoutleniania

DA, które prowadzi do powstawania nadtlenku wodoru (H_2O_2). Nadtlenek wodoru w obecności jonów Fe^{2+} generuje silnie toksyczny rodnik $\cdot OH$ za pośrednictwem reakcji Fentona. Zanik komórek dopaminergicznych w przebiegu choroby Parkinsona dotyczy wyłącznie komórek zawierających neuromelaninę, która ma zdolność wiązania jonów żelaza [7,23,27]. Fulerenol okazał się efektywnym neuroprotektorem w komórkowym modelu choroby Parkinsona. Cai i wsp. [16] indukowali stres oksydacyjny w ludzkich komórkach neuroblastomy z udziałem MTPT. MTPT w astrocytach jest utleniany do MPP^+ przez głojęwą oksydazę monoaminową. Następnie MPP^+ dostaje się do neuronów dopaminergicznych za pomocą swoistych transporterów hamując oddychanie mitochondrialne, co obniża poziom ATP oraz powoduje wytwarzanie rodników ponadtlenkowych. Oba te procesy prowadzą do śmierci komórki nerwowej. Autorzy wykazali, iż fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ skutecznie zmiatał wolne rodniki sugerując, iż może on stanowić potencjalny czynnik zapobiegający dysfunkcjom mitochondrialnym wywołanym przez działanie MPP^+ .

Rozważania na temat funkcjonowania poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego w znacznej mierze opierają się na analizie wzorca ich aktywności elektroencefalograficznej (EEG). Wpływ fulerenolu na aktywność komórkową ośrodkowego układu nerwowego badany był na skrawkach formacji hipokampa szczura poddanych działaniu nadtlenku wodoru oraz nadtlenku kumenu [106]. W badaniach tych wykazano, iż polihydroksylowany fuleren zapobiegał redukcji amplitudy wyładowań komórkowych spowodowanych przez nadtlenek kumenu i nadtlenek wodoru.

Oprócz właściwości antyoksydacyjnych fulerenoli, wykazano także łagodzący wpływ tych związków na hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy *in vitro* przez związki o charakterze toksycznym [35] oraz ich ochronny wpływ na receptory typu NMDA, AMPA, $GABA_A$ i KA w warunkach podwyższonego stresu oksydacyjnego [33,34,55]. Najnowsze badania Zha i wsp. [118] sugerują, że fulerenol może chronić neurony formacji hipokampa przed uszkodzeniami, ale także indukować śmierć komórkową w określonych dawkach, co świadczy o istnieniu efektu stężeniowego.

Mimo przekonujących dowodów na temat neuroprotektoryjnych właściwości rozpuszczalnych w wodzie pochodnych fulerenów wciąż dysponujemy zbyt małą wiedzą na temat mechanizmu działania tych cząsteczek oraz ewentualnych działań niepożądanych. Stąd istnieje konieczność dalszych badań nad fulerenolami zanim stanie się możliwe ich terapeutyczne zastosowanie jako czynników neuroochronnych.

FULERENOL W METODACH DIAGNOSTYKI OBRAZOWEJ

Potencjalne możliwości wykorzystania fulerenoli nie ograniczają się do zmniejszania niekorzystnych skutków działania RFT. Dzięki kapsułkowej budowie fulerenów, do-

strzeżę się ich możliwe zastosowanie jako nośników leków oraz radiofarmaceutyków. Ze względu na ich dobrą trwałość kinetyczną oraz odporność na procesy metaboliczne mogą stanowić alternatywę dla związków chelatujących. Główną wadą obecnych leków zawierających chelatowane radioizotopy jest ich wyraźna kinetyczna niestabilność w warunkach *in vivo*, co może prowadzić do uwolnienia małych ilości toksycznych radiomateriałów [11,88,111].

Do badań z zastosowaniem techniki rezonansu magnetycznego (MR) stosuje się substancje, które po dożylnym podaniu gromadzą się w tkankach objętych procesem chorobowym i wzmacniają lub obniżają pochodzący z tych miejsc sygnał rezonansowy. Na podstawie właściwości magnetycznych stosowanych środków kontrastujących dzieli się je na pozytywne i negatywne. Podstawowym składnikiem powszechnie stosowanych środków kontrastujących pozytywnych jest gadolin [3,37,120]. Gadolin w czystej postaci jest jednak silną trucizną, dlatego zaproponowano zamknięcie Gd we wnętrzu klatki węglowej fulerenu C_{82} lub C_{60} w celu ekranowania toksyczności tego pierwiastka. Uzyskane endohedralne pochodne fulerenu miały postać $Gd@C_{82}$ oraz $Gd@C_{60}$ [71,82]. Gadolin należy do grupy lantanowców, ich największą wydajność enkapsulacji uzyskano stosując fuleren C_{82} . Pochodną metalofulereny $Gd@C_{82}$ poddano hydroksylacji, aby uzyskać rozpuszczalny w wodzie metalofulerenol o wzorze $Gd@C_{82}(OH)_{40}$ [82]. Otrzymana pochodna $Gd@C_{82}(OH)_{40}$ okazała się atrakcyjnym czynnikiem kontrastującym w MR nie tylko ze względu na ograniczenie toksyczności gadolinu, ale również zwiększenie mocy sygnału. $Gd@C_{82}(OH)_{40}$ wykazywał wielokrotnie wyższy sygnał niż stosowany powszechnie w medycynie chelat Gd-DTPA o komercyjnej nazwie Magnevist® [82]. Fatouros i wsp. [37] uzyskali podobne rezultaty prowadząc badania na rozpuszczalnym w wodzie metalofulerenie $Gd_3N@C_{80}[DiPEG5000(OH)_x]$ sfunkcjonalizowanym poli(glikolem etylenowym), a następnie hydroksylowanym. Wykazali oni, że uzyskana pochodna ma znaczne możliwości jako środek kontrastujący w technice MR zwiększając około 40 razy intensywność sygnału w porównaniu do konwencjonalnej chelatowanej postaci gadolinu wykorzystywanej w technice MR.

