

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»

На правах рукописи

**Сергеева Василина Александровна**

**Влияние новых производных фуллера C<sub>60</sub> на транскрипционную  
активность генома МСК, фибробластов человека и раковых клеток линии  
MCF7**

03.02.07 – Генетика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Костюк Светлана Викторовна

Москва – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	3
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	6
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	15
1.1. Фуллерены	15
1.1.1. Синтез фуллеренов	15
1.1.2. Токсичность	16
1.1.3. Антиоксидантные свойства производных фуллеренов	21
1.1.4. Противораковые свойства	23
1.1.5. Противовирусная активность	25
1.1.6. Использование производных фуллеренов в качестве векторов для доставки лекарств	29
1.1.7. Другие потенциальные применения производных фуллеренов в медицине	31
1.1.8. Модели для исследования фуллеренов	34
1.1.9. Сигнальные пути и транскрипционные факторы, активирующиеся в клетках под влиянием производных фуллеренов	36
1.2. Транскрипционные факторы, ответственные за миогенную дифференцировку (MyoD, MyoD, MYF5, MRF4)	39
1.3. Ферменты, принимающие участие в синтезе АФК, NOX4	40
1.4. Заключение по данным литературы	41
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	42
2.1. Объект исследований	42
2.2. Определение флуоресценции	43
2.3. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток	43
2.4. Культивирование эмбриональных фибробластов легкого человека	43
2.5. Культивирование клеток линии MCF7 рака молочной железы	43
2.6. Инкубация клеток с фуллеренами	44
2.7. МТТ-тест	44
2.8. Определение количества активных форм кислорода	44
2.9. Определение одно- и двуцепочечных разрывов днк методом комет	45
2.10. Связывание аннексина V	45
2.11. Метод $\gamma$ -фокусов	45
2.12. Выделение РНК и определение ее концентрации	46
2.13. Обратная транскрипция	46
2.14. Определение уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени	46
2.15. Определение уровня экспрессии белков	49
2.16. Флуоресцентная микроскопия	50
2.17. Статистическая обработка результатов	50
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	51
3.1. Водорастворимые производные фуллерена C60 обладают способностью флуоресцировать в клетках	51
3.1.1. Соединения, флуоресцирующие и в воде, и в живых клетках	51
3.1.2. Водорастворимые производные фуллерена, флуоресцирующие в клетках, но не обладающие флуоресценцией в водных растворах	63
3.1.3. Водорастворимое производное фуллерена, которое обладает способностью прокрашивать ядра клеток и может быть использовано в качестве витального красителя	66
3.2. Токсичность водорастворимых производных фуллеренов в отношении флэч	68

3.3. Влияние водорастворимых производных фуллерена на синтез активных форм кислорода и на экспрессию генов, отвечающих за развитие окислительного стресса в клетках ФЛЭЧ	74
3.3.1. Исследование влияния соединений GI-761 и VI-419-РЗК на синтез активных форм кислорода и на экспрессию (на уровне РНК и белка) генов, отвечающих за развитие окислительного стресса (семейства NOX) в ФЛЭЧ	76
3.3.2. Исследование влияния производных фуллерена ОКР-111 и VI-434К2 на синтез активных форм кислорода и на экспрессию (на уровне РНК и белка) генов, отвечающих за развитие окислительного стресса (семейства NOX) в культивируемых ФЛЭЧ	88
3.3.3. Механизм развития ответа эмбриональных фибробластов легких человека на добавление водорастворимых производных фуллерена C60 к среде культивирования клеток	93
3.4. Влияние фуллеренов на экспрессию (на уровне РНК и белка) генов, отвечающих за развитие антиокислительного ответа в культивируемых фибробластах легкого эмбриона человека	101
3.4.1. Влияние фуллеренов на экспрессию фермента супероксиддисмутаза-1 (SOD1)	105
3.5. Влияние производных фуллеренов на образование разрывов ДНК клеток ФЛЭЧ и процессы репарации разрывов ДНК	111
3.5.1. Влияние производного фуллерена GI-761 на образование разрывов ДНК клеток ФЛЭЧ	112
3.5.2. Активация систем репарации ДНК ядер клеток при действии водорастворимого производного GI-761	116
3.5.3. Влияние производных фуллерена ОКР-111 и ОКР-112 на окисление и образование разрывов ДНК клеток ФЛЭЧ	117
3.5.4. Влияние производных фуллерена ОКР-111 и ОКР-112 на репарацию ДНК ядер клеток ФЛЭЧ	119
3.5.5. Отсутствие разрывов в ДНК ядер ФЛЭЧ при действии производными фуллерена VI-434К2 и VI-419-РЗК	119
3.5.6. Исследование разрывов в ДНК ядер клеток ФЛЭЧ с депривацией сыворотки при культивировании с F-828	119
3.5.7. Исследование репарации ДНК ядер клеток ФЛЭЧ с депривацией сыворотки при культивировании с F-828	121
3.5.8. Влияние производного фуллерена F-828 в бессывороточной среде на пролиферативную активность ФЛЭЧ	121
3.5.9. Влияние водорастворимого производного F-828 на клеточный цикл в клетках ФЛЭЧ	124
3.5.10. Влияние водорастворимого производного F-828 на количество транскрипционного фактора Р53 в клетках ФЛЭЧ	125
3.5.11. Влияние фуллеренов на экспрессию генов про- и антиапоптотического ответа во ФЛЭЧ и возможное развитие адаптивного ответа	127
3.6. Влияние производного фуллерена F-828 на активность транскрипционных факторов NF-κB на уровне РНК, белка, локализации в клетках и содержания фосфорилированных форм	128
3.6.1. Исследовано влияние фуллеренов на процессы аутофагии клеток	130
3.6.2. Производное фуллерена F-828 усиливает экспрессию генов сигнального каскада Rho / Rock и Smad в эмбриональных фибробластах легкого человека	131
3.7. Влияние водорастворимых производных фуллерена на МСК человека	133
3.7.1. Влияние водорастворимых производных фуллерена на дифференцировку МСК	133
3.7.1.1. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MYOD	134

