



Anna Lichota
Anita Krokosz

FULERENOLE W TERAPII I DIAGNOSTYCE CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

FULLERENOLS IN THERAPY AND DIAGNOSIS OF CANCER

Uniwersytet Łódzki / University of Lodz, Łódź, Poland
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej / Faculty of Biology and Environmental Protection,
Department of Molecular Biophysics

STRESZCZENIE

Do głównych przyczyn zgonów w Polsce zalicza się nowotwory złośliwe. Jednym z celów współczesnych badań biomedycznych jest zmaksymalizowanie efektów działania stosowanych strategii leczniczych. Podejmowane działania doskonalące środki terapeutyczne są ukierunkowane na ograniczenie działań niepożądanych terapii przeciwnowotworowych. Innym kierunkiem badań jest poszukiwanie substancji ochronnych, które zmniejszą toksyczność leków wobec komórek prawidłowych. Nanotechnologia umożliwia projektowanie wyspecjalizowanych nanocząstek, dzięki którym możliwe będzie skuteczniejsze leczenie chorób nowotworowych, a także ich bezpieczne diagnozowanie. Nanomateriały na bazie węgla (fulereny i ich pochodne, grafen, nanorurki węglowe, nanodiamanty) stanowią obszerną grupę nanocząstek, które mają potencjalne zastosowania biomedyczne zarówno w terapii, jak i diagnostyce. Celem niniejszej pracy jest omówienie właściwości biologicznych fulerenoli w kontekście ich wykorzystania w różnych strategiach terapii przeciwnowotworowych. W pracy omówiono także możliwości jednoczesnego wykorzystania nanocząstek w terapii i diagnostyce, czyli teranostyce. Obecny stan wiedzy wskazuje, że fulereny i ich hydrofilowe pochodne, w szczególności fulerenole, wykazują niską toksyczność lub jej brak. Poprzez swoje właściwości antyoksydacyjne, a także regulując ekspresję genów zaangażowanych w proces apoptozy i angiogenezy oraz stymulowanie odpowiedzi immunologicznej, mogą przyczynić się do hamowania rozrostu guza i ochrony komórek prawidłowych. Gadolin zamknięty w klatce fulerenu jest mniej toksyczny jako środek cieniujący w rezonansie magnetycznym i może jednocześnie hamować rozwój nowotworu, co jest obiecującym wynikiem dla teranostyki. Med. Pr. 2016;67(6):817–831

Słowa kluczowe: nanotechnologia, fuleren, fulerenol, terapia przeciwnowotworowa, obrazowanie molekularne, teranostyka

ABSTRACT

Malignant tumors are one of the main causes of death in Poland. One of the objectives of contemporary biomedical research is to maximize the effects of therapeutic strategies. The actions undertaken to improve therapeutic agents are aimed at reducing the side effects of cancer treatments. Another direction of investigations is the search for protective substances that reduce the toxicity of the drug to normal cells. Carbon-based nanomaterials (fullerenes and their derivatives, graphene, carbon nanotubes, nanodiamonds) are a broad class of nanoparticles that have potential biomedical applications in both therapy and diagnostics. The aim of this paper is to review biological properties of fullereneols in the context of their use in various strategies of cancer treatments. The authors also discuss the possibility of simultaneous use of nanoparticles in therapy and diagnosis, that is, in theranostics. Current knowledge indicates that fullerenes and their hydrophilic derivatives, especially fullereneols, show low or no toxicity. They may contribute to the inhibition of tumor growth and protection of normal cells through their antioxidant properties, as well as to the regulation of expression of genes involved in apoptosis and angiogenesis, and stimulation of the immune response. Gadolinium-containing endohedral fullerenes are less toxic as contrast agents in magnetic resonance imaging, and they may also inhibit tumor growth, which is a promising result for theranostics. Med Pr 2016;67(6):817–831

Key words: nanotechnology, fullerene, fullereneol, cancer therapy, molecular imaging, theranostics

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Anita Krokosz, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, e-mail: krokosz@biol.uni.lodz.pl
Nadesłano: 8 lutego 2016, zatwierdzono: 1 kwietnia 2016

WSTĘP

Choroby nowotworowe są obecnie jednym z najpoważniejszych problemów medycyny. Do głównych przyczyn zgonów w Polsce zalicza się nowotwory złośliwe,

na które umierają nie tylko osoby starsze, ale także coraz częściej ludzie młodzi. Istnieje wiele czynników, od których zależy rozwój komórek nowotworowych w organizmie. W większości przypadków wskazuje się na: tryb życia (dietę, stres, przebyte choroby, używki,

aktywność seksualną, miejsce pracy), wiek oraz predyspozycje genetyczne [1]. Pomimo długoletnich badań nowotworów wciąż nie opracowano skutecznej metody ich leczenia. Doświadczenia pokazały, że różnorodność szlaków komórkowych, heterogenność oraz zmienność mikrośrodowiska guza mają poważne konsekwencje w terapii chorych [2].

Jednym z celów współczesnych badań biomedycznych jest zmaksymalizowanie efektów działania stosowanych strategii leczniczych. Podejmowane działania doskonalące środki terapeutyczne są ukierunkowane na ograniczenie działań niepożądanych terapii przeciwnowotworowych. Innym kierunkiem badań jest poszukiwanie substancji ochronnych, które zmniejszą toksyczny wpływ leków na komórki prawidłowe. Niestety znacznym utrudnieniem i ograniczeniem nowych związków terapeutycznych jest ich niska rozpuszczalność oraz brak stabilności chemicznej i biologicznej [2,3].

Nanotechnologia umożliwia projektowanie wyspecjalizowanych nanocząstek, dzięki którym możliwe będzie skuteczniejsze leczenie chorób nowotworowych, a także ich bezpieczne diagnozowanie [3,4]. Przewadzone badania nad właściwościami biologicznymi, chemicznymi i fizycznymi nanomateriałów przyczyniają się do rozwoju nanomedycyny. Rozmiar, kształt i struktura nanocząstek umożliwiają tworzenie wielu nowych pochodnych, które są obiektem zainteresowań badaczy na całym świecie. Nanomateriały na bazie węgla (fulereny i ich pochodne, grafen, nanorurki węglowe, nanodiamenty) stanowią szeroką grupę nanoobjektów, które mają potencjalne zastosowania biomedyczne zarówno w terapii, jak i diagnostyce [5].

Celem niniejszej pracy jest wskazanie i omówienie wykorzystania nanocząstek węglowych, pochodnych fulerenów w badaniach *in vitro* i *in vivo* dotyczących terapii przeciwnowotworowych i różnych ich strategii. Ponadto omówiono możliwości jednoczesnego wykorzystania nanocząstek w terapii i diagnostyce, czyli teranostyce.

METODY PRZEGLĄDU

W niniejszej pracy wykorzystano oryginalne prace doświadczalne i przeglądowe dotyczące właściwości fizykochemicznych i biomedycznych fulerenów oraz ich hydroksylowych pochodnych – fulerenoli. Ze względu na szerokie możliwości wykorzystania fulerenoli w biomedycynie praca dotyczy wyłącznie przeglądu najnowszych informacji o ich potencjalnych zastosowaniach w terapii i diagnostyce chorób nowotworowych, które należą do chorób cywilizacyjnych wynika-

jących z postępu technologicznego oraz zanieczyszczenia środowiska naturalnego człowieka. Oprócz specjalistycznych artykułów naukowych wykorzystano także informacje opublikowane na portalach internetowych poświęconych tematyce zdrowotnej.

Dokonano przeglądu materiałów źródłowych w języku angielskim i polskim, opublikowanych głównie w latach 2010–2015. Wykorzystano również starsze pozycje w celu dokumentacji historii odkryć w zakresie fulerenów. Piśmiennictwo wyszukiwano w następujących bazach danych: PubMed, Web of Science i Scopus. Wykorzystano również wyszukiwarkę internetową Google i usługę Google Scholar. Zastosowano następujące słowa kluczowe w języku angielskim: fullerenes, fullerenols, fullerols, hydroxyfullerenes, anthracyclines, reactive oxygen species, oxidative stress, toxicity, cytotoxicity, gadolinium, metallofullerenes, cancer, nanomedicine, therapy, diagnostics, theranostics oraz ich odpowiedniki w języku polskim.