Paramagnetyczne metalofulerenole nie są jedynym obiektem badań nad wykorzystaniem fulerenoli w diagnostyce klinicznej. Pierwiastki promieniotwórcze zamknięte w środku fulerenolu, takie jak ciężkie radioizotopy holmu ^{166}Ho [46] ulegają rozpadowi promieniotwórczemu, w którym następuje emisja cząstek β – stosowanych w terapii i emisja kwantów promieniowania γ wykorzystywanych w diagnostyce. Do enkapsulacji izotopu holmu użyto fulerenu C_{82} podobnie jak w przypadku jonów gadolinu. Gadolin i holm należą do lantanowców. Dla tej grupy pierwiastków wykazano, iż jon lantanowca M^{3+} , który jest znacznie mniejszy niż wnętrze fulerenu C_{82} jest ulokowany centrycznie [43,56]. Badania biodostępności radioaktywnego metalofulerenolu $^{166}Ho_x@C_{82}(OH)_y$ potwierdziły możliwość wykorzystania tych cząsteczek jako radioznaczników w badaniach *in vivo*. Ponadto jego czas utrzymywania się we krwi wynosił ponad jedną godzinę.

Głównym miejscem akumulacji związku były: wątroba, śledziona, kości i nerki [14]. Duża stabilność kinetyczna i brak ostrej toksyczności *in vivo* sprawiają, że pochodna metalofulerenolu $^{166}Ho_x@C_{82}(OH)_y$ wydaje się interesującym związkiem w świetle przyszłych badań.

Znakowanie fulerenolu izotopem promieniotwórczym nie musi polegać jedynie na enkapsulacji pierwiastka. Qingnuan i wsp. [93] utworzyli związek kompleksowy pomiędzy fulerolem a izotopem technetu ^{99m}Tc o wzorze $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_x(O)_y$. Technet emituje kwanty promieniowania γ , które można rejestrować i wykorzystać w diagnostyce SPECT, tj. tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów. Badania na królikach wykazały, że kompleks $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_x(O)_y$ w głównej mierze gromadzi się w wątrobie, nerkach, śledzionie i kościach [94], podobnie jak w przypadku związków typu $^{166}Ho_x@C_{82}(OH)_x$ [14]. Podobny kompleks o wzorze $^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3-C_{60}(OH)_{22-24}$ uzyskał zespół Djordjevića [29,77], w tych badaniach proces biodystrybucji monitorowany był u psów z wykorzystaniem dynamicznej i statycznej scyntygrafii. Analiza potwierdziła szybką akumulację fulerenolu w wątrobie.

Luo i wsp. [76] uzyskali karboksylowaną i hydroksylowaną pochodną fulerenu – $^{124}I-f-Gd_3N@C_{80}$, mającą zarówno właściwości paramagnetyczne pochodzące od gadolinu, jak i emitującą pozytony β^+ tworzone z rozpadu jodu 124, które mogą być rejestrowane z udziałem pozytronowej tomografii emisyjnej (PET). Należy bowiem zaznaczyć, że w przypadkach gdzie stosowanie pojedynczych metod diagnostycznych budzi wątpliwość postawienia trafnej diagnozy, metody łączone dostarczają pełniejszej informacji [54]. Do najczęściej stosowanych metod podwójnych zaliczamy SPECT/CT, SPECT/MR i PET/MR, z których ta ostatnia zasługuje na szczególną uwagę, ze względu na możliwość stosowania niższych dawek promieniowania jonizującego [25,107].

Na uwagę zasługuje to, iż hydrofilowe pochodne fulerenów mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w łączonych technikach diagnostycznych, na co wskazują badania z użyciem pochodnej karboksylowanej i hydroksylowanej $^{124}I-f-Gd_3N@C_{80}$, która była sprawdzana w warunkach *in vivo* na szczurach z guzem mózgu i okazała się skuteczna w diagnostyce zarówno z wykorzystaniem MR jak i microPET [76].