3.7.1.2. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MYF5	136
3.7.1.3. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MYOG	138
3.7.1.4. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MRF4	139
3.7.1.5. Фуллерен F-827 снижает или не изменяет уровень экспрессии генов адипогенной и остеогенной дифференцировки	139
3.7.1.6. Способность фуллерена F-827 ингибировать активные формы кислорода способствует миогенной дифференцировке МСК	142
3.7.1.7. Аутофагия способствует миогенной дифференцировке МСК	144
3.8. Влияние водорастворимых производных фуллерена C60 на раковые клетки линии MCF7	145
3.8.1. Водорастворимое производное фуллерена C60 F-243 вызывает увеличение уровня АФК в клетках MCF7, повышая экспрессию NOX4-оксидазы	146
3.8.2. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают повреждения ДНК клеток MCF7	148
3.8.3. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают остановку клеточного цикла и снижение активности систем репарации в MCF7	149
3.8.4. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают снижение мембранного потенциала в митохондриях MCF7	150
3.8.5. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают снижение антиокислительного ответа в MCF7	151
3.8.6. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают транслокацию NF-κB и STAT3 в ядро в MCF7	152
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	154
<b>ВЫВОДЫ</b>	157
<b>ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ</b>	158
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	160

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

АФК – активные формы кислорода

МСК – мезенхимные стволовые клетки

ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы**

Медицинское применение нанотехнологий привело к формированию нового междисциплинарного направления медицинской науки. Наиболее перспективным является разработка технологий адресной доставки лекарств, создание противораковых и бактерицидных препаратов. Наибольшую проблему применения этих технологий представляют возможные риски при использовании синтетических наноматериалов, связанные с их воздействием на здоровье человека. Действительно, в настоящее время мало известно о молекулярных механизмах действия на клетки человека новых синтетических наноструктур, в частности, фуллеренов.

Фуллерены – группа молекулярных соединений, принадлежащих к классу аллотропных форм углерода, представляющих собой выпуклые замкнутые многогранники, составленные из чётного числа атомов углерода. В последнее время производные фуллеренов активно изучаются в связи с их перспективностью для создания новых лекарственных препаратов, а также использования в качестве векторов для доставки активных соединений в клетку [1]. Наномедицина - это активно развивающаяся отрасль нанотехнологии, связанная с применением наночастиц размером от 1 до 100 нм для терапии различных заболеваний. На производные фуллеренов возлагаются большие надежды в связи с их уникальными физико-химическими свойствами, такими как малый размер, антиоксидантные свойства, большое соотношение площади поверхности к массе [2]. Все это может помочь преодолеть ограничения, связанные с традиционной формой доставки лекарств в клетку. Благодаря своему химическому строению фуллерены могут выступать в качестве "ловушек" свободных радикалов, что делает их возможной основой для создания препаратов, замедляющих старение [3]. Кроме того, важными свойствами соединений фуллеренов является их противораковая и противовирусная активность [4]. Хотя интерес к применению производных фуллерена во многих областях медицины велик, существуют только единичные работы, посвященные исследованию воздействия фуллеренов на транскрипционную активность генов в культурах клеток или в клетках различных тканей животных.

Разработка отечественных инновационных лекарственных средств, в том числе, на основе фуллеренсодержащих наноматериалов, является одним из приоритетных

направлений инновационного развития Российской Федерации. Понимание молекулярных основ реакции клеток человека на новые водорастворимые производные фуллерена необходимо для определения биобезопасности их применения в биомедицине, диагностике, исследовательской практике. Помимо использования в медицине, производные фуллеренов предполагается также использовать в технике, поэтому важно исследовать, насколько токсичными эти соединения окажутся при контакте с клетками человека, будут ли они проникать в клетки, могут ли оказывать влияние на активацию генов сигнальных путей.

Проведение сравнительного анализа экспрессии генов, играющих ключевую роль в сохранении стабильности генома и регуляции адаптивных реакций нормальных и раковых клеток человека при действии производных фуллерена на культуры клеток актуально и своевременно, поскольку без понимания молекулярных и клеточных механизмов действия фуллеренов на клетки человека невозможно применение новых лекарственных препаратов на основе производных фуллеренов.

#### **Степень разработанности темы исследования**

В литературе содержатся данные о потенциальном применении фуллеренов и их производных в разных сферах медицины. Показано, что нефункционализированный фуллерен C<sub>60</sub> замедляет рост опухоли в мышцах с карциномой легкого и увеличивает продолжительность жизни мышей [5]. Появились свидетельства того, что фуллерены и их производные обладают потенциальной противовирусной активностью по отношению к ВИЧ первого и второго типа [6, 7] и вируса гриппа [8]. Метилпирролидиновое производное фуллерена C<sub>60</sub> показало свою эффективность в качестве фотосенсибилизатора для противомикробной фотодинамической терапии [9].

Имеются разрозненные данные, касающиеся токсичности и влияния фуллеренов и их производных на клетки млекопитающих. Коллоидные растворы нефункционализированного C<sub>60</sub> обладают высокой цитотоксичностью [10]. Производные фуллеренов, как правило, являются менее токсичными. Исследованию воздействия фуллеренов на транскрипционную активность генов млекопитающих уделялось мало внимания.

Химическая структура каркаса фуллерена позволяет поглощать электроны за счет большого количества сопряженных двойных связей и поэтому производные фуллерена предположительно могут обладать антиоксидантной активностью [11]. Могут ли новые

синтетические полностью охарактеризованные водорастворимые производные фуллеренов выступать в качестве эффективных антиоксидантов, до сих пор не исследовалось, и это является одним из предметов исследования в данной работе.

После появления новых методов синтеза водорастворимых производных фуллеренов, разработанных отечественными химиками-синтетиками из ИПХФ РАН, появилось много соединений, имеющих потенциальные перспективы их использования в качестве лекарственных препаратов.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель:** изучить влияния водорастворимых производных фуллеренов C<sub>60</sub> на транскрипционную активность генов, определяющих выживаемость и антиоксидантный ответ фибробластов и раковых клеток линии MCF7, а также дифференцировку MCK.

### **Задачи**

1. В связи с потенциальной флуоресцирующей способностью производных фуллерена провести анализ возможной флуоресценции новых синтезированных водорастворимых производных фуллеренов (F-828, F-827, F-243, GI-761, OKR111, OKR112, VI-419, VI-434K2) для изучения их визуализации и локализации в нормальных (фибробластах) и раковых клетках (линии MCF7).

2. Определить цитотоксичность структурно различных водорастворимых производных фуллерена C<sub>60</sub> на разных типах клеток человека: фибробластах, MCK и на раковых клетках аденокарциномы молочной железы (клеточной линии MCF7).

3. В связи с потенциальной способностью фуллеренов проявлять антиоксидантную активность исследовать антиоксидантную активность производных фуллеренов и их влияние на активность генов транскрипционных факторов NF-κB и NRF2 на эмбриональных фибробластах легких человека (ФЛЭЧ).