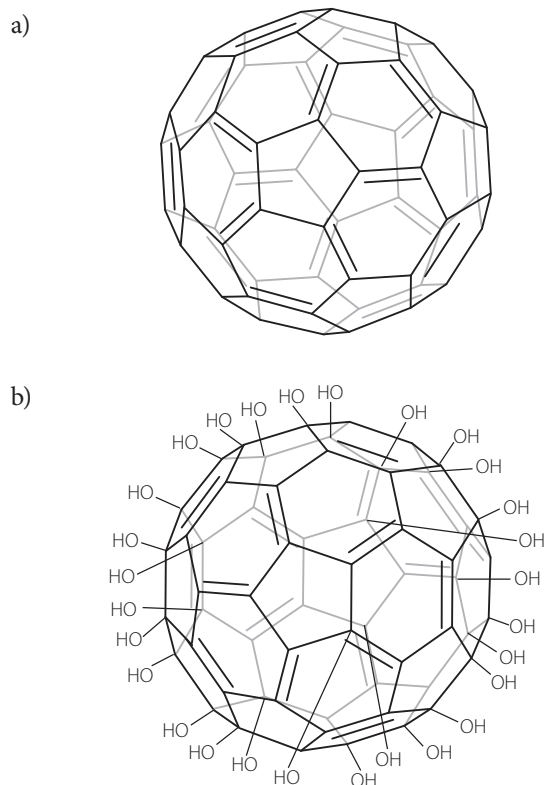
WYNIKI PRZEGLĄDU

Fulereny

Fulereny zaliczane są do nanocząstek, które stanowią alotropową odmianę węgla. Najbardziej znanym fulerem jest C_{60} , który został odkryty w 1985 r. przez 3 naukowców: Kroto, Smalleya i Curla, uhonorowanych w 1996 r. Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii za swoje badania. Nazwa ‘fulereny’ pochodzi od nazwiska znanego architekta Richarda Buckminstera Fullera, który zaprojektował kopułę o kształcie podobnym do cząsteczki fulerenu C_{60} . Najmniejszy fuleren C_{20} jest zbudowany z 20 atomów węgla ułożonych w formie dwunastościanu foremnego. Większe fulereny są zbudowane z 12 ścian w kształcie pięciokątów foremnych, tak jak C_{20} , oraz zmiennej liczby ścian w kształcie sześciokątów foremnych. Fulereny mogą być zbudowane z różnej liczby atomów węgla – m.in. można wyróżnić C_{60} , C_{70} , C_{84} , które są stabilnymi formami z pustym wnętrzem, oraz C_{82} , który jest stabilny jako endohedralny metalofuleren [6–8]. Najczęściej badany, m.in. ze względu na łatwość pozyskania i cenę, jest C_{60} [7,9–11]. Struktura geometryczna jego cząsteczki zawiera 60 atomów węgla ułożonych w 12 pierścieni pentagonalnych i 20 pierścieni heksagonalnych. Wszystkie atomy węgla są równocenne chemicznie i na widmie ^{13}C magnetycznego rezonansu jądrowego (nuclear magnetic resonance – NMR) dają jedną linię z przesunięciem chemicznym $d = 143$ ppm. Sześćdziesiąt elektronów p w C_{60} nie jest zdelokalizowanych w całej cząsteczce. Delokaliza-

cja jest ograniczona do fragmentów heksagonalnych, natomiast wiązania w pierścieniach pentagonalnych mają charakter wiązań pojedynczych. Wynika stąd różnica w długości wiązań – wiązania w pierścieniach sześciowęglowych są długości 0,1404 nm i mają charakter wiązań podwójnych, natomiast wiązania między atomami węgla z pierścieni sześci- i pięciowęglowych są długości 0,1448 nm i mają charakter wiązań pojedynczych (ryc. 1). Taka cząsteczka odpowiada kształtem piłce futbolowej, dlatego fuleren nazywany jest także „węglową piłeczką” o średnicy 0,71 nm [5]. Jeśli chodzi o właściwości fizykochemiczne, C_{60} ma charakter hydrofobowy i rozpuszcza się w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak alkany, halogenoalkany i węglowodory aromatyczne. Niestety fulereny słabo rozpuszczają się w roztworach polarnych, co stanowi poważny problem, biorąc pod uwagę ich zastosowanie w naukach biomedycznych [8].

Rozwiązaniem tego problemu mogą być modyfikacje struktury fulerenów polegające na przyłączeniu hydrofilowych grup funkcyjnych do powierzchni fulerenu, np. grup hydroksylowych, karboksylowych. Cząsteczki fulerenu mogą być także opłaszczane glikolem polietylenowym (polyethylene glycol – PEG) [9].



Ryc. 1. Budowa chemiczna a) fulerenu C_{60} i b) fulerenolu $C_{60}(OH)_{24}$
Fig. 1. Chemical structure of a) fullerene C_{60} and b) fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$

Ze względu na puste wnętrze fulerenów mogą one stanowić klatkę dla innych atomów lub cząstek. Obiecujujące w diagnostyce obrazowej są endohedralne pochodne fulerenu $C_{82} - Gd@C_{82}$ lub $Gd@C_{82}(OH)_x$ [6].

Fulerenole

Pionierem w tworzeniu hydrofilowych pochodnych fulerenów w Europie był prof. Andreas Hirsch (Uniwersytet Erlangen-Nuremberg, Niemcy). W 1994 r. Lamparth i Hirsch jako pierwsi opisali syntezę rozpuszczalnej w wodzie pochodnej fulerenu C_{60} z kwasem malonowym [11]. Natomiast Chiang i wsp. [12] w 1992 r. po raz pierwszy zsyntezowali polihydroksylową pochodną fulerenu, która była względnie dobrze rozpuszczalna w wodzie, z 14–15 grupami hydroksylowymi. Pochodną tą był fulerenol, inaczej fulerol lub polihydroksylowany fuleren (fullereneol – FUL), którego hydrofilowość zwiększa się wraz z liczbą przyłączonych grup hydroksylowych (OH).

Należy podkreślić, że w zależności od liczby grup hydroksylowych oraz ich położenia zmienia się cytotoksyczność fulerenoli. Shimizu i wsp. [13] w badaniach na 3 liniach komórek wątroby, 2 liniach nowotworowych dRLh-84 i HepG2 oraz pierwotnych hepatocytach szczura wykazali niewielką cytotoksyczność fulerenu C_{60} oraz fulerenoli $C_{60}(OH)_2$ i $C_{60}(OH)_{36}$. W przypadku $C_{60}(OH)_{6-12}$ i $C_{60}(OH)_{12}$ dochodziło do pojawienia się licznych wakuoli wokół jądra komórkowego i zahamowania aktywności mitochondriów. Wcześniejsze badania Nakagawy i wsp. [14] wskazywały, że fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ silniej działał cytotoksycznie na świeżo izolowane hepatocyty szczura niż fulerenol $C_{60}(OH)_{12}$ i fuleren C_{60} .

Kluczowym parametrem umożliwiającym podawanie i dystrybucję w układach biologicznych pochodnych fulerenów jest ich dobra rozpuszczalność w środowisku wodnym. Jeśli hydrofilowe grupy funkcyjne nie są zlokalizowane równomiernie na powierzchni klatki fulerenu, a koncentrują się w określonych miejscach (np. po 2 stronach klatki węglowej), dochodzi do powstania amfipatycznych pochodnych, tzw. amfifulerenów. Mają one zarówno właściwości hydrofobowe, jak i hydrofilowe. Takie pochodne są zdolne do łączenia się w agregaty w środowisku wodnym. Wykazano, że $C_{60}(OH)_{24}$ w roztworach wodnych tworzy agregaty i od tej zdolności zależą m.in. właściwości biologiczne fulerenoli [15].

Fulereny i ich pochodne ze względu na silne właściwości antyoksydacyjne mogą być wykorzystywane w leczeniu różnych stanów chorobowych, w tym

zaburzeń neurologicznych, naczyniowych oraz zmian nowotworowych, wykazując właściwości przeciwnowotworowe i neuroprotektoryjne [8,16]. Ich aktywność przeciwutleniająca może być kilkaset razy większa niż innych przeciwutleniaczy [17]. W warunkach zwiększonego stresu oksydacyjnego w komórkach dochodzi do nagromadzenia się reaktywnych form tlenu (RFT). Takie procesy mogą ostatecznie skutkować nieodwracalnymi zmianami i śmiercią komórkową [16].

Właściwości antyoksydacyjne fulerenoli a chemioterapia

Stres oksydacyjny jest wynikiem nieprawidłowego metabolizmu reaktywnych form tlenu w organizmie i jest uważany za jeden z głównych powodów rozwoju nowotworów. Reaktywne formy tlenu mogą reagować z różnymi cząsteczkami biologicznymi i powodować powstanie mikrośrodowiska guza [18]. Jednym ze sposobów walki z chorobami nowotworowymi jest chemioterapia, którą zalicza się do terapii systemowych. Wśród najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych znajdują się antybiotyki antracyklinowe, które od ponad 40 lat są stosowane w leczeniu różnych nowotworów [19].

Ich cytotoksyczność związana jest ze zdolnością do wywoływania uszkodzeń kwasu deoksyrybonukleinowego (deoxyribonucleic acid – DNA), inhibicji topoisomazy II, wytwarzania reaktywnych form tlenu i uszkodzania błon komórkowych. Wartość terapeutyczną antracyklin zmniejszają jednak działania niepożądane w postaci pancytopenii, kardiotoksyczności i zaburzenia czynności nerek. Kolejną przeszkodą w stosowaniu terapeutycznym leków przeciwnowotworowych jest występowanie oporności wielolekowej. Podejmowane są liczne próby zmniejszenia toksyczności antracyklin wobec komórek prawidłowych. Obejmują one optymalizację dawki, stosowanie terapii skojarzonej z przeciwutleniaczami i/lub związkami zapobiegającymi apoptozie, stosowanie systemów dostarczania leków oraz syntezę i zastosowanie mniej toksycznych analogów [20,21].