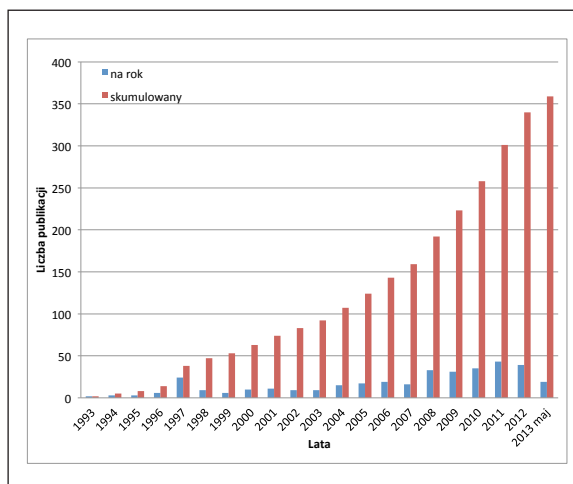
Przegląd powyższej literatury wskazuje na szeroki zakres możliwości zastosowania pochodnych fulerenów w diagnostyce obrazowej, co budzi nadzieje na znalezienie nowego ulepszanego czynnika kontrastującego.

FULERENOLE A ŚRODOWISKO NATURALNE

Zainteresowanie hydroksylowaną pochodną fulerenu nie słabnie, a wręcz przeciwnie z każdym rokiem pojawiają się nowe doniesienia na temat wpływu fulerenolu na różne układy badawcze. Na ryc. 4 przedstawiono dane na podstawie bazy SCOPUS dotyczące rocznej ilości wydawanych prac na temat fulerenolu, jak i skumulowaną liczbę

publikacji, gdzie fullerol i fullerol to słowa referencyjne. Olbrzymi postęp w dziedzinie nanotechnologii nie tylko rozbudza wyobraźnię naukowców w świecie nauk biomedycznych, ale stawia także pytanie o szkodliwość fulerenoli i innych nanocząstek, zwłaszcza że pojawia się coraz więcej doniesień literaturowych na temat toksycznego wpływu nanomateriałów na środowisko [59]. Rosnące wykorzystanie materiałów fulerenowych zwiększa prawdopodobieństwo przypadkowego uwolnienia tych związków do środowiska. Produkcja fulerenów i nanorurek węglowych sięga obecnie kilkudziesięciu ton rocznie.

Prowadzono badania na temat bioakumulacji fulerenu C_{60} znakowanego izotopowo węglem ^{14}C . Umieszczony w glebie radioaktywny $^{14}C_{60}$ został wykryty w ciele dżdżownicy, co jest bezpośrednim dowodem na możliwość akumulacji nanomateriałów fulerenowych w żywych tkankach [74]. Badania nad fuleremem C_{60} mają ścisły związek z hydroksylovaną pochodną C_{60} – fulerolem, zwłaszcza że zdaniem naukowców chemiczna transformacja C_{60} do $C_{60}(OH)_x$ zachodzi poprzez utlenienie związane z działaniem czynników zarówno abiotycznych jak i biotycznych. Pierwszą pracę podejmującą problem biodegradacji fulerenolu z wykorzystaniem dwóch gatunków grzybów: *Trametes versicolor* i *Phlebia tremellosa* przedstawił Schreiner i wsp. w 2009 [97]. Wykazali oni, iż fulerenol może ulegać akumulacji w lipidach grzybów, co więcej może być przekształcany z udziałem grzybów do dwutlenku węgla. Wyniki tych badań dostarczają cennych informacji o „losach” fulerenoli w środowisku. Należy tu przytoczyć, także wyniki badań Andersona i Barrona [2], którzy wykazali, iż cząsteczki fulerenolu należą do wyjątkowo mało mobilnych oraz tworzą kompleksy z solami żelaza i miedzi, co skutkuje precypitacją produktów o różnej wielkości, a to w znaczny sposób może utrudniać usuwanie fulerenoli ze środowiska naturalnego. Kolejnym problemem może być rozkład tak skompleksowanych jonów metali. Skompleksowane przez fulerenol sole miedzi i żelaza, w wyniku działania czynników biotycznych i/lub abiotycznych w środowisku, mogą zostać uwolnione z kompleksu i w konsekwencji inicjować reakcję Fentona. Lecoanet i wsp. [72] przeprowadzili bada-



Ryc. 4. Liczba publikacji dotyczących hydroksylowanej pochodnej fulerenu ukazujących się w roku (diagram niebieski) oraz skumulowana liczba publikacji (diagram czerwony)

nia nad mobilnością różnych nanozwiązków w materiałach porowatych. Badania miały na celu dostarczenie informacji na temat możliwości przenikania wybranych nanomateriałów do wód gruntowych. Uzyskane wyniki świadczą, iż fulerenol wykazywał najwyższą mobilność w materiałach porowatych, a zatem istnieje możliwość przenikania fulerenolu do wód gruntowych poprzez warstwę gleby.

Nie można pominąć prac informujących o oddziaływaniu fulerenolu na organizmy wodne. W pracy z 2012 r. Socoowski-Britto i wsp. [98] opisują niekorzystny wpływ fulerenolu na skrzelę ryb z rodziny karpiowatych (*Cyprinus carpio*) eksponowanych na działanie promieniowania UV. Fulerenol u ryb wywoływał zwiększenie ogólnego stresu oksydacyjnego.