4. Изучить воздействие производных фуллеренов на образование одно- и двуцепочечных разрывов ДНК в ядрах ФЛЭЧ, на транскрипционную активность генов репарации ДНК, клеточного цикла, и пролиферативную активность ФЛЭЧ.

5. Исследовать влияние водорастворимых производных фуллерена на процесс дифференцировки MCK. Определить уровень экспрессии генов, регулирующие адипогенную, миогенную и остеогенную дифференцировку MCK: *PPARG*, *MYOD1*, *MYOG*, *MYF5*, *MRF4 (MYF6)*, *RUNX2*, *SPP1*, *OCN*, *LPL*, *AP2(FABP4)* при добавлении фуллеренов.



6. Исследовать механизм действия одного из соединений фуллеренов на раковые (аденокарциномы молочной железы) клетки линии MCF7.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

Методологической основой данного исследования являлись работы отечественных и зарубежных исследователей в области изучения влияния наносоединений на клетки человека и животных *in vitro* и *in vivo*. В работе исследовалось влияние новых синтезированных отечественными химиками водорастворимых производных фуллерена C60 на клеточные культуры эмбриональных фибробластов человека, мезенхимных стволовых клеток человека и раковых клеток аденокарциномы молочной железы человека (линии MCF7). В диссертационной работе использованы современные методы исследования метод ПЦР в реальном времени, метод проточной цитофлуориметрии, метод флуоресцентной микроскопии.

### **Научные положения, выносимые на защиту**

1. Все исследованные производные фуллерена (F-828, F-827, F-243, GI-761, OKR111, OKR112, VI-419, VI-434K2) обладают способностью проникать внутрь клетки и флуоресцировать в цитоплазме; соединение VI-434K2 проникает в ядро клетки. Соединение GI-761 прочно связываются со структурами клеток, остальные фуллерены вымываются из клеток при фиксации.

2. Нетоксичность в наномолярных концентрациях (менее 1 нМ) в отношении ФЛЭЧ, МСК и клеток линии MCF7 характерна для всех исследованных фуллеренов. В микромолярной концентрации нетоксично соединение F-828, в миллимолярной - соединения F-827, GI-761, VI-419, VI-434K2; соединение F-243 токсично в концентрации более 10 нМ в отношении раковых клеток линии MCF7, в концентрации выше 50 нМ – в отношении клеток ФЛЭЧ и МСК.

3. Все исследованные производные фуллерена эффективно связывают свободные радикалы в растворах и культивируемых ФЛЭЧ, активируя экспрессию гена фермента NOX4, что приводит к развитию вторичного окислительного стресса в клетках. Механизм повышения уровня свободных радикалов белком NOX4 доказан с помощью ингибитора NOX4 – плюмбагина. Пролонгирование антиокислительной активности, обусловленное активацией фактора транскрипции NRF2, характерно только для VI-419. Производные фуллерена F-828, F-827, F-243, GI-761, OKR111, OKR112, VI-434K2 индуцируют

активацию экспрессии транскрипционного фактора NF-κB и его транслокацию в ядра клеток.

4. Образование разрывов ДНК клеток, кратковременную остановку клеточного цикла и активацию генов репарации ДНК (*BRCA1*, *BRCA2*) вызывают соединения фуллерена F-828, F-827, F-243, GI-761, OKR111, OKR112, VI-434K2. Производное фуллерена F-828 в малых концентрациях (0,1 - 0,5 мкМ) стимулирует прогрессию клеточного цикла, увеличение пролиферативной активности и числа клеток в популяции ФЛЭЧ. В эмбриональных фибробластах легкого человека F-828 усиливает экспрессию генов сигнального каскада Rho/Rock и Smad.

5. Миогенную дифференцировку в МСК активирует только соединение F-827 в диапазоне концентраций 129 пМ - 195 мкМ.

6. Соединение F-243, в концентрации 10-50 нМ, токсичной для раковых клеток и нетоксичной для фибробластов и МСК, через 3 ч вызывает в клетках MCF7 повышенный синтез АФК, окислительные повреждения и двуцепочечных разрывы ДНК раковых клеток и активацию апоптоза, что приводит к гибели раковых клеток.

#### **Научная новизна**

Ранее синтез производных фуллеренов был сложен и дорог, число соединений, имеющих однозначно установленный состав, ограниченным. В настоящее время с появлением новых методов синтеза создаются новые водорастворимые производные фуллерена C<sub>60</sub>, влияние которых на клетки человека не исследовано. Для исследования влияния водорастворимых производных фуллерена на транскрипционную активность генов фибробластов, МСК и раковых клеток линии MCF7 выбраны новые, ранее не исследованные водорастворимые производные фуллерена C<sub>60</sub>, имеющие полярные функциональные группы, которые обеспечивают растворимость в воде и приводят к образованию растворов с различным значением pH.

Визуализация фуллеренов является одной из основных проблем при выявлении клеточных структур, связывающих фуллерены. Впервые показано, что, независимо от прикрепленных заместителей, все исследованные фуллерены флуоресцируют в нормальных (фибробластах) и раковых клетках (на линии MCF7) в диапазоне длин волн 600-800 нм при возбуждении УФ-излучением длиной волны 300-400 нм, проведен анализ локализации фуллеренов в клетках.

Определение биобезопасности вновь синтезируемых наносоединений – актуальная проблема наномедицины. Впервые исследована цитотоксичность новых синтезированных производных фуллерена и показано воздействие производных фуллеренов на целостность ДНК ядер нормальных и раковых клеток человека.

Изучены антиокислительные свойства исследуемых соединений – их способность блокировать индуцированный окислительный стресс в клетках разного типа на уровне активации транскрипции гена транскрипционного фактора *NRF2*, регулирующего активность антиокислительных систем в клетках. Впервые показан механизм индукции вторичного окислительного стресса водорастворимыми производными фуллерена C60 с различными заместителями в фибробластах человека с участием гена *NOX4*. Впервые исследовано влияние водорастворимых производных фуллерена на транскрипционную активность генов репарации, клеточного цикла.

Впервые выявлено фосфоросодержащее водорастворимое производное фуллерена C60 F-827, обладающее способностью активировать миогенную дифференцировку в МСК, повышая экспрессию транскрипционных факторов миогенной дифференцировки на уровне генов и на уровне белков.

Впервые показана цитотоксическая способность одного из водорастворимых производных фуллерена в отношении раковых клеток линии MCF7.