Antybiotyki antracyklinowe cechują się silnym działaniem kardiotoksycznym, które skutkuje wystąpieniem kardiomiopatii poantracyklinowej, arytmii serca, nadciśnienia tętniczego oraz ostrych i przewlekłych schorzeń układu krążenia. W mięśniu sercowym aktywność enzymów antyoksydacyjnych jest niska, co sprawia, że kardiomiocyty są bardziej narażone na stres oksydacyjny inicjowany antracyklinami. W porównaniu z wątrobą w sercu jest 150 razy mniej katalazy

(catalase – CAT) i 4 razy mniej dysmutazy ponadtlenkowej (superoxide dismutase – SOD). Dodatkowo w kardiomiocytach 40% organelli stanowią mitochondria, w których wydostanie się elektronów z łańcucha oddechowego wiąże się ze wzrostem RFT. Mitochondria w wewnętrznej błonie posiadają dehydrogenazę dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (reduced nicotinamide adenine dinucleotide – NADH), która uczestniczy w redukcji antracyklin, jednocześnie zwiększając stres oksydacyjny. Po nieodwracalnych modyfikacjach mitochondriów kardiomiocyty kierowane są na drogę apoptozy lub nekrozy. Z tego powodu jedną z przyczyn niewydolności mięśnia sercowego może być zbyt duże stężenie wolnych rodników [22].

W celu oceny zdolności do obniżania kardiotoksyczności doksorubicyny (doxorubicin – DOX) (10 mg/kg) przez fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ (50 mg/kg i 100 mg/kg) zespół Torres i wsp. [22] przeprowadził funkcjonalne, biochemiczne i strukturalne badania mięśnia sercowego na szczurach rasy Wistar. Monitorowano parametry hematologiczne i aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej). Podanie doksorubicyny prowadziło do uszkodzenia mięśnia sercowego, zaburzeń pracy serca oraz podwyższenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Po 14 dniach od podania DOX hematokryt, liczba czerwonych krwinek i zawartość hemoglobiny zmalała, natomiast liczba białych krwinek znacząco wzrosła. W przypadku grup traktowanych fulerenolem w obydwu stężeniach na 30 min przed podaniem DOX parametry te pozostały na poziomie jak u zwierząt nieleczonych antybiotykiem antracyklinowym. Badania histopatologiczne potwierdziły ochronną funkcję fulerenolu wobec komórek mięśnia sercowego i uzyskanie większej ochrony dla wyższego stężenia fulerenolu (100 mg/kg).

Oprócz dysfunkcji mięśnia sercowego badane były także zmiany zachodzące w innych narządach, takich jak: wątroba, nerki, płuca i jądra, po zastosowaniu terapii antracyklinowej. W pracy Vapa i wsp. [23] oceniono wpływ DOX (10 mg/kg) na jądra, nerki i płuca szczurów rasy Wistar po wcześniejszym podaniu fulerenolu $C_{60}(OH)_{24}$ (50 mg/kg i 100 mg/kg). Po 2 i 14 dniach od podania DOX zauważono znaczny wzrost stężenia kwasu tiobarbiturowego (thiobarbituric acid reactive substances – TBARS) we wszystkich badanych narządach, świadczący o zwiększonej peroksydacji lipidów w ich komórkach. Podanie fulerenolu na 30 min przed DOX hamowało zwiększoną peroksydację lipi-

dów w jądrach i nerkach po 14 dniach. Fulerenol o stężeniu 100 mg/kg chronił w znacznym stopniu jądra i nerki, natomiast w przypadku płuc ochrona była niewielka – około 20%.

Kojić i wsp. [24] oceniali w warunkach *in vitro* wzrost komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 pod wpływem fulerenolu $C_{60}(OH)_{24}$ o różnych stężeniach (0,9–3,9 $\mu\text{g/ml}$) i/lub leków przeciwnowotworowych, takich jak: DOX, cisplatyna (cisplatin – PT), taksol (taxol – TAX) i tiazofuryna (tiazofurin – TI). Fulerenol hamował wzrost obu linii komórkowych w niewielkim stopniu, do maksymalnie 20%. Jednocześnie nie stwierdzono genotoksyczności fulerenolu wobec obydwu linii komórkowych w zastosowanych stężeniach. Po jednoczesnym podaniu fulerenolu i DOX obserwowano obniżenie cytotoksyczności antracykliny w stosunku do obydwu linii komórkowych. Dla linii MCF-7 obniżenie cytotoksyczności DOX było praktycznie niezależne od czasu postinkubacji (24 godz., 48 godz., 96 godz.) i stężenia fulerenolu. Natomiast w przypadku linii MDA-MB-231 obniżenie cytotoksyczności było odwrotnie proporcjonalne do stężenia fulerenolu oraz malało wraz z czasem postinkubacji. Podobny efekt obserwowano dla PT dla 24 godz. i 48 godz. postinkubacji. Dla TAX i TI efekt obniżenia cytotoksyczności leków przez fulerenol był słabszy. Ochronne działanie fulerenolu było lepiej wyrażone w przypadku DOX i PT, których cytotoksyczność jest związana w dużym stopniu z syntezą RFT.

Modyfikacja mikrośrodowiska guza przez fulerenole

Mikrośrodowisko guza stanowi krytyczne miejsce inicjacji i progresji nowotworu. Kolejnym kierunkiem w terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem nanomedycyny jest projektowanie ukierunkowanej strategii leczenia, której działanie będzie polegało nie tylko na hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych, ale także na normalizowaniu mikrośrodowiska wokół guza.

Jednymi z obiecujących nanocząsteczek, pozwalającymi ograniczyć wzrost guza, są metalofulerenole z włączonym do ich wnętrza atomem gadolinu [18]. Do najczęściej badanych nanocząsteczek należy $Gd@C_{82}(OH)_{22}$. W skład tej cząsteczki wchodzi atom gadolinu, który jest zamknięty wewnątrz węglowej klatki fulerenolu. Gadolin jest metalem należącym do grupy lantanowców i wykorzystywanym do obrazowania metodą jądrowego rezonansu magnetycznego (magnetic resonance imaging – MRI). Gadolin w postaci wolnej (Gd^{3+}) jest silnie toksyczny, dlatego stosuje się

go w postaci różnych chelatów. W organizmie chelaty dysocjują i uwalniają wolne jony gadolinu. Sprzyja temu obecność jonów żelaza. Sugeruje się, że podawanie chelatów gadolinu prowadzi do ciężkiej, postępującej choroby związanej z uszkodzeniem nerek – nerko-pochodnego włóknienia układowego (nephrogenic systemic fibrosis – NSF). Wolny gadolin odkłada się w wątrobie, mózgu, kościach i węzłach chłonnych, prowadząc do aktywacji komórek dendrytycznych (CD68+), które, uwalniając czynnik wzrostu TGF- β 1, stymulują procesy włóknienia. Według innej teorii makrofagi fagocytują Gd^{3+} i uwalniają cytokiny prozapalne, które również stymulują procesy włóknienia. Początkowo sądzono, że nadmiernemu włóknieniu ulega wyłącznie skóra. Stwierdzono jednak, że oprócz skóry włóknieniu mogą ulec także inne narządy, w tym mięśnie szkieletowe, płuca, wątroba i serce. Tylko skóra głowy pozostaje bez zmian [25,26].

Zamknięcie jonu gadolinu w klatce fulerenu C_{82} lub jego hydroksylowej pochodnej $C_{82}(OH)_x$ było obiecującym krokiem w kierunku obniżenia toksyczności tego pierwiastka, z zachowaniem zdolności cieniujących w MRI. Początkowo $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ był badany jako środek cieniujący. Zauważono jednak, że ten endohedralny fuleren jest w stanie hamować powstawanie przerzutów i wzrost różnych typów nowotworów [27]. Ta pochodna, w przeciwieństwie do leków przeciwnowotworowych działających cytotoksycznie, nie niszczy komórek nowotworowych, lecz hamuje wzrost guza i powstawanie przerzutów. Badania histopatologiczne wykazały, że $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ nie powodował zmian w wątrobie, śledzionie, nerkach, sercu, mózgu i płucach myszy. Skuteczność leczenia guza piersi myszy tą pochodną fulerenu była znacznie wyższa niż powszechnie stosowanych leków, np. paklitakselu. Wykazano, że wysoka skuteczność przeciwnowotworowa $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ nie wynikała z klasycznych efektów cytotoksycznych, lecz regulacji mikrośrodowiska guza. Zaobserwowano także, że migracja komórek śródbłonna naczyń włosowatych w warunkach *in vitro* była tłumiona o ponad 80%, a gęstość naczyń włosowatych w guzach zmniejszyła się o ponad 40% [18].