Problem związany z bioakumulacją i biodegradacją nanozwiązków, takich jak fulereny i ich pochodne jest istotny z punktu widzenia toksykologii środowiska, jednak wciąż dysponujemy zbyt małą wiedzą na temat późnych skutków działania tych związków na ekosystemy naturalne.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Amadoruge P.C., Barnham K.J.: Alzheimer's disease and metals: a review of the involvement of cellular membrane receptors in metallosignalling. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 2011; 2011: 542043
- [2] Anderson R., Barron A.R.: Reaction of hydroxyfullerene with metal salts: a route to remediation and immobilization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005; 127: 10458-10459
- [3] Anderson S.A., Lee K.K., Frank J.A.: Gadolinium-fullerenol as a paramagnetic contrast agent for cellular imaging. *Invest. Radiol.*, 2006; 41: 332-338
- [4] Assemi S., Tadjiki S., Donose B.C., Nguyen A.V., Miller J.D.: Aggregation of fullerol $C_{60}(OH)_{24}$ nanoparticles as revealed using flow field-flow fractionation and atomic force microscopy. *Langmuir*, 2010; 26: 16063-16070
- [5] Balu M., Sangeetha P., Haripriya D., Panneerselvam C.: Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci. Lett.*, 2005; 383: 295-300
- [6] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003; Warszawa
- [7] Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim M.B.: Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 1991; 57: 1609-1614
- [8] Beretta G.L., Zunino F.: Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Top. Curr. Chem.*, 2008; 283: 1-19
- [9] Bernat R.: Wskaźniki stresu oksydacyjnego mózgu po dokomorowej infuzji endotoksyny – efekt wpływu adrenergicznego. *Now. Lek.*, 2000; 69: 58-70
- [10] Bogdanović V., Stankov K., Icević I., Zikic D., Nikolić A., Solajić S., Djordjević A., Bogdanović G.: Fullerol $C_{60}(OH)_{24}$ effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line. *J. Radiat. Res.*, 2008; 49: 321-327
- [11] Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Prato M.: Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur. J. Med. Chem.*, 2003; 38: 913-923