Таким образом, работа представляет собой оригинальное исследование влияния наноструктур (водорастворимых производных фуллерена) на транскрипционную активность клеток нормальных дифференцированных (фибробласты), мезенхимных стволовых и раковых клеток человека.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Исследованная антиоксидантная активность водорастворимых производных фуллерена позволяет сделать вывод о потенциале использования данных соединений в качестве регуляторов окислительного стресса. Соединение, оказывающее пролонгированное снижение уровня активных форм кислорода в клетках (VI-419-P3K), может быть использовано в качестве антиоксиданта длительного действия.

В результате исследования флуоресцентных способностей производных фуллеренов обнаружено наличие флуоресценции фуллеренов внутри клеток и найдены диапазоны длин волн, что позволит детектировать соединения на основе каркаса фуллерена C60 внутри клеток. Доказанное вымывание соединений из клеток при

фиксации подтверждает возможность использования методов исследования с использованием флуоресцентно меченных антител для анализа влияния фуллеренов на уровень экспрессии белков в клетках. Обнаружено низкотоксичное производное фуллерена vi-434K2, быстро проникающее через клеточную и ядерную мембраны и прокрашивающее ядро клеток. Оно может быть использовано в качестве витального красителя в практике лабораторной работы.

Обнаруженное свойство одного из производных фуллерена C60 – F-827 – вызывать миогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток потенциально позволит использовать его в регенеративной медицине для лечения обширных травм и миодистрофий разного типа.

Водорастворимое производное фуллерена F-243 является токсичным для раковых клеток линии MCF7 в диапазоне концентраций 10-50 нМ, не токсичной для нормальных клеток человека. Может рассматриваться перспектива использования данного соединения при адресной доставке к раковым клеткам в комплексной терапии рака.

Детальное исследование сигнальных путей, задействованных в ответе клеток на инкубацию с производными фуллерена C60, имеет ценность для дальнейшей разработки лекарств на основе фуллеренов.

Полученные данные имеют фундаментальный характер и могут быть использованы для создания учебных пособий и учебных курсов по наносоединениям на основе фуллеренов C60.

### **Степень достоверности результатов**

Высокая степень достоверности полученных результатов и обоснованности сделанных выводов определяется большим количеством повторов экспериментов. В работе использованы современные точные молекулярно - генетические и статистические методы исследования, интерпретация проведена с использованием методов статистической обработки данных. Достоверность подтверждена статистическими методами: непараметрическими критериями Манна-Уитни (U-критерий) и Колмогорова-Смирнова. Выводы и заключения подкреплены убедительными экспериментальными фактами. Для теоретического обоснования и сравнительного анализа привлечено большое количество отечественных и зарубежных источников литературы. Выводы полно и точно отражают результаты проделанной работы. Сформулированные в работе выводы согласуются с поставленными целью и задачами исследования.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует формуле специальности 03.02.07 – «Генетика (биологические науки)», охватывающей проблемы реализации генетической информации (транскрипция, трансляция) на молекулярном и клеточном уровне, механизмы регуляции экспрессии генов и областям исследований, описанных в пунктах 4 (Процессы репарации); 5 (Методы генетического анализа у прокариот и эукариот); 7 (Реализация генетической информации (транскрипция, трансляция). Механизмы регуляции экспрессии генов. Роль геномных перестроек в реализации генного действия) и 11 (Генетические основы биотехнологии) паспорта научной специальности.

### **Апробация результатов исследования**

Материалы диссертации доложены на конференции молодых ученых ФГБНУ МГНЦ, Москва, 2014; зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2015; конгрессе 40<sup>th</sup> Congress of the federation of the European biochemical society, Берлин, 2015; конференции International mammalian genome society, Йокогама, 2015; Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2016; конгрессе 7th International Congress Nanotechnology in Medicine and Biology, Кремс, 2016; конференции молодых ученых ФГБНУ МГНЦ, Москва, 2016; конференции NANOCON-2016, Брно, 2016; зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2018.

Работа одобрена этическим комитетом и прошла экспертную комиссию, рекомендована к защите на заседании Диссертационного совета ФГБНУ «МГНЦ».

### **Личное участие автора в выполнении исследования**

Автор непосредственно участвовал в организации и проведении всех этапов исследования: формулировании цели и задач, выборе методов исследования, проведении экспериментальной работы, статистической обработке полученных данных и их интерпретации, формулировании выводов, а также в подготовке материалов к публикации. Автором изучена зарубежная и отечественная литература по теме диссертации. Автор подготовил материалы к публикации в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах. Результаты работы лично представлены автором на 4 международных и 6 всероссийских конференциях.

## **Публикации**

Результаты диссертационной работы представлены в 15 печатных работах, в том числе в 4 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для соискателей ученой степени кандидата биологических наук.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Фуллерены

#### 1.1.1. Синтез фуллеренов

Впервые фуллерены получены в 1985 году [1]. В исследовании Kroto [1] авторы пытались понять механизм образования длинноцепочечных молекул, состоящих из атомов углерода, в межзвездном пространстве и с этой целью сублимировали графит с помощью лазерного излучения. В опубликованной работе [1] авторы предположили, что полученные молекулы из 60 атомов углерода имеют структуру футбольного мяча, а именно представляют собой усеченный икосаэдр с 60 вершинами и 32 гранями, 12 из которых являются пятиугольниками, а остальные 20 - шестиугольниками (рисунок 1). Атомы углерода располагаются в вершинах усеченного икосаэдра и каждый из углеродов участвует в образовании двух одинарных связей и одной двойной связи, таким образом, атомы углерода находятся в  $sp^2$ -гибридизации. Авторы предположили, что соединение является ароматическим.

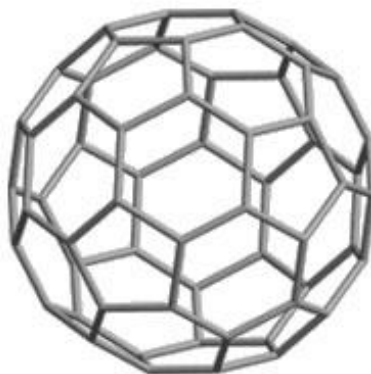


Рисунок 1. Структурная формулы фуллерена C<sub>60</sub>.

В дальнейшем получено множество фуллеренов, состоящих из разного количества атомов углерода, в том числе C<sub>70</sub>, C<sub>76</sub>, C<sub>84</sub>, C<sub>90</sub>, C<sub>94</sub> [3], C<sub>36</sub> [14]. Фуллерены можно получать сублимацией графита различными способами, однако выход составляет меньше 1%, кроме того, в данном случае очистка представляет собой трудную и кропотливую работу [15]. Фуллерены также можно получать химическим синтезом [16].