Hamowanie procesu angiogenezy staje się ważnym elementem strategii w walce z chorobami nowotworowymi. Proces tworzenia naczyń krwionośnych wokół guza zapewnia komórkom tlen i składniki odżywcze niezbędne do jego wzrostu oraz powstawania przerzutów. Po dootrzewnowym podaniu myszom z nowotworem sutka (myszy z defektem immunologicznym BALB/c) fulerenolu $C_{60}(OH)_{20}$ zaobserwowano

obniżenie o 20–40% czynników stymulujących angiogenezę, takich jak: czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor alfa – TNF- α), płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor – PDGF) i czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego (vascular endothelial growth factor – VEGF). Poziom ekspresji VEGF wpływa na szybkość wzrostu guza i jego unaczynienie oraz proces przerzutowania. Czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego produkowany przez komórki guza pobudza wszystkie krytyczne dla angiogenezy czynniki, takie jak proliferacja, migracja i adhezja. Fulerenol podany w dawce 2 mg/kg

zmniejszał o połowę ekspresję informacyjnego kwasu rybonukleinowego (messenger ribonucleic acid – mRNA), PDGF i TNF- α , nie wpływał natomiast na ekspresję mRNA VEGF. Sugeruje to, że obniżenie poziomu VEGF jest wynikiem przeciwutleniającego działania fulerenolu. Ponadto zaobserwowano pęcznienie mitochondriów, uszkodzenia grzebieni mitochondrialnych oraz kondensację chromatyny na brzegu jąder komórkowych w komórkach guza. Sugeruje to, że polihydroksylowany fuleren może indukować apoptozę komórek nowotworowych i zmniejszać gęstość naczyń krwionośnych wokół guza [7,28].

Tabela 1. Efekty biologiczne metalofulerenolu Gd@C₈₂(OH)₂₂
Table 1. Biological effects of metallofullerenol Gd@C₈₂(OH)₂₂

Układ badawczy System	Efekt działania Gd@C ₈₂ (OH) ₂₂ Effect of Gd@C ₈₂ (OH) ₂₂	Piśmiennictwo References
Komórki raka płuc człowieka linia A549 / Human lung adenocarcinoma A549 cells line	↓ wytwarzania RFT i ochrona przed uszkodzeniem oksydacyjnym mitochondriów / / reduced H ₂ O ₂ -induced ROS formation and mitochondrial damage	30
Komórki śródbłonnka mózgowych naczyń włosowatych szczura / Rat brain capillary endothelial cells		
Nagie myszy z nowotworem (BALB/c) / Tumor-bearing nude mice (BALB/c)	skuteczny zmiatacz wolnych rodników / scavenges ROS directly hamowanie peroksydacji lipidów / inhibition of lipid peroxidation ↓ śmiertelności myszy przy stężeniu 2,5 μ mol/kg / ↓ mortality of mice at 2.5 μ mol/kg	30
Myszki C57BL/6 / Mice C57BL/6	zahamowanie rozrostu guza / inhibition of the tumor growth immunomodulacyjne działanie na komórki T i makrofagi / an immunomodulatory effect on T cells and macrophages ↑ produkcji cytokin Th1 / an increase in the production of Th1 cytokines ↓ produkcji cytokin Th2 / a decrease in the production of Th2 cytokines brak toksyczności systemowej przy stężeniu 0,5 μ mol/kg / no systemic toxicity at 0.5 μ mol/kg	29
Nagie myszy z guzem raka prostaty opornym na cisplatinę / Nude mice with prostate cancer tumor resistant to cisplatin (CP-r)	↑ wewnątrzkomórkowego gromadzenia się cisplatin i tworzenie adduktów cisplatin-DNA / / enhanced intracellular accumulation of cisplatin and formation of cisplatin-DNA adducts ↓ przeżycia komórek CP-r i zahamowanie rozrostu guza / a decrease in the number of surviving CP-r cells and inhibited growth of the CP-r tumor	31
Nagie myszy z guzem raka sutka (z komórek linii MCF-7) lub raka trzustki (linia JF305) / Human breast cancer (MCF-7 cell line) or pancreatic cancer (JF305 cell line) bearing nude mice	zahamowanie angiogenezy, zmniejszenie gęstości naczyń wokół guza / inhibition of angiogenesis, decreased tumor microvessel density ↓ ponad 10 czynników angiogennych na poziomie mRNA / down regulation of more than 10 angiogenic factors in the mRNA level ↓ angiogenezy poprzez zahamowanie ekspresji i aktywności MMP-2 i MMP-9 / suppressed angiogenesis via potently reducing MMP-2 and MMP-9 expression and activity brak efektów ubocznych przy stężeniu 2,5 μ mol/kg (masa ciała, parametry biochemiczne) / / not pronounced side effects in nanoparticle-treated mice at 2.5 μ mol/kg (body weight, blood biochemical parameters) efekty działania porównywalne z paklitaksem / effects comparable to the anticancer drug paclitaxel	7, 32
Nicień / Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	dobra tolerancja metalofulerenolu / good tolerance of metallofullerenol brak wpływu na długość życia, odporność na stres, rozwój i zachowanie zarówno dorosłych, jak i młodych osobników / no apparent toxic effects on longevity, stress resistance, growth and behaviors in both adult and young worms	33

Ważnym sposobem walki z chorobami nowotworowymi może być stymulacja układu odpornościowego. Metalofulerenol $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ może stymulować odpowiedź immunologiczną poprzez aktywację limfocytów T i makrofagów, które uwalniają szereg cytokin: interleukiny-2 (IL-2), IL-4, IL-5, interferon gamma (INF- γ) i TNF- α , a następnie aktywują ścieżki sygnałowe prowadzące do apoptozy komórek nowotworowych [4,29].

W tabeli 1. przedstawiono szczegółowe efekty działania metalofulerenolu $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ na rozwój guzów nowotworowych u myszy laboratoryjnych przy braku toksyczności dla myszy oraz modelowego organizmu – niepaszożytniczego nicienia glebowego *Caenorhabditis elegans*.

Toksyczność fulerenoli

Większość opublikowanych badań dowodzi, że fulerenole są nanocząstkami niewykazującymi cytotoksyczności nawet w wysokich stężeniach. Pojawiają się jednak doniesienia, że fulerenole mogą mieć właściwości cytotoksyczne [34–37]. Czynniki, które mogą warunkować cytotoksyczność, są: złożona struktura nanocząstek i ich zdolność do zmiatania lub generowania RFT np. pod wpływem światła, różnice w wielkości, kształcie, metodzie produkcji i obecności zanieczyszczeń. Ocenę cytotoksyczności fulerenolu $C_{60}(OH)_x$ ($x = 22; 24$) po 48 godz. inkubacji prowadzono na 3 liniach komórkowych CHO, CHL i L929. Wykazano, że fulerenol ma wysoką toksyczność dla linii CHL i CHO, ale nie ma wpływu na linię L929. Może to oznaczać, że cytotoksyczność jest swoista dla danego typu komórek. Fulerenol $C_{60}(OH)_x$ ($x = 22; 24$) blokował również fazę G1 cyklu komórkowego [35].

Doświadczenia przeprowadzone przez zespół Yamawakiego i wsp. [36] wskazują, że fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ w stężeniach do 100 $\mu\text{g/ml}$ uwalnia dehydrogenazę mleczanową (lactate dehydrogenase – LDH) z komórek śródbłonna żyły pępowinowej człowieka (human umbilical vein endothelial cells – HUVEC) inkubowanych z fulerenolem przez 24 godz. W cytozolu komórek tworzyły się wakuole i spadała koncentracja komórek wraz ze wzrostem stężenia fulerenolu. Ustalono także, że fulerenol nie indukował procesu apoptozy, natomiast powodował akumulację poliubikwitynowanych białek w komórkach oraz nasilał autofagię.

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ w stężeniu 50 μM powodował powstanie pęcherzyków na powierzchni hepatocytów szczura, zmniejszenie stężenia adenosynotrójfosforanu (adenosine triphosphate – ATP), zredukowanego glu-

tationu (reduced glutathione – GSH), obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego, a także fragmentację DNA [38]. Miejscami docelowymi hydroksylowanego fulerenolu były jądra komórkowe i mitochondria. Toksyczny wpływ fulerenolu $C_{60}(OH)_{44}$ w stężeniach od 25 mg/l na izolowane mitochondria wykazali ostatnio Yang i wsp. [39].

Jung i wsp. [40] oraz Cong i wsp. [17] w najnowszych badaniach stwierdzili, że fulerenol nie jest toksyczny wobec *Caenorhabditis elegans*. Organizm ten należy do niepaszożytniczych nicieni występujących w glebach klimatu umiarkowanego i jest zaliczany do organizmów modelowych ze względu na znajomość jego genomu i konektomu. Cytowane badania dowodzą, że stężenia fulerenolu w zakresie 50–130 mg/l nie wpływają na obniżenie żywotności *C. elegans*. Jednak wcześniejsze badania Cha i wsp. [41] wskazują, że fulerenol prowadzi do skrócenia długości życia, obniżenia zdolności reprodukcyjnych oraz zmniejszenia wielkości ciała w wyniku inicjowania śmierci apoptotycznej komórek nicienia przy stężeniach powyżej 10 mg/l.