- [12] Bourcier C., Levy A., Vozenin M.C., Deutsch E.: Pharmacological strategies to spare normal tissues from radiation damage: useless or overlooked therapeutics? *Cancer Metastasis Rev.*, 2012; 31: 699-712
- [13] Brant J.A., Labille J., Robichaud C.O., Wiesner M.: Fullerol cluster formation in aqueous solutions: implications for environmental release. *J. Colloid Interface Sci.*, 2007; 314: 281-288
- [14] Cagle D.W., Kennel S.J., Mirzadeh S., Alford J.M., Wilson L.J.: In vivo studies of fullerene-based materials using endohedral metallofullerene radiotracers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 5182-5187
- [15] Cai X., Hao J., Zhang X., Yu B., Ren J., Luo C., Li Q., Huang Q., Shi X., Li W., Liu J.: The polyhydroxylated fullerene derivative C60(OH)24 protects mice from ionizing-radiation-induced immune and mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010; 243: 27-34
- [16] Cai X., Jia H., Liu Z., Hou B., Luo C., Feng Z., Li W., Liu J.: Polyhydroxylated fullerene derivative C60(OH)24 prevents mitochondrial dysfunction and oxidative damage in an MPP+-induced cellular model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.*, 2008; 86: 3622-3634
- [17] Calissano P., Matrone C., Amadoro G.: Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. *Commun. Integr. Biol.*, 2009; 2: 163-169
- [18] Chae S.R., Hotze E.M., Wiesner M.R.: Evaluation of the oxidation of organic compounds by aqueous suspensions of photosensitized hydroxylated-C60 fullerene aggregates. *Environ. Sci. Technol.*, 2009; 43: 6208-6213
- [19] Chaudhuri P., Paraskar A., Soni S., Mashelkar R.A., Sengupta S.: Fullerol-cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy. *ACS Nano*, 2009; 3: 2505-2514
- [20] Chen Z., Ma K., Wang G., Zhao X., Tang A.: Structures and stabilities of C60(OH)4 and C60(OH)6 fullerene derivatives. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 2000; 498: 227-232
- [21] Chiang L.Y., Bhonsle J.B., Wang L., Shu S.F., Chang T.M., Hwu J.R.: Efficient one-flask synthesis of water-soluble [60]fullerenols. *Tetrahedron*, 1996; 52: 4963-4972
- [22] Chiang L.Y., Lu F.J., Lin J.T.: Free radical scavenging activity of water-soluble fullerene derivatives. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995; 12: 1283-1284
- [23] Chinta S.J., Andersen J.K.: Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1780: 1362-1367
- [24] Chirico F., Fumelli C., Marconi A., Tinari A., Straface E., Malorni W., Pellicciari R., Pincelli C.: Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Exp. Dermatol.*, 2007; 16: 429-436
- [25] Choi J.S., Park J.C., Nah H., Woo S., Oh J., Kim K.M., Cheon G.J., Chang Y., Yoo J., Cheon J.: A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008; 47: 6259-6262
- [26] Citrin D., Cotrim A.P., Hyodo F., Baum B.J., Krishna M.C., Mitchell J.B.: Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist*, 2010; 15: 360-371
- [27] Dauer W., Przedborski S.: Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003; 39: 889-909
- [28] Davie C.A.: A review of Parkinson's disease. *Br. Med. Bull.*, 2008; 86: 109-127
- [29] Djordjević A., Ajdinovića B., Dupudjaa M., Trajkovića S., Milovanovića Z., Maksin T., Nešković O., Bogdanović G., Trpkov D., Cvetičanin J., Injac R.: Scintigraphy of the domestic dog using [99mTc(CO)3(H2O)3]-C60(OH)22-24. *Dig. J. Nanomater. Bios.*, 2010; 6: 99-106
- [30] Djordjević A., Canadanovic-Brunet J., Vojinovic-Miloradov M., Bogdanovic G.: Antioxidant properties and hypothetical radical mechanism of fullerol C60(OH)24. *Oxid. Commun.*, 2005; 27: 806-812
- [31] Draganow M., Faull R.L., Lawlor P., Beilharz E.J., Singleton K., Walker E.B., Mee E.: In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport*, 1995; 6: 1053-1057
- [32] Dringen R., Bishop G.M., Koeppe M., Dang T.N., Robinson S.R.: The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. *Neurochem. Res.*, 2007; 32: 1884-1890
- [33] Dugan L.L., Bruno V.M., Amagasa S.M., Giffard R.G.: Glia modulate the response of murine cortical neurons to excitotoxicity: glia exacerbate AMPA neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 1995; 15: 4545-4555
- [34] Dugan L.L., Gabrielsen J.K., Yu S.P., Lin T.S., Choi D.W.: Buckminsterfullerene free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol. Dis.*, 1996; 3: 129-135
- [35] Ehrich M., Van Tassel R., Li Y., Zhou Z., Kopley C.L.: Fullerene antioxidants decrease organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition in vitro. *Toxicol. In Vitro*, 2011; 25: 301-307
- [36] Fahn S., Cohen G.: The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.*, 1992; 32: 804-812
- [37] Fatouros P.P., Corwin F.D., Chen Z.J., Broaddus W.C., Tatum J.L., Kettenmann B., Ge Z., Gibson H.W., Russ J.L., Leonard A.P., Duchamp J.C., Dorn H.C.: In vitro and in vivo imaging studies of a new endohedral metallofullerene nanoparticle. *Radiology*, 2006; 240: 756-764
- [38] Foley S., Crowley C., Smaih M., Bonfils C., Erlanger B.F., Seta P., Larroque C.: Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 294: 116-119
- [39] Grębowski J., Krokosz A.: Fullereny w radiobiologii. *Postępy Biochem.*, 2010; 56: 456-462
- [40] Grebowski J., Krokosz A., Puchala M.: Fullerol C60(OH)36 could associate to band 3 protein of human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1828: 2007-2014
- [41] Grebowski J., Krokosz A., Puchala M.: Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1828: 241-248
- [42] Greenlund L.J., Deckwerth T.L., Johnson E.M.Jr.: Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*, 1995; 14: 303-315
- [43] Grushko Y.S., Alekseev E.G., Kozlov V.S., Molkanov L.I., Wortmann G., Giefers H., Rupprecht K., Khodorkovskii M.A.: 161Dy Mössbauer study of the endohedral metallofullerenes Dy@Cn (n = 80, 82, 84). *Hyperfine Interact.*, 2000; 126: 121-126
- [44] Guirado-López R.A., Rincón M.E.: Structural and optical properties of highly hydroxylated fullerenes: stability of molecular domains on the C60 surface. *J. Chem. Phys.*, 2006; 125: 154312
- [45] Halliwell B., Gutteridge J.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press. London, 3rd ed, 1999
- [46] Hirsch A.E., Rosenstein B.S., Medich D.C., Martel C.B., Hirsch J.A.: Polymethylmethacrylate and radioisotopes in vertebral augmentation: an explanation of underlying principles. *Pain Physician*, 2009; 12: 887-891
- [47] Hotze E.M., Bottero J.Y., Wiesner M.R.: Theoretical framework for nanoparticle reactivity as a function of aggregation state. *Langmuir*, 2010; 26: 11170-11175
- [48] Huang H.M., Ou H.C., Hsieh S.J., Chiang L.Y.: Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fullerol-1, carboxylated C60 in PC12 cells. *Life Sci.*, 2000; 66: 1525-1533
- [49] Husebo L.O., Sitharaman B., Furukawa K., Kato T., Wilson L.J.: Fullerols revisited as stable radical anions. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004; 126: 12055-12064
- [50] Icević I., Bogdanović V., Zikić D., Solajić S., Bogdanović G., Djordjević A.: The influence of fullerol on the cell number, cell area, and colony forming unit ability in irradiated human erythroleukemic cell line. *Hemijaska Industrija*, 2007; 61: 167-170