Очистка обычно проводится экстракцией из раствора в толуоле с последующим фильтрованием, перерастворением в толуоле и колоночной хроматографией [17].

### 1.1.2. Токсичность

Коллоидные растворы нефункционализованного C<sub>60</sub>, полученные экстракцией в воду из ТГФ (тетрагидрофурана), оказывают токсический эффект на ряд клеток млекопитающих. Они вызывают увеличение количества АФК, деполяризацию митохондрий, окисление липидов в клетке, что повреждает клеточную мембрану и ведет к клеточной смерти (обычно по механизму некроза) [18]. Субтоксичные концентрации приводят к аутофагии, аресту клеточного цикла и замедлению пролиферации. Однако известно, что экстрагированный подобным образом фуллерен способен удерживать до 10% исходного растворителя и эффект может быть связан именно с совместным действием ТГФ-фуллерен, так как известно, что чистый ТГФ не является цитотоксичным даже в довольно высоких концентрациях. Действительно, при применении экстракции из этанола или бензола коллоидные растворы фуллеренов не вызывали увеличение АФК.

Растворы C<sub>60</sub>, полученные ультразвуковым растворением в воде, не увеличивали уровень АФК в клетках, однако оказались цитотоксичны для клеток [10], кроме того, показано, что в организмах рыб, подвергавшихся хроническому воздействию подобных растворов, развивался окислительный стресс [19].

Производные фуллеренов, как правило, являются менее токсичными, чем нефункционализованные C<sub>60</sub>. Такое распространенное производное, как фуллеренол (полигидроксилированный C<sub>60</sub>, рисунок 2), менее склонно вызывать увеличения уровня АФК в клетке, но даже оно при активации светом вызывает окислительный стресс в различных клетках человека [20]. Кроме того, фуллеренол вызывает остановку клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub> [21], однако повышенная клеточная смерть наблюдается лишь при довольно высоких концентрациях - LD<sub>50</sub> - 1000 µg/ml [22]. При совместном действии оксидантов и фуллеренола последний способен нивелировать действие окислителя, поглощая АФК. Аналогично, карбоксильные производные фуллерена C<sub>60</sub> уменьшают повреждающее действие окислителей, однако при освещении ультрафиолетом легко становятся источниками АФК. Как правило, цитотоксичность производных фуллеренов зависит от типа химических заместителей - чем больше соотношение гидрофобности к гидрофильности, тем проще эти соединения проникают в клетку и тем больше их цитотоксичность [23].



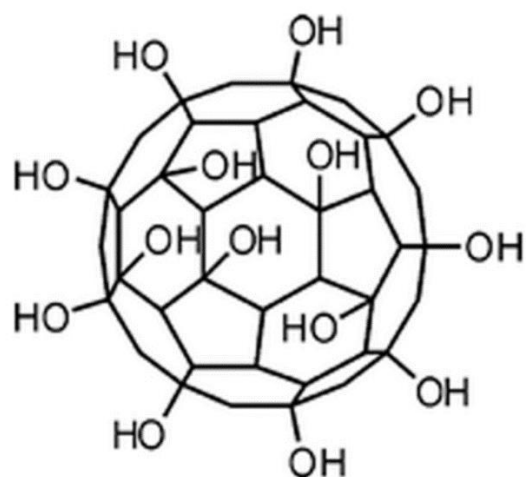


Рисунок 2. Структура полигидроксилированного производного фуллерена.

Показано, что в клетках эндотелия HUVEC нефункционализированный фуллерен C<sub>60</sub> повышает концентрацию внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и вызывает остановку клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub>, однако не влияет на уровень гибели клеток [24]. В отличие от самого фуллерена C<sub>60</sub>, фуллеренол приводит к повышению уровня апоптоза в клетках сосудистого эндотелия, что может приводить к атеросклерозу или другим заболеваниям сердечно-сосудистой системы. Кроме того, воздействие фуллеренола на клетки эндотелия приводит к снижению плотности клеток, а также к появлению большого количества вакуолей, что является признаком накопления полиубиквитинилированных белков и аутофагии [25]. Есть данные о том, что фуллеренол приводит к накоплению жиров и экспрессии рецепторов окисленных липопротеинов низкой плотности, а также цитоплазматических металлопротеаз-9 в макрофагах, что является ключевыми событиями в формировании атеросклеротической бляшки. Также известно, что гибридный материал, состоящий из молекул фуллерена C<sub>60</sub> на полиуретановой подложке, хорошо сорбирует эритроциты, что потенциально может приводить к усилению таких процессов, как коагуляция и образование тромбов. С другой стороны, это соединение ингибирует синтез супероксида и киназу C, что приводит к снижению пролиферации клеток гладкой мускулатуры, что является положительным фактором, так как при атеросклерозе наблюдается патологическое утолщение слоя клеток гладкой мускулатуры и окислительный стресс.

Другое производное фуллерена C60 - гексасульфобутил-фуллерен C60 - показало свою эффективность в защите липопротеинов низкой плотности от окисления и в связи с этим потенциально может использоваться для предотвращения атеросклероза.

Показано, что наночастицы фуллерена C60 обладают свойством задерживаться в сосудах, в связи с этим особенно важным является исследование влияния подобных соединений на клетки крови. Известно, что фуллерен C60, полученный экстракцией из ТГФ, вызывает лизис эритроцитов человека [26]. Однако коллоидные растворы фуллерена, приготовленные другими методами, не вызывали выраженного гемолиза, по всей видимости эффект связан с остаточными количествами растворителя внутри каркаса фуллеренов. Интересно, что поликатионные производные фуллеренов (рисунок 3) проявляли сильные гемолитические свойства, тогда как нейтральные и анионные производные C60 не влияли на гемолиз [23]. Одним из возможных объяснений такого различия служит разная способность производных взаимодействовать с мембраной эритроцитов.