Różnice w toksyczności fulerenoli wynikają prawdopodobnie z odmiennych właściwości fizykochemicznych nanocząstek. Brakiem toksyczności charakteryzował się fulerenol o średniej wielkości cząsteczki około 150 nm, natomiast efekty toksyczne obserwowano dla fulerenolu o średnicach nanocząstek ok. 5 nm i 40 nm.

W tabelach 2–4. przedstawiono szczegółowe efekty działania fulerenoli o różnym stopniu hydroksylacji w różnych układach biologicznych.

Podsumowując, efekty cytotoksyczne fulerenoli w badaniach *in vitro* zależą od liczby grup –OH i stopnia agregacji nanocząstek oraz linii komórkowej. Zakres stężeń, dla których nie obserwuje się efektów cytotoksycznych, jest bardzo szeroki, od 8 mg/l [47] do nawet 1000 mg/l [35]. Przedstawione wyniki wskazują także, że większą wrażliwością na fulerenol charakteryzują się komórki nowotworowe, co jest obiecujące w aspekcie zastosowań w terapii przeciwnowotworowej.

W warunkach *in vivo* także występują różnice w toksyczności fulerenolu. Stężenia poniżej 0,1 mg/kg wydają się bezpieczne na podstawie przytoczonych danych literaturowych. Ponadto w warunkach stresu oksydacyjnego fulerenol wykazuje właściwości ochronne.

Teranostyka w nanomedycynie

W ciągu ostatnich lat podjęto działania mające na celu monitorowanie efektywności leczenia chorób nowotworowych, reakcji chorego na przyjmowane leki,

Tabela 2. Efekty biologiczne działania fulerenoli na komórki prawidłowe
Table 2. Biological effects of fullereneols in normal cells

Fulerenol Fullerenol	Komórki prawidłowe Normal cell line	Efekt działania fulerenoli Effect of fullereneols	Piśmiennictwo References
C ₆₀ (OH) ₁₂₋₁₈	fibroblasty płuc człowieka (linia IMR-90) / human lung fibroblasts (IMR-90 cell line)	brak genotoksyczności (test mikrojądrowy, kometowy i γ -H2AX) / no genotoxicity (micronucleus test, comet assay and γ -H2AX foci formation) ↓ cytotoksyczności i genotoksyczności wywołanej przez insektycyd acetamid / reduced cytotoxicity and genotoxicity of acetamid	42
C ₆₀ (OH) ₂₂₋₂₆	komórki nabłonka soczewki oka człowieka (linia HLE B-3) / human lens epithelial cells (HLE B-3 cell line)	cytotoksyczność (↑ uwalniania LDH i MTS) / cytotoxicity (increase in LDH release and MTS assay) fototoksyczność / phototoxicity aktywacja kaspazy 3 – indukcja apoptozy / caspase-3 activation – induction of apoptosis	37
C ₆₀ (OH) ₂₄	keratynocyty człowieka (linia HaCaT) / human keratinocytes (HaCaT cell line)	brak wpływu na żywotność (do 50 μ M) / no toxicity (up to 50 μ M) ↓ aktywności mitochondriów w obecności światła (fototoksyczność) / loss of mitochondrial activity in the presence of light (phototoxicity)	43
C ₆₀ (OH) ₂₄	komórki śródbłonka żyły pępowinowej człowieka / human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	cytotoksyczność w zakresie wysokich stężeń (do 100 mg/l) / cytotoxic injury at high doses (up to 100 mg/l): tworzenie się wakuoli w cytozolu / cytosolic vacuole formation uwalnianie LDH / LDH release hamowanie proliferacji / inhibited cell growth akumulacja poliubikwitynowanych białek w komórkach / accumulation of polyubiquitinated proteins autofagia / facilitated autophagy ↑ ekspresji ICAM-1 (CD54) i czynnika tkankowego (CD142) / increased cell surface expression of ICAM-1 (CD54) and tissue factor (CD142) ekspozycja fosfatydylseryny (PS) na zewnętrznej powierzchni błony / increased exposure of phosphatidylserine (PS) on the outer surface of the plasma membrane blokowanie cyklu komórkowego w fazie G1 i indukowanie apoptozy / G1 arrest and induced apoptosis ↑ stężenia jonów wapnia (Ca ²⁺) w komórkach / elevation of intracellular calcium Ca ²⁺	36, 44
C ₆₀ (OH) ₂₄	komórki jajnika chomika chińskiego (CHO-K1) / Chinese hamster ovary cells (CHO-K1)	↓ stresu oksydacyjnego indukowanego mitomycyną C / reduced mitomycin C-induced oxidative stress nieznaczne zaburzenia metabolizmu komórkowego / moderately disturbed cellular metabolism	45
C ₆₀ (OH) ₂₄	wyspy erytroblastyczne szpiku kostnego szczurów / rat erythroblastic islets of the bone marrow	hamowanie proliferacji komórek erytroidalnych / inhibition of proliferation opóźnianie dojrzewania erytroblastów / delays in erythroblast maturation osłabienie asocjacji komórek progenitorowych szeregu erytrocytów z centralnymi makrofagami / suppressed association of CFU-E (colony forming unit – erythroid) with residual macrophages	46
C ₆₀ (OH) ₂₄	świeżo izolowane hepatocyty szczura / freshly isolated rat hepatocytes	indukcja reaktywnych form tlenu / induction of reactive oxygen species powstawanie pęcherzyków na powierzchni komórek / formation of cell surface blebs ↓ poziomu komórkowego ATP i zredukowanego glutationu / loss of cellular levels of ATP and reduced glutathione indukcja fragmentacji DNA / induction of DNA fragmentation uszkodzenie błon mitochondriów (spadek potencjału błonowego) / loss of mitochondrial membrane potential	38
C ₆₀ (OH) ₂₀ C ₆₀ (OH) ₂₄ C ₆₀ (OH) ₃₂	pierwotne noworodkowe keratynocyty człowieka / primary neonatal human epidermal keratinocytes (HEK)	fulerenole o różnym stopniu hydroksylacji nie są cytotoksyczne i nie wywołują stanu zapalnego do stężenia 8,55 mg/l / different hydroxylation of fullerenes caused no cytotoxicity or inflammation up to 8.55 mg/l	47

Tabela 2. Efekty biologiczne działania fulerenoli na komórki prawidłowe – cd.
Table 2. Biological effects of fullereneols in normal cells – cont.

Fullerenol Fullerenol	Komórki prawidłowe Normal cell line	Efekt działania fulerenoli Effect of fullereneols	Piśmiennictwo References
C ₆₀ (OH) ₃₆	eryocyty człowieka / / human erythrocytes	wiązanie fulerenolu z białkami cytoszkieletu (białkami pasma 3 i ATP-azami) / fullereneol attachment to cytoskeletal proteins (the band 3 protein and membrane ATPases) ochrona przed degradacją białka pasma 3 / prevented degradation of the band 3 protein nieznacznie zmieniona morfologia (transformacja echinocytna) dla dużych stężeń (powyżej 100 mg/l) / slightly changed morphology of the cells (echinocytic transformation) at high concentrations (above 100 mg/l) nieodwracalna inhibicja ATP-az jonozależnych / irreversible ion-dependent ATPases inhibition	48

LDH – dehydrogenaza mleczanowa / lactate dehydrogenase, MTS – badanie aktywności metabolicznej / metabolic activity assay, ICAM-1 – cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 / intercellular adhesion molecule 1, ATP – adenylozotrójfosforan / adenosine triphosphate, DNA – kwas deoksyrybonukleinowy / deoxyribonucleic acid.