- [51] Injac R., Perse M., Cerne M., Potocnik N., Radic N., Govedarica B., Djordjevic A., Cerar A., Strukelj B.: Protective effects of fullereneol C60(OH)24 against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials*, 2009; 30: 1184-1196
- [52] Injac R., Perse M., Obermajer N., Djordjevic-Milic V., Prijatelj M., Djordjevic A., Cerar A., Strukelj B.: Potential hepatoprotective effects of fullereneol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials*, 2008; 29: 3451-3460
- [53] Jeng U.S., Lin T.L., Chang T.S., Lee H.Y., Hsu C.H., Hsieh Y.W., Cantenwala T., Chiang L.Y.: Comparison of the aggregation behavior of water-soluble hexa(sulfobutyl) fullerenes and polyhydroxylated fullerenes for their free-radical scavenging activity. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 2001; 118: 232-237
- [54] Jennings L.E., Long N.J.: 'Two is better than one' - probes for dual-modality molecular imaging. *Chem. Commun.*, 2009; 24: 3511-3524
- [55] Jin H., Chen W.Q., Tang X.W., Chiang L.Y., Yang C.Y., Schloss J.V., Wu J.Y.: Polyhydroxylated C60, fullerenols, as glutamate receptor antagonists and neuroprotective agents. *J. Neurosci. Res.*, 2000; 62: 600-607
- [56] Kato H., Kanazawa Y., Okumura M., Tanimaka A., Yokawa T., Shinohara H.: Lanthanoid endohedral metallofullerenols for MRI contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003; 125: 4391-4397
- [57] Kato S., Aoshima H., Saitoh Y., Miwa N.: Highly hydroxylated or γ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: the antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and β -carotene bleaching assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 19: 5293-5296
- [58] Kim J.E., Lee M.: Fullerene inhibits β -amyloid peptide aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 303: 576-579
- [59] Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R.: Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2008; 27: 1825-1851
- [60] Kojić V., Jakimov D., Bogdanović G., Djordjević A.: Effects of fullereneol C60(OH)24 on cytotoxicity induced by antitumor drugs on human breast carcinoma cell lines. *Mater. Sci. Forum*, 2005; 494: 543-548
- [61] Kokubo K., Matsubayashi K., Tategaki H., Takada H., Oshima T.: Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups. *ACS Nano*, 2008; 2: 327-333
- [62] Komorowska M., Krokosz A., Szweda-Lewandowska Z.: Radiation damage to human erythrocytes: Influence of the composition of medium. *Radiat. Phys. Chem.*, 2007; 76: 1587-1593
- [63] Kong L., Tedrow O., Chan Y.F., Zepp R.G.: Light-initiated transformations of fullereneol in aqueous media. *Environ. Sci. Technol.*, 2009; 43: 9155-9160
- [64] Krantz A.: Red cell-mediated therapy: opportunities and challenges. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1997; 23: 58-68
- [65] Krokosz A.: Fulereny w biologii. *Postępy Biochem.*, 2007; 53: 91-96
- [66] Krokosz A., Koziczak R., Gonciarz M., Szweda-Lewandowska Z.: Study of the effect of dose-rate on radiation-induced damage to human erythrocytes. *Radiat. Phys. Chem.*, 2006; 75: 98-105
- [67] Krokosz A., Szweda-Lewandowska Z.: Changes in the activity of acetylcholinesterase and Na,K-ATPase in human erythrocytes irradiated with X-rays. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005; 10: 471-478
- [68] Krusic P.J., Wasserman E., Keizer P.N., Morton J.R., Preston K.F.: Radical reactions of C60. *Science*, 1991; 254: 1183-1185
- [69] Lai H.S., Chen W.J., Chiang L.Y.: Free radical scavenging activity of fullereneol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World J. Surg.*, 2000; 24: 450-454