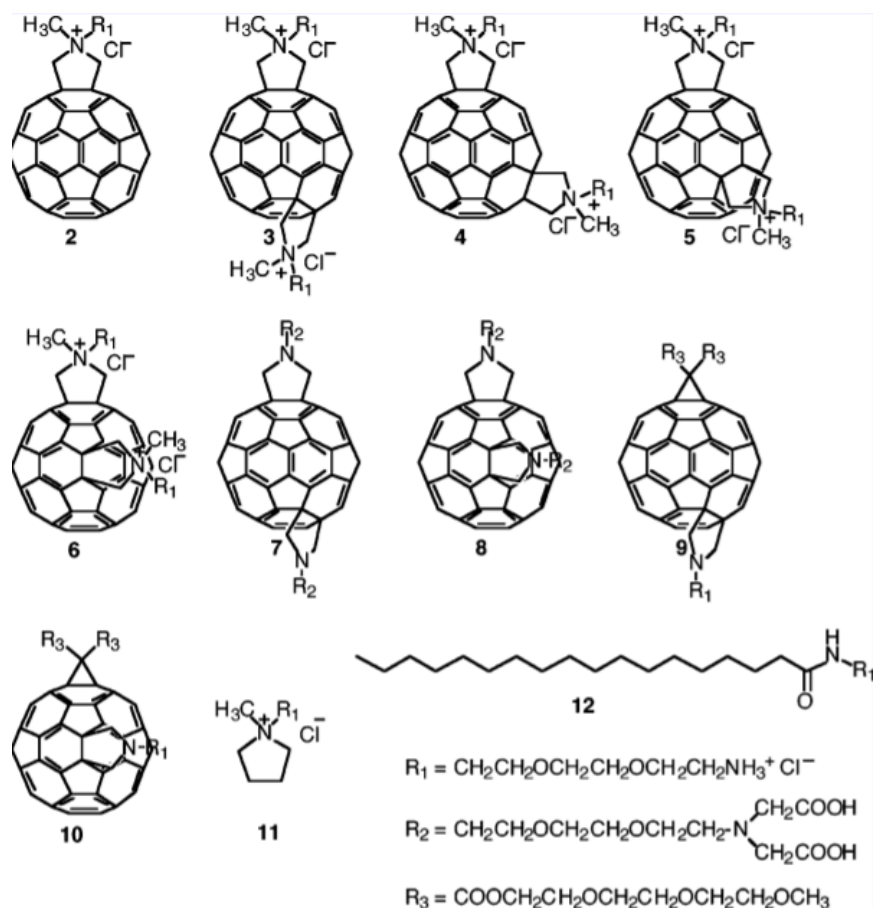


Рисунок 3. Поликатионные, нейтральные и полианионные производные фуллерена C60, влияющие на гемолитические свойства.

Показано, что фуллеренолы являются токсичными для гепатоцитов крысы: соединения вызывают окисление жиров, нарушение работы митохондрий. Интересно, что производные с различным количеством гидроксильных групп проявляют различную токсичность, так,  $C_{60}(OH)_{24}$  гораздо более токсичен, чем  $C_{60}(OH)_{12}$  [27].

Комплекс гамма-циклодекстрина с фуллереном  $C_{60}$  (рисунок 4) легко проникает в клетки эпителия роговицы глаза, где под действием УФ-излучения вызывает окислительные повреждения белков и апоптоз, причем данное явление не происходит при обычном освещении или в темноте [28]. Показано, что фуллеренолы легко проникают в пигментный эпителий сетчатки глаза человека и в малых концентрациях вызывают окислительный стресс при освещении ультрафиолетовым или видимым светом, а в больших концентрациях проявляют токсичные свойства даже без освещения. В обоих случаях наблюдался повышенный апоптоз в связи с окислительным стрессом [29,30].



Рисунок 4. Комплекс гамма-циклодекстрина с фуллереном  $C_{60}$ .

Суспензии  $C_{60}$ , приготовленные механическим растворением фуллерена в среде с додецилсульфатом натрия не обнаруживали токсичности в клетках кожи *in vitro* [31], более того, они снижали уровень АФК, генерируемый клетками под действием УФ-излучения. Полигидроксилированные фуллеренолы также снижают уровень синтеза АФК в УФ-облученных кератиноцитах человека, причем цитопротекторные свойства тем более выражены, чем больше гидроксильных групп содержит производное [32].

Гидроксилированные и карбоксилированные производные фуллеренов не оказывали токсичного влияния на культуры нейронов, однако значительно снижали жизнеспособность культивируемых нейронов мыши, возможно, это указывает на непригодность культуры нейронов для подобных исследований [33].

В экспериментах с подкожными инъекциями показано, что стерильного воздуха фуллеренолы не обладают про-воспалительным эффектом на мышцах линии CD-1, C57BL/6 и BALB/c. Однако при совместном воздействии липополисахаридов и фуллеренола, последний усиливает действие липополисахаридов и вызывает быстрый

приток лейкоцитов (в большей степени нейтрофилов). Этот эффект частично связан с продукцией цито- и хемокинов в экссудате, в том числе про-воспалительного IL-6. Таким образом, несмотря на то, что фуллеренол в условиях эксперимента не вызывал про-воспалительного ответа, при совместном действии с про-воспалительными агентами наблюдалось усиление негативного эффекта [33].

В макрофагах мыши RAW264.7 суспензии фуллерена C60 в концентрации выше 1,65 мг/л вызывают изменение форм клеток (сжатие и асимметрию), снижение мембранного потенциала митохондрий, уменьшение жизнеспособности клеток, а также повышенный апоптоз. Выраженность эффектов зависит от дозы фуллерена и времени инкубации [35].

Фуллеренол является токсичным для клеток проксимального канальца почек свиней: он вызывает разрушение цитоскелета по механизму, не зависящему от окислительного стресса, а также дисфункцию митохондрий и увеличение аутофагии [36].

Воздух в городах содержит фуллерены, вероятно, они образуются при сжигании угля [37]. Это говорит о том, что люди могут быть подвержены влиянию фуллеренов в повседневной жизни. Влияет ли вдыхание воздуха, содержащего фуллерены, на легкие человека?

У крыс, вдыхавших аэрозоль из растворов фуллерена C60 с tween-80, в течении 4 недель, наночастицы фуллерена C60 найдены в макрофагах альвеол, однако в тканях легкого никаких патологий не найдено. Кроме того, фуллерены вызывали лишь незначительное повышение экспрессии генов, участвующих в воспалении, окислительном стрессе и апоптозе, то есть, наночастицы фуллерена не являются токсичными для клеток легких [38].

Однако, субтоксические концентрации карбоксилированного производного фуллерена C60 могут проявлять протекторные свойства в отношении нейронов в случае клеточной смерти в результате окислительного стресса, вызванного нейротоксинами. Эти данные свидетельствуют о том, что фуллерены и их производные потенциально могут быть использованы в качестве нейропротекторов [39]. Также стоит отметить, что карбоксилированные производные фуллеренов (рисунок 5) в нетоксичных концентрациях ингибируют синтез важного нейромодулятора – оксида азота – в нейронах, то есть они способны изменять их функционирование [40].