Tabela 3. Efekty biologiczne działania fulerenoli na komórki nowotworowe
Table 3. Biological effects of fullereneols in cancer cells

Fullerenol Fullerenol	Komórki nowotworowe Cancer cell line	Efekt działania fulerenoli Effect of fullereneols	Piśmiennictwo References
C ₆₀ (OH) ₂₀	komórki linii MCF-7 raka piersi człowieka / human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line	↓ stężenia TNF-α, PDGF i VEGF / tumor TNF-α, PDGF and VEGF levels decreased significantly uszkodzenie mitochondriów i kondensacja chromatyny na brzegu jąder komórek MCF-7 / mitochondria damaged and chromatin concentrated at the margins of the nuclei MCF-7	28
C ₆₀ (OH) ₂₀	komórki raka piersi EMT-6 <i>in vivo</i> / murine mammary carcinoma cells EMT-6 <i>in vivo</i>	nieznaczne spowolnienie rozrostu guza i znaczące ograniczenie migracji komórek nowotworowych / slight inhibition of the tumor growth and significant suppression of the migration of cancer cells ↓ stężenia czynników angiogennych: TNF-α, PDGF i VEGF / inhibition of angiogenic factors: TNF-α, PDGF and VEGF ↓ gęstości naczyń wokół guza / reduction of tumor vascularization	28
C ₆₀ (OH) ₂₄	komórki białaczkowe K562 / leukemic K562 cells	komórki białaczkowe stają się bardziej wrażliwe na radioterapię pod wpływem fulerenolu / sensitization of leukemic cells to ionizing radiation upon fullereneol treatment nadekspresja Bcl-2, Bcl-xL i genów GSTA4, MnSOD, NOS, CAT i HO-1 / overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL, and cytoprotective genes: GSTA4, MnSOD, NOS, CAT and HO-1	49
C ₆₀ (OH) ₂₄	komórki raka płuc A549 / lung carcinoma A549 cells	↑ poziomu fosforylacji p38 MAPK, ERK1/2 i JNK / increased level of p38 MAPK, ERK1/2 and JNK phosphorylation ↓ poziomu apoptozy inicjowanej nadtlakiem wodoru / attenuation hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death ↑ zdolności antyoksydacyjnej regulowanej Nrf2/HO-1 / augmentation of Nrf2/HO-1-regulated cellular antioxidant capacity	16
C ₆₀ (OH) ₂₄	komórki raka wątrobowokomórkowego SMCC-7721 / hepatocellular carcinoma SMCC-7721 cells	↓ sztywności cytoszkieletu / decrease in elasticity zmiany morfologiczne / cellular morphological changes ↓ zdolności adhezyjnych komórek / probability of adhesion decreases significantly	50, 51

TNF-α – czynnik martwicy nowotworu / tumor necrosis factor alpha, PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu / platelet-derived growth factor, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonki naczyniowej / vascular endothelial growth factor.

Tabela 4. Efekty biologiczne działania fulerenoli w warunkach *in vivo*
Table 4. Biological effects of fullererenols in *in vivo* systems

Fulerenol Fullerenol	Organizm Organism	Efekt działania fulerenoli Effect of fullererenols	Piśmiennictwo References
$C_{60}(OH)_{3-24}$	szczury Sprague-Dawley: krew, wątroba, nerki / / Sprague-Dawley rats: blood, liver, kidney	łagodzenie hepatotoksyczności i nefrotoksyczności wywołanej stresem oksydacyjnym po podaniu CCl_4 określone na podstawie aktywności ALT i AST oraz stężenia azotu mocznikowego i kreatyniny w surowicy / protection of liver and kidney from CCl_4 -induced oxidative stress on the basis of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, creatinine and blood urea nitrogen contents ↑ stosunku GSH/GSSG w wątrobie / increase in the ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione ↓ stopnia martwicy i stłuszczenia wątroby (dotyczy zmian makroskopowych i histopatologicznych) / alleviated necrosis and steatosis of liver (macroscopic and histopathological changes) łagodzenie zmian histopatologicznych w nerkach / mitigation of histopathological changes in the kidneys histopatologiczny wygląd kłębuszków i kanalików nerkowych w normie po zastosowaniu samego fulerenolu / normal appearances of the glomeruli and renal tubules after fullererenol alone treatment	52
$C_{60}(OH)_{24}$	samce szczurów Wistar / / male Wistar rats	↓ aktywności izoform cytochromu P450 CYP1A1 i CYP1A2 (dawka 0,1 mg/kg) / / a decrease in activity of cytochrome P450 CYP1A1 and CYP1A2 isoform at a dose of 0.1 mg/kg ↑ aktywności izoform cytochromu P450 CYP1A1 i CYP1A2 (dawka 10 mg/kg) / / an increase in activity of cytochrome P450 CYP1A1 and CYP1A2 isoform at a dose of 10 mg/kg ↑ aktywności GST (dawka 1 i 10 mg/kg) / an increase in glutathione transferase activity (at 1 and 10 mg/kg) ↓ zawartości koniugatów dienowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w osoczu (dawka 0,1 i 1 mg/kg) / a decrease in the content of diene conjugates of polyunsaturated fatty acids (at 0.1 and 1 mg/kg) ↓ aktywności GSR w erytrocytach (dawka 0,1 i 1 mg/kg) / a decrease in glutathione reductase activity in erythrocytes (at 0.1 and 1 mg/kg) ↓ średniego stężenia hemoglobiny w erytrocytach / a decrease in mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in erythrocytes	10
$C_{60}(OH)_{18-22}(OK_4)$	danio pręgowany / zebrafish <i>Danio rerio</i> mózg / brain	↑ ekspresji genów AChE, GCLC i GCLR / increase in AChE, GCLC and GCLR gene expression	53
$C_{60}(OH)_{24}$	żółta rybka / fathead minnow <i>Pimephales promelas</i>	zmiany histopatologiczne w tkance śródmiąższowej nerek / histopathological changes observed as loss of cellularity in the interstitium of the kidney utrata wewnątrzkomórkowego glikogenu w wątrobie / loss of intracytoplasmic glycogen in the liver	54
$C_{60}(OH)_{19-24}$	nicień / nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	↓ długości życia, reprodukcji i wielkości ciała / shortened lifespan, reproduction rate and body size zaburzenia układu trawienia / disorder of the digestion system ↑ śmierci apoptotycznej / induction of apoptotic cell death	41
$C_{60}(OH)_{n > 36}$	nicień / nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	brak toksyczności / no toxic effect tłumienie endogennego poziomu RFT / attenuation of endogenous levels of reactive oxygen species zapewnianie ochrony w warunkach stresu oksydacyjnego poprzez regulację genów zależnych od DAF-16 / protection from stress conditions in a DAF-16-dependent manner w warunkach stresu oksydacyjnego zwiększona ekspresja SOD-3 i HSP-16.2 / / up-regulation of SOD-3 and HSP-16.2 protein expression under stress conditions	17

ALT – aminotransferaza alaninowa / alanine aminotransferase, AST – aminotransferaza asparaginianowa / aspartate aminotransferase, GSH – zredukowany glutation / reduced glutathione, GSSG – dwusiarczek glutationu / glutathione disulfide, GST – S-transferaza glutationowa / glutathione S-transferase, GSR – reduktaza glutationowa / glutathione reductase.

a także mierzenia rzeczywistego czasu akumulacji terapeutycznego w komórkach [55]. Do tego celu potrzebne są trwałe, kontrolowane i ukierunkowane systemy dostarczania środków diagnostycznych i terapeutycznych. Z tego powodu opracowano nowy sposób leczenia chorób oparty na jednoczesnym połączeniu terapii i diagnostyki – teranostykę (thera(py) + (diag)nostics) [56,57].

Nanoteranostyka jest kolejnym punktem zaawansowanego rozwoju współczesnej nanomedycyny. Opiera się ona na wykorzystaniu nanocząstek do szybkiej diagnostyki, skutecznej terapii i możliwości zahamowania choroby na poziomie komórkowym i molekularnym.

Cechy, jakie powinna posiadać idealna nanocząstka stosowana w nanoteranostyce, to:

- szybkie i selektywne gromadzenie się w miejscu docelowym,
- sprawne dostarczanie odpowiedniej dawki leku bez wpływu na zdrowe narządy,
- informowanie o cechach morfologicznych i biochemicznych miejsca choroby,
- szybkie usuwanie z organizmu lub łatwa biodegradacja do nietoksycznych produktów,
- bezpieczeństwo stosowania u ludzi.

Mimo opracowania tak wielu rodzajów nanocząstek nadal żadna z nich nie spełnia wszystkich tych kryteriów [58].

Najnowsze badania [59] prowadzono z wykorzystaniem 3 nowych koniugatów rapamycyny (rapa), leku przeciwnowotworowego, który funkcjonalizowano trastuzumabem (Tmab): Tmab-QD-rapa-NPs, Tmab-rapa-NPs i rapa-NPs. Trastuzumab jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym łączącym się swoiście z receptorem ludzkiego nabłonkowego czynnika wzrostu 2 (human epidermal growth factor 2 – HER2), którego nadekspresja często występuje w komórkach raka piersi. W skład badanych koniugatów wchodziły ponadto: kropki kwantowe (quantum dots – QD) i nanocząstki na bazie lipidów (lipid based nanoparticles – NPs). Eksperymenty miały na celu ocenę wpływu badanych koniugatów na komórki raka piersi linii SKBR 3 i MDA-MB-231. Koniugaty Tmab-rapa-NPs i rapa-NPs były odpowiednio 11 razy i 4 razy skuteczniejsze niż natywna rapamycyna w komórkach linii SKBR 3. W przypadku komórek MDA-MB-231 działanie nowych koniugatów było 2 razy efektywniejsze. Koniugat Tmab-rapa-NPs zmniejszał ekspresję p-Akt, p-mTOR, p-p70S6K1, p-4E-BP1 i p-Stat-3 oraz białek antyapoptotycznych Bcl-2 i c-Myc w komórkach SKBR3.

Obrazowanie konfokalne komórek w hodowli trójwymiarowej traktowanych koniugatem Tmab-QD-

-rapa-NPs dawało intensywniejszą fluorescencję niż przy użyciu nieskoniugowanego QD-rapa-NPs.