- [70] Lai H.S., Chen Y., Chen W.J., Chang J., Chiang L.Y.: Free radical scavenging activity of fullereneol on grafts after small bowel transplantation in dogs. *Transplant. Proc.*, 2000; 32: 1272-1274
- [71] Laus S., Sitharaman B., Tóth E., Bolskar R.D., Helm L., Asokan S., Wong M.S., Wilson L.J., Merbach A.E.: Destroying gadofullerene aggregates by salt addition in aqueous solution of Gd@C60(OH)x and Gd@C60[C(COOH2)]10. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005; 127: 9368-9369
- [72] Leccoanet H.F., Bottero J.Y., Wiesner M.R.: Laboratory assessment of the mobility of nanomaterials in porous media. *Environ. Sci. Technol.*, 2004; 38: 5164-5169
- [73] Lee C.M., Huang S.T., Huang S.H., Lin H.W., Tsai H.P., Wu J.Y., Lin C.M., Chen C.T.: C60 fullerene-pentoxifylline dyad nanoparticles enhance autophagy to avoid cytotoxic effects caused by the β -amyloid peptide. *Nanomedicine*, 2011; 7: 107-114
- [74] Li D., Fortner J.D., Johnson D.R., Chen C., Li Q., Alvarez P.J.: Bioaccumulation of 14C60 by the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Sci. Technol.*, 2010; 44: 9170-9175
- [75] Lotharius J., Dugan L.L., O'Malley K.L.: Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 1284-1293
- [76] Luo J., Wilson J.D., Zhang J., Hirsch J.L., Dorn H.C., Fatouros P.P., Shultz M.D.: A dual PET/MR imaging nanoprobe: 124I labeled Gd3N@C80. *Appl. Sci.*, 2012; 2: 465-478
- [77] Maksin T., Djokic D., Jankovic D., Djordjevic A., Neskovic O.: Comparison of some physico-chemical parameters and biological behaviour of fullereneol labeled with technetium-99m. *J. Optoelectr. Adv. Mater.*, 2007; 9: 2571-2577
- [78] Marczak A., Jóźwiak Z.: Damage to the cell antioxidative system in human erythrocytes incubated with idarubicin and glutaraldehyde. *Toxicol. In Vitro*, 2009; 23: 1188-1194
- [79] Markovic Z., Trajkovic V.: Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60). *Biomaterials*, 2008; 29: 3561-3573
- [80] Marzatico F., Porta C., Moroni M., Bertorelli L., Borasio E., Finotti N., Pansarasa O., Castagna L.: In vitro antioxidant properties of amifostine (WR-2721, Ethylol). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2000; 45: 172-176
- [81] Menna P., Paz O.G., Chello M., Covino E., Salvatorelli E., Minotti G.: Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin. Drug Saf.*, 2012; 11 (Suppl. 1): S21-S36
- [82] Mikawa M., Kato H., Okumura M., Narazaki M., Kanazawa Y., Miwa N., Shinohara H.: Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for MRI contrast agents. *Bioconjug. Chem.*, 2001; 12: 510-514
- [83] Milic V.D., Stankov K., Injac R., Djordjevic A., Srdjenovic B., Govedarica B., Radic N., Simic V.D., Strukelj B.: Activity of antioxidative enzymes in erythrocytes after a single dose administration of doxorubicin in rats pretreated with fullereneol C60(OH)24. *Toxicol. Mech. Methods*, 2009; 19: 24-28
- [84] Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 2004; 56: 185-229
- [85] Mirkov S.M., Djordjevic A.N., Andric N.L., Andric S.A., Kostic T.S., Bogdanovic G.M., Vojinovic-Miloradov M.B., Kovacevic R.Z.: Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, C60(OH)24. *Nitric Oxide*, 2004; 11: 201-207
- [86] Nielsen G.D., Roursgaard M., Jensen K.A., Poulsen S.S., Larsen S.T.: In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2008; 103: 197-208
- [87] Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2007; 87: 315-424
- [88] Partha R., Conyers J.L.: Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int. J. Nanomedicine*, 2009; 4: 261-275
- [89] Piątek A., Dawid A., Gburski Z.: The properties of small fullereneol cluster (C60(OH)24)7: computer simulation. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2011; 79: 819-823