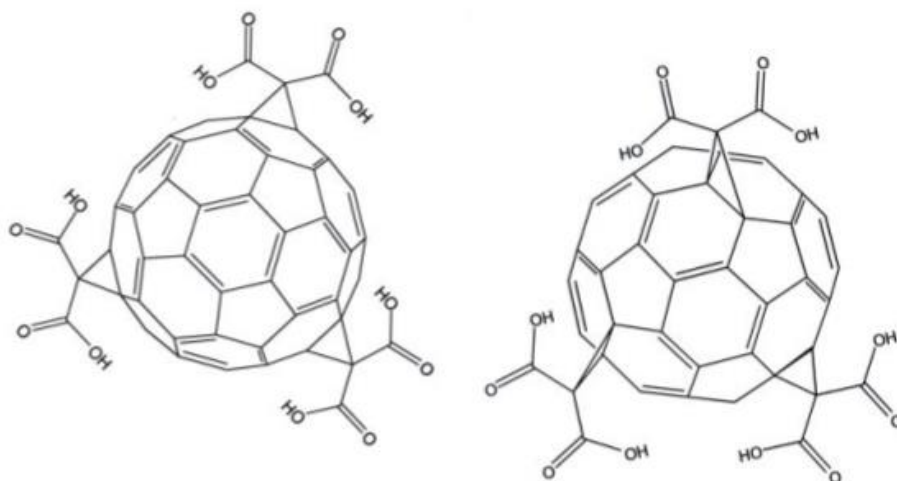


Рисунок 5. Карбоксилированные производные фуллерена, способные ингибировать синтез оксида азота в нейронах.

### 1.1.3. Антиоксидантные свойства производных фуллеренов

Химическая структура каркаса фуллерена такова, что она может с легкостью поглощать электроны за счет большого количества сопряженных двойных связей и поэтому производные фуллерена обладают мощной антиоксидантной активностью. В растворах фуллерены являются настолько мощными поглотителями свободных радикалов, что они получили название "радикальные губки" и считаются наиболее эффективными антиоксидантами в мире.

В 2005 году в эксперименте с крысами показано замечательное свойство чистого фуллерена (в виде суспензии) защищать печень от окислительных повреждений [41]. Крысы подвергались воздействию четыреххлористого углерода  $\text{CCl}_4$ , который приводил к образованию радикалов трихлорметила  $\text{CCl}_3\cdot$ . Известно, что в присутствии кислорода  $\text{CCl}_3\cdot$  образует трихлорметилперокси радикалы вида  $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ , которые приводят к быстрому окислению жиров в клетках [42]. Для исследования антиоксидантных свойств фуллеренов крысам предварительно вводили суспензии  $\text{C}_{60}$  в воде, а затем подвергали их воздействию четыреххлористого углерода. В таком случае у крыс не возникало повреждений печени. Таким образом, фуллерены могут быть использованы как гепатопротекторы, однако необходимо более тщательно исследовать их влияние на клетки организма.

В литературе показано, что производные фуллеренов, растворимые в воде, проникают через фосфолипидный бислой и локализуются возле митохондрий, таким образом, есть потенциал для использования этих соединений для защиты клеток от токсинов и других повреждающих воздействий. Например, известно, что карбоксильные производные фуллеренов могут защищать нейроны [43] и эпителиальные клетки [44] от повреждений и апоптоза. Также показано, что карбоксильные производные фуллерена C60 (конъюгаты C60 с малоновой кислотой) способны защищать периферийные мононуклеары крови от индуцированного апоптоза. В работе [45] апоптоз РВМС индуцировали 2-дезоксид-рибозой или TNF- $\alpha$  совместно с циклогексимидом, так как известно, что эти вещества меняют мембранный потенциал митохондрий, производные фуллерена же предохраняют этот потенциал от изменений, предотвращая апоптоз.

Производные фуллеренов могут использоваться в качестве цитопротекторных агентов при ультрафиолетовом облучении [46]. Облучение светом с длиной волны 320-400 нм приводит к образованию активных форм кислорода, что приводит к повреждению клеток и клеточной смерти. Это особенно актуально для клеток кожи, так как именно она в первую очередь сталкивается с повреждающим действием ультрафиолета. Поливинилпирролидоновое производное фуллерена C60, зарегистрированное как Radical Sponge® (рисунок 6), может использоваться как защитное средство благодаря способности проникать глубоко в эпидермис. Достоинством этого средства по сравнению с витамином С является его высокая химическая стабильность.



Рисунок 6. Зарегистрированный как Radical Sponge® препарат на основе фуллерена C60.

Антиоксидантные свойства фуллеренов и их производных находят применение и в нейронауке. Известно, что мозг обладает ограниченными регенерационными способностями, поэтому он чувствителен к окислительному стрессу. Показано, что

производные фуллерена предотвращают окисление ненасыщенных жиров, нейтрализуя свободные радикалы.

#### **1.1.4. Противораковые свойства**

Наномедицина - это активно развивающаяся отрасль нанотехнологии, связанная с применением наночастиц размером от 1 до 100 нм для терапии различных заболеваний. На производные фуллеренов возлагаются большие надежды в связи с их уникальными физико-химическими свойствами, такими как малый размер, антиоксидантные свойства, большое соотношение площади поверхности к массе и др. Все это может помочь преодолеть ограничения, связанные с традиционной формой доставки лекарств в клетку.

Интересным направлением противораковой терапии является действие на опухоли ультразвуком. Очевидные преимущества этого метода по сравнению с электромагнитным облучением, например, лазерным излучением - это способность проникать сквозь ткани и воздействовать на опухоли, локализованные внутри организма, при этом, в отличие от проникающих видов электромагнитного излучения, ультразвук обладает меньшей повреждающей способностью. Некоторые вещества, например, порфирины, способны вызывать значительные повреждения клеток и замедлять рост опухоли при активации ультразвуком. Замечено, что фуллеренол обладает похожими свойствами [47]. Предполагаемый механизм данного явления - генерация АФК под действием ультразвука, так как в присутствии гистидина и триптофана в качестве антиоксидантов повреждений клеток не наблюдается. Фуллеренол в комбинации с ультразвуком подавляет рост опухолей из подсаженных клеток colon 26 в мышах [48]. Известно, что цитотоксичность для клеток опухоли при ультразвуковой терапии достигается в первую за счет повреждения мембраны клеток, которое начинается с окисления липидов. Показано, что полигидроксилированное производное фуллерена в концентрации 80 мкМ увеличивает скорость окисления липидов в клетке под действием ультразвука более чем в три раза, при этом ключевую роль в процессе играет образование синглетного кислорода [49].