Skoniugowanie rapamycyny z Tmab-NPs poprawiło indeks terapeutyczny rapamycyny i umożliwiło połączenie ze środkiem obrazującym QD605. Badania te dają nadzieję na skuteczne połączenie terapii celowanej z obrazowaniem zmienionej nowotworowo tkanki. Nowe nanoteranostyki są w stanie odgrywać ważną rolę w leczeniu i diagnozowaniu chorób nowotworowych.

Nanokompozyt C_{60} -IONP-PEG-FA zbudowany z fulerenu C_{60} pokrytego nanocząstkami tlenku żelaza (iron oxide nanoparticles – IONP), otoczony cząsteczkami glikolu polietylenowego (PEG2000) i kwasu foliowego (folic acid – FA) jest obiecującą nanocząstką do zastosowania jako uczulacz w metodzie radiotermoablacji i terapii fotodynamicznej, ale również jako środek kontrastowy w obrazowaniu rezonansem magnetycznym [60]. Badania prowadzone *in vitro* na komórkach raka piersi MCF-7 i *in vivo* na myszach BALB/c z mięsakiem S180 wykazały niską toksyczność nanokompozytu C_{60} -IONP-PEG-FA. Żywotność komórek obniżała się maksymalnie o 15%. Nanokompozyt z przyłączonym kwasem foliowym akumulował się głównie w jądrach komórkowych z wydajnością wyższą niż C_{60} -IONP-PEG. Ukierunkowanie nanokompozytu za pomocą kwasu foliowego na komórki nowotworowe spowodowało zwiększenie wydajności zarówno terapii fotodynamicznej, jak i radiotermoablacji, a także kontrastu w rezonansie magnetycznym. Fuleren C_{60} jest odpowiedzialny za właściwości fotouczulające w terapii fotodynamicznej i uczulające w radiotermoablacji. Obecność nanocząstek tlenku żelaza nadaje nanokompozytowi właściwości magnetyczne niezbędne w obrazowaniu rezonansem jądrowym. Nanokompozyt C_{60} -IONP-PEG-FA jest bardzo obiecującą cząsteczką w teranostyce nowotworów.

WNIOSKI

Obecny stan wiedzy wskazuje, że fulereny i ich hydrofilowe pochodne, w szczególności fulerenole, charakteryzują się niską toksycznością własną lub praktycznie jej brakiem. Właściwości fizykochemiczne i biologiczne fulerenoli, czyli hydroksyfulerenów, zależą od liczby grup hydroksylowych przyłączonych do klatki węglowej oraz od ich rozmieszczenia przestrzennego na jej powierzchni. Przegląd dostępnej literatury wskazuje, że w zastosowaniach biomedycznych znaczenie mają fulerenole wysokohydroksylowane, bardzo dobrze rozpuszczalne w roztworach wodnych i nietoksyczne dla większości linii komórkowych. Istnieją jednak donie-

sienia wskazujące na możliwą cytotoksyczność fulerenoli wobec wybranych linii komórkowych.

Fulereny i fulerenole poprzez swoje właściwości antyoksydacyjne, a także regulujące ekspresję genów zaangażowanych w proces apoptozy, angiogenezy oraz stymulowanie odpowiedzi immunologicznej, mogą przyczyniać się do hamowania rozrostu guza i ochrony komórek prawidłowych. Wykazano także, że jon gadolinu zamknięty w klatce fulerenu jest mniej toksyczny jako środek cieniujący w rezonansie magnetycznym niż stosowane obecnie kompleksy gadolinu i może jednocześnie hamować rozwój nowotworu, co jest obiecującym wynikiem dla teranostyki.

Zastosowania teranostyczne nanocząstek są obecnie intensywnie badane i możliwe, że złożone nanocząstki znajdą zastosowanie w terapii celowanej połączonej z obrazowaniem postępów leczenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Tuchowska P., Worach-Kardas H., Marcinkowski J.: Najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce – główne czynniki ryzyka i możliwości optymalizacji działań profilaktycznych. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2013;94(2):166–171
2. Balogh L.P.: Caging cancer. *Nanomedicine* 2015;11(4):867–869, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.005>
3. Talevi A., Gantner M.E., Ruiz M.E.: Applications of nanosystems to anticancer drug therapy (Part I. Nanogels, nanospheres, nanocapsules). *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2014;9(1):83–98, <http://dx.doi.org/10.2174/1574891X113089990035>
4. Li X.H., Zhang C., le Guyader L., Chen C.Y.: „Smart” nanomaterials for cancer therapy. *Sci. China Chem.* 2010;53(11):2241–2249, <http://dx.doi.org/10.1007/s11426-010-4122-9>
5. Melanko J.B., Pearce M.E., Salem A.K.: Nanotubes, nanorods, nanofibers, and fullerenes for nanoscale drug delivery. W: de Villiers M.M., Aramwit P., Kwon G.S. [red.]. *Nanotechnology in drug delivery*. Springer, Madison 2009, ss. 105–129
6. Grebowski J., Kaźmierska P., Krokosz A.: Fulerenol – właściwości i zastosowanie w naukach biomedycznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2013;67:859–871
7. Meng H., Xing G., Sun B., Zhao F., Lei H., Li W. i wsp.: Potent angiogenesis inhibition by the particulate form of fullerene derivatives. *ACS Nano* 2010;4(5):2773–2783, <http://dx.doi.org/10.1021/nn100448z>
8. Partha R., Conyers J.L.: Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int. J. Nanomedicine* 2009;4:261–275
9. Liao F., Saitoh Y., Miwa N.: Anticancer effects of fullerene [C₆₀] included in polyethylene glycol combined with visible light irradiation through ROS generation and DNA fragmentation on fibrosarcoma cells with scarce cytotoxicity to normal fibroblasts. *Oncol. Res.* 2011;19(5):203–216, <http://dx.doi.org/10.3727/096504011X12970940207805>
10. Shipelin V.A., Trushina E.N., Avren’eva L.I., Soto S.K., Batishcheva S.Y., Mal’tsev G.Y. i wsp.: Toxicological and sanitary characteristics of fulleranol (hydroxylated fullerene C₆₀) in 28-day *in vivo* experiment. *Nanotechnol. Russ.* 2013;8(11–12):799–809, <http://dx.doi.org/10.1134/S199507801306013X>
11. Lamparth I., Hirsch A.: Water-soluble malonic acid derivatives of C₆₀ with a defined three-dimensional structure. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994;14:1727–1728, <http://dx.doi.org/10.1039/C39940001727>
12. Chiang L.Y., Swirczewski J.W., Hsu C.S., Chowdhury S.K., Cameron S., Creegan K.: Multi-hydroxy additions onto C₆₀ fullerene molecules. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992;24:1791–1793, <http://dx.doi.org/10.1039/C39920001791>
13. Shimizu K., Kubota R., Kobayashi N., Tahara M., Sugimoto N., Nishimura T. i wsp.: Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes in three types of liver cells. *Materials* 2013;6(7):2713–2722, <http://dx.doi.org/10.3390/ma6072713>
14. Nakagawa Y., Suzuki T., Ishii H., Nakae D., Ogata A.: Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction. *Arch. Toxicol.* 2011;85(11):1429–1440, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0688-z>
15. Deryabin D.G., Efremova L.V., Vasilchenko A.S., Saidakova E.V., Sizova E.A., Troshin P.A. i wsp.: A zeta potential value determines the aggregate’s size of penta-substituted [60]fullerene derivatives in aqueous suspension whereas positive charge is required for toxicity against bacterial cells. *J. Nanobiotechnol.* 2015;13:50, <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0112-6>
16. Ye S.F., Chen M., Jiang Y.Q., Chen M.L., Zhou T., Wang Y.G. i wsp.: Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system. *Int. J. Nanomedicine* 2014;9:2073–2087, <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S56973>
17. Cong W., Wang P., Qu Y., Tang J., Bai R., Zhao Y. i wsp.: Evaluation of the influence of fulleranol on aging and stress resistance using *Caenorhabditis elegans*. *Biomaterials* 2015;42:78–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.048>