- [90] Pickering K.D., Wiesner M.R.: Fullerol-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.*, 2005; 39: 1359-1365
- [91] Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Godukhin O.V.: Fullerenes C60, anti-amyloid action, the brain and cognitive processes. *Biofizika*, 2010; 55: 88-94
- [92] Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G., Marsagishvili L.G., Shpagina M.D., Kaminsky Y.G., Andrievsky G.V., Klochkov V.K.: Effects of hydrated forms of C60 fullerene on amyloid 1-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007; 7: 1479-1485
- [93] Qingnuan L., Yan X., Xiaodong Z., Ruili L., Qianqian D., Xiaoguang S., Shaoliang C., Wenxin L.: Biodistribution of fullerene derivative C60(OH)x(O). *Chin. Sci. Bull.*, 2001; 46: 1615-1617
- [94] Qingnuan L., Yan X., Xiaodong Z., Ruili L., Qieqie D., Xiaoguang S., Shaoliang C., Wenxin L.: Preparation of ^{99m}Tc-C60(OH)x and its biodistribution studies. *Nucl. Med. Biol.*, 2002; 29: 707-710
- [95] Reiter R.J.: Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.*, 1995; 9: 526-533
- [96] Saitoh Y., Mizuno H., Xiao L., Hyoudou S., Kokubo K., Miwa N.: Polyhydroxylated fullerene C60(OH)₄₄ suppresses intracellular lipid accumulation together with repression of intracellular superoxide anion radicals and subsequent PPAR γ 2 expression during spontaneous differentiation of OP9 preadipocytes into adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, 2012; 366: 191-200
- [97] Schreiner K.M., Filley T.R., Blanchette R.A., Bowen B.B., Bolskar R.D., Hockaday W.C., Masiello C.A., Raebiger J.W.: White-rot basidiomycete-mediated decomposition of C60 fullerol. *Environ. Sci. Technol.*, 2009; 43: 3162-3168
- [98] Socoowski Britto R., Garcia M.L., Martins da Rocha A., Flores J.A., Pinheiro M.V., Monserrat J.M., Ferreira J.L.: Effects of carbon nanomaterials fullerene C60 and fullerol C60(OH)₁₈₋₂₂ on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. *Aquat. Toxicol.*, 2012; 114-115: 80-87
- [99] Srdjenovic B., Milic-Torres V., Grujic N., Stankov K., Djordjevic A., Vasovic V.: Antioxidant properties of fullerol C60(OH)₂₄ in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicol. Mech. Methods*, 2010; 20: 298-305
- [100] Szuławska A., Czyż M.: Molekularne mechanizmy działania antytracyklin. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 78-100
- [101] Szweda-Lewandowska Z., Krokosz A., Gonciarz M., Zajczkowska W., Puchała M.: Damage to human erythrocytes by radiation-generated HO^{*} radicals: molecular changes in erythrocyte membranes. *Free Radic. Res.*, 2003; 37: 1137-1143
- [102] Tabaczar S., Talar M., Gwoździński K.: Nitroksydy jako antyoksydanty - możliwości ich zastosowania w celach chemioprewencyjnych oraz radioprotekcyjnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 46-54
- [103] Torres V.M., Srdjenovic B., Jacevic V., Simic V.D., Djordjevic A., Simplício A.L.: Fullerol C60(OH)₂₄ prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Pharmacol. Rep.*, 2010; 62: 707-718
- [104] Trajković S., Dobric S., Djordjevic A., Dragojevic-Simic V., Milovanovic Z.: Radioprotective efficiency of fullerol in irradiated mice. *Mater. Sci. Forum*, 2005; 494: 549-554
- [105] Trajković S., Dobrić S., Jačević V., Dragojević-Simić V., Milovanović Z., Dorđević A.: Tissue-protective effects of fullerol C60(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2007; 58: 39-43
- [106] Tsai M.C., Chen Y.H., Chiang L.Y.: Polyhydroxylated C60, fullerol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1997; 49: 438-445
- [107] Uppal R., Catana C., Ay I., Benner T., Sorensen A.G., Caravan P.: Bimodal thrombus imaging: simultaneous PET/MR imaging with a fibrin-targeted dual PET/MR probe - feasibility study in rat model. *Radiology*, 2011; 258: 812-820
- [108] Vileno B., Marcoux P.R., Lekka M., Sienkiewicz A., Fehér T., Forró L.: Spectroscopic and photophysical properties of a highly derivatized C60 fullerol. *Adv. Funct. Mater.*, 2006; 16: 120-128
- [109] Vileno B., Sienkiewicz A., Lekka M., Kulik A.J., Forró L.: In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60. *Carbon*, 2004; 42: 1195-1198
- [110] White A.R., Bush A.I.: The metallobiology of Alzheimer's disease: from bench to clinic. *CML Neurology*, 2006; 22: 89-97
- [111] Wilson L.J., Cagle D.W., Thrash T.P., Kennel S.J., Mirzadeh S., Alford J.M., Ehrhardt G.J.: Metallofullerene drug design. *Coord. Chem. Rev.*, 1999; 190-192: 199-207
- [112] Xiao L., Aoshima H., Saitoh Y., Miwa N.: Highly hydroxylated fullerene localizes at the cytoskeleton and inhibits oxidative stress in adipocytes and a subcutaneous adipose-tissue equivalent. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011; 51: 1376-1389
- [113] Xiao L., Takada H., Gan X., Miwa N.: The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006; 16: 1590-1595
- [114] Xiao L., Takada H., Maeda K., Haramoto M., Miwa N.: Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxylipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes. *Biomed. Pharmacother.*, 2005; 59: 351-358
- [115] Xu J.Y., Su Y.Y., Cheng J.S., Li S.X., Liu R., Li W.X., Xu G.T., Li Q.N.: Protective effects of fullerol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Carbon*, 2010; 48: 1388-1396
- [116] Yin J.J., Lao F., Fu P.P., Wamer W.G., Zhao Y., Wang P.C., Qiu Y., Sun B., Xing G., Dong J., Liang X.J., Chen C.: The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*, 2009; 30: 611-621
- [117] Zajdel A., Wilczok A., Slowinski J., Orchel J., Mazurek U.: Aldehydic lipid peroxidation products in human brain astrocytomas. *J. Neurooncol.*, 2007; 84: 167-173
- [118] Zha Y.Y., Yang B., Tang M.L., Guo Q.C., Chen J.T., Wen L.P., Wang M.: Concentration-dependent effects of fullerol on cultured hippocampal neuron viability. *Int. J. Nanomedicine*, 2012; 7: 3099-3109
- [119] Zhang G., Liu Y., Liang D., Gan L., Li Y.: Facile synthesis of isomerically pure fullerols and formation of spherical aggregates from C60(OH)₈. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010; 49: 5293-5295
- [120] Zhang J., Fatouros P.P., Shu C., Reid J., Owens L.S., Cai T., Gibson H.W., Long G.L., Corwin F.D., Chen Z.J., Dorn H.C.: High relaxivity trivalent nitride (Gd³⁺) metallofullerene MRI contrast agents with optimized functionality. *Bioconjug. Chem.*, 2010; 21: 610-615
- [121] Zhao Q., Li Y., Xu J., Liu R., Li W.: Radioprotection by fullerols of *Stylyonchya mytilus* exposed to γ -rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2005; 81: 169-175

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.