Еще одной областью применения фуллеренов и их производных в противораковой терапии является фотодинамическая терапия, где фуллерены могут быть использованы как фотосенсибилизаторы. Идея фотодинамической терапии заключается в использовании поглощающих свет красок совместно с видимым или инфракрасным светом. При этом происходит активное образование АФК, которые являются

цитотоксичными для клеток. Селективности можно достигнуть либо с помощью таргетной доставки фотосенсибилизатора в раковые клетки, либо за счет локального облучения опухоли. Ограничение данного метода заключается в недоступности многих типов опухолей для воздействия облучением, однако с развитием эндоскопических методов фотодинамическая терапия стала возможна для таких типов рака, как рак легких, кишечника, цервикального канала, мочевого пузыря и т.д. Преимущества же очевидны: фотодинамическая терапия имеет меньший риск развития побочных эффектов, чем другие виды лечения и является неинвазивной. Фуллерены являются достаточно перспективными соединениями для использования в данном виде терапии, так как они достаточно фотостабильны, не подвержены быстрому выгоранию при облучении и, благодаря своей химической структуре, могут быть легко модифицированы. Первые попытки использовать фуллерены и их производные в качестве фотосенсибилизаторов предприняты в 1993 году [50]. Позже показано, что дендритные производные фуллеренов, а также конъюгаты фуллеренов с малоновой кислотой являются фототоксичными для клеток линии Jurkat, причем степень токсичности зависит от дозы ультрафиолета, а клеточная смерть связана в основном с повреждениями мембраны клеток [50].

В экспериментах *in vivo* фуллерен C<sub>60</sub>, конъюгированный с полиэтиленгликолем (рисунок 7), показал свою эффективность в качестве фотосенсибилизатора. Модельным мышам с подкожной опухолью в спине вводили полиэтиленгликоль-C<sub>60</sub> внутривенно, а затем участок кожи над опухолью облучался видимым светом. В результате происходил некроз клеток опухоли без повреждения нижележащих тканей, причем опухоли исчезали при концентрации конъюгата 424 мг/кг и интенсивности света 107 Дж/см<sup>2</sup> [52].

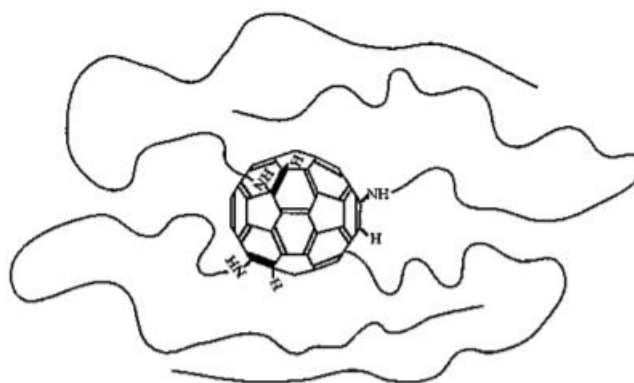


Рисунок 7. Структура конъюгата фуллерена C<sub>60</sub> с полиэтиленгликолем.



Нефункционализированный фуллерен C<sub>60</sub> замедляет рост опухоли в мышцах с карциномой легкого (Льюиса) на 25,1 процент после введения в дозах 5 мг на кг массы тела в течение 5 дней и увеличивает продолжительность жизни мышей [5].

### 1.1.5. Противовирусная активность

Фуллерены и их производные обладают потенциальной противовирусной активностью. Показано, что производные фуллеренов способны ингибировать протеазу ВИЧ [6]. Фуллеропирролидины (рисунок 8) с двумя аминогруппами проявляют активность по отношению к ВИЧ первого и второго типа [7].

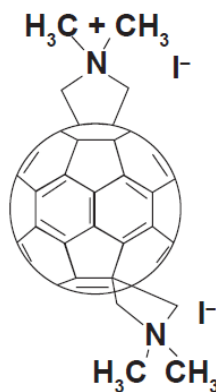


Рисунок 8. Химическая структура фуллеропирролидинов.

В литературе есть данные о том, что аминокислотные производные фуллерена C<sub>60</sub> ингибируют репликацию ВИЧ и цитомегаловируса человека. Исследованы следующие производные фуллерена: C<sub>60</sub>-l-Ala, C<sub>60</sub>-l-Ser, C<sub>60</sub>-l-Gly, C<sub>60</sub>-l-Arg, C<sub>60</sub>-d-Arg, C<sub>60</sub>-ACA (C<sub>60</sub>-ε-аминокапроновая кислота), C<sub>60</sub>-ACNa (натриевая соль C<sub>60</sub>-ε-аминокапроновой кислоты), C<sub>60</sub>-ABA (C<sub>60</sub>-γ-аминомасляная кислота), C<sub>60</sub>-ABNa (натриевая соль C<sub>60</sub>-γ-аминомасляной кислоты). Механизм действия основан на способности производных проникать через биологические мембраны и встраиваться в гидрофобные участки белков (рисунок 9). Интересно, что проникновение через фосфолипидные мембраны стереоселективно для L-изомеров[53].



Рисунок 9. Структура макромолекулярного комплекса апомиоглобина с глицилфуллереном C60.

Некоторые катионные, анионные и аминокислотные производные фуллерена C60 способны ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ, а также репликацию вируса гепатита С (рисунок 10) [54].

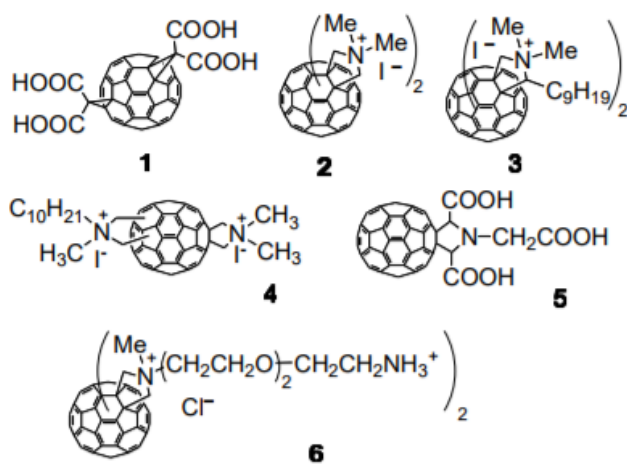


Рисунок 10. Производные фуллерена C60, способные ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ, а также репликацию вируса гепатита С.

Отмечается, что длинные алкильные радикалы снижают противовирусную активность производных фуллеренов. С помощью компьютерного моделирования (рисунок 11) получены данные о том, что производные фуллерена могут менять сплайсинг протеазы ВИЧ, ингибируя репликацию