18. Li Y.Y., Tian Y.H., Nie G.J.: Antineoplastic activities of Gd@C₈₂(OH)₂₂ nanoparticles: Tumor microenvironment regulation. *Sci. China Life Sci.* 2012;55(10): 884–890, <http://dx.doi.org/10.1007/s11427-012-4387-7>
19. Takemura G., Fujiwara H.: Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2007;49(5):330–352, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcad.2006.10.002>
20. Rogalska A., Marczak A., Szwed M., Jóźwiak Z.: Rola peptydów w selektywnym dostarczaniu antracyklin do komórek nowotworowych. *Postepy Biol. Komórki* 2009;36(3):465–482
21. Gajek A., Denel M., Bukowska B., Rogalska A., Marczak A.: Pro-apoptotic activity of new analog of anthracyclines – WP 631 in advanced ovarian cancer cell line. *Toxicol. In Vitro* 2014;28(2):273–281, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.006>
22. 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, [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70328-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70328-5)
23. Vapa I., Torres V.M., Djordjevic A., Vasovic V., Srdjenovic B., Simic V.D. i wsp.: Effect of fullerol C₆₀(OH)₂₄ on lipid peroxidation of kidneys, testes and lungs in rats treated with doxorubicine. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 2012;37(4):301–307, <http://dx.doi.org/10.1007/s13318-012-0092-y>
24. Kojić V., Jakimoc D., Bogdanović G., Djordjević A.: Effects of fullerol C₆₀(OH)₂₄ on cytotoxicity induced by antitumor drugs on human breast carcinoma cell lines. *Mater. Sci. Forum* 2005;494:543–548, <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.494.543>
25. Arasiewicz H., Brzezińska-Wcisło L.: Zmiany skórne w przewlekłej niewydolności nerek. *Dermatol. Prakt.* 2013;4(27):21–22
26. Idée J.M., Fretellier N., Robic C., Corot C.: The role of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: A critical update. *Crit. Rev. Toxicol.* 2014;44(10):895–913, <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2014.955568>
27. Chen Z., Ma L., Liu Y., Chen C.: Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics. *Theranostics* 2012;2(3):238–250, <http://dx.doi.org/10.7150/thno.3509>
28. Jiao F., Liu Y., Qu Y., Li W., Zhou G., Ge C. i wsp.: Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullerol in a mouse breast cancer model. *Carbon* 2010;48(8):2231–2243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2010.02.032>
29. Liu Y., Jiao F., Qiu Y., Li W., Lao F., Zhou G. i wsp.: The effect of Gd@C₈₂(OH)₂₂ nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-α mediated cellular immunity. *Biomaterials* 2009;30(23):3934–3945, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.001>
30. Yin J.J., Lao F., Meng J., Fu P.P., Zhao Y., Xing G. i wsp.: Inhibition of tumor growth by endohedral metallofullerenol nanoparticles optimized as reactive oxygen species scavenger. *Mol. Pharmacol.* 2008;74(4):1132–1140, <http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.048348>
31. Liang X.J., Meng H., Wang Y., He H., Meng J., Lu J. i wsp.: Metallofullerene nanoparticles circumvent tumor resistance to cisplatin by reactivating endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(16):7449–7454, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0909707107>
32. Kang S.G., Zhou G., Yang P., Liu Y., Sun B., Huynh T. i wsp.: Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C₈₂(OH)₂₂ and its implication for *de novo* design of nanomedicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(38):15431–15436, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1204600109>
33. Zhang W., Sun B., Zhang L., Zhao B., Nie G., Zhao Y.: Biosafety assessment of C₈₂(OH)₂₂ nanoparticles on *Caenorhabditis elegans*. *Nanoscale* 2011;3(6):2636–2641, <http://dx.doi.org/10.1039/c1nr10239g>
34. Johnson-Lyles D.N., Peifley K., Lockett S., Neun B.W., Hansen M., Clogston J. i wsp.: Fullerol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010;248(3): 249–258, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.008>
35. Su Y., Xu J.Y., Shen P., Li J., Wang L., Li Q. i wsp.: Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullerol in different cell lines. *Toxicology* 2010;269(2–3):155–159, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.11.015>
36. Yamawaki H., Iwai N.: Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006;290(6):C1495–C1502, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00481.2005>
37. Roberts J.E., Wielgus A.R., Boyes W.K., Andley U., Chignell C.F.: Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008;228(1):49–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.010>
38. Nakagawa Y., Inomata A., Ogata A., Nakae D.: Comparative effects of sulfhydryl compounds on target organelles, nuclei and mitochondria, of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.* 2015;35(12):1465–1472, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3137>
39. Yang L.Y., Gao J.L., Gao T., Dong P., Ma L., Jiang F.L. i wsp.: Toxicity of polyhydroxylated fullerene to mito-

- chondria. *J. Hazard. Mater.* 2016;301:119–126, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.046>
40. Jung S.K., Qu X., Aleman-Meza B., Wang T., Riepe C., Liu Z. i wsp.: Multi-endpoint, high-throughput study of nanomaterial toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 2015;49(4):2477–2485, <http://dx.doi.org/10.1021/es5056462>
41. Cha Y.J., Lee J., Choi S.S.: Apoptosis-mediated *in vivo* toxicity of hydroxylated fullerene nanoparticles in soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 2012;87(1):49–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.054>
42. Çavaş T., Çinkılıç N., Vatan O., Yılmaz D.: Effects of fullerene nanoparticles on acetamiprid induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2014;114:1–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.07.008>
43. Zhao B., He Y.Y., Bilski P.J., Chignell C.F.: Pristine (C₆₀) and hydroxylated [C₆₀(OH)₂₄] fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: Type I vs. type II mechanisms. *Chem. Res. Toxicol.* 2008;21(5):1056–1063, <http://dx.doi.org/10.1021/tx800056w>
44. Gelderman M.P., Simakova O., Clogston J.D., Patri A.K., Siddiqui S.F., Vostal A.C. i wsp.: Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: Fullerene C₆₀(OH)₂₄ induced tissue factor and ICAM-1 membrane expression and apoptosis *in vitro*. *Int. J. Nanomedicine* 2008;3(1):59–68
45. Srdjenovic B.U., Slavić M.N., Stankov K.M., Kladar N.V., Jović D.S., Seke M.N. i wsp.: Size distribution of fullerene nanoparticles in cell culture medium and their influence on antioxidative enzymes in Chinese hamster ovary cells. *Hem. Ind.* 2015;69(4):425–431, <http://dx.doi.org/10.2298/HEMIND131218054S>
46. Tishevskaya N.V., Zakharov Y.M., Golubotovskii E.V., Kolesnikov O.L., Trofimova N.V., Arkhipenko Y.V. i wsp.: Effects of fullerene C₆₀(OH)₂₄ on erythropoiesis *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;157(1):49–51, <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-014-2489-x>
47. Saathoff J.G., Inman A.O., Xia X.R., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A.: *In vitro* toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells. *Toxicol. In Vitro* 2011;25(8):2105–2112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.013>
48. Grebowski J., Krokosz A., Puchala M.: Fullerene C₆₀(OH)₃₆ could associate to band 3 protein of human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 2013;1828(9):2007–2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.009>
49. Stankov K., Borisev I., Kojic V., Rutonjski L., Bogdanovic G., Djordjevic A.: Modification of antioxidative and antiapoptotic genes expression in irradiated K562 cells upon fullerene C₆₀(OH)₂₄ nanoparticle treatment. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013;13(1):105–113
50. Liu Y., Wang Z., Wang X.: AFM-based study of fullerene (C₆₀(OH)₂₄)-induced changes of elasticity in living SMCC-7721 cells. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2015;45:65–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.12.011>
51. Liu Y., Wang Z., Wang X., Huang Y.: Quantitative analysis of dynamic adhesion properties in human hepatocellular carcinoma cells with fullerene. *Micron* 2015;79:74–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2015.08.005>
52. Xu J.Y., Su Y.Y., Cheng J.S., Li S.X., Liu R., Li W.X. i wsp.: Protective effects of fullerene on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Carbon* 2010;48(5):1388–1396, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2009.12.029>
53. Da Rocha A.M., Ferreira J.R., Barros D.M., Pereira T.C.B., Bogo M.R., Oliveira S. i wsp.: Gene expression and biochemical responses in brain of zebrafish *Danio rerio* exposed to organic nanomaterials: Carbon nanotubes (SWCNT) and fullerene (C₆₀(OH)_{18–22}(OK₄)). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2013;165(4):460–467, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.025>
54. Jovanović B., Whitley E.M., Palić D.: Histopathology of fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to hydroxylated fullerenes. *Nanotoxicology* 2014;8(7):755–763, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2013.828794>
55. Ferber S., Baabur-Cohen H., Blau R., Epshtein Y., Kisin-Finfer E., Redy O. i wsp.: Polymeric nanotheranostics for real-time non-invasive optical imaging of breast cancer progression and drug release. *Cancer Lett.* 2014;352(1):81–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.022>
56. Muthu M.S., Leong D.T., Mei L., Feng S.S.: Nanotheranostics – application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. *Theranostics* 2014;4(6):660–677, <http://dx.doi.org/10.7150/thno.8698>
57. Theek B., Rizzo L.Y., Ehling J., Kiessling F., Lammers T.: The theranostic path to personalized nanomedicine. *Clin. Transl. Imaging* 2014;2(1):66–76, <http://dx.doi.org/10.1007/s40336-014-0051-5>
58. Chen F., Ehlerding E.B., Cai W.: Theranostic nanoparticles. *J. Nucl. Med.* 2014;55(12):1919–1922, <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.114.146019>
59. Parhi P., Sahoo S.K.: Trastuzumab guided nanotheranostics: A lipid based multifunctional nanoformulation for targeted drug delivery and imaging in breast cancer therapy. *J. Colloid Interface Sci.* 2015;451:198–211, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.049>

-
60. Shi J., Wang L., Gao J., Liu Y., Zhang J., Ma R. i wsp.:
A fullerene-based multi-functional nanoplatform for
cancer theranostic applications. *Biomaterials* 2014;
35(22):5771–5784, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.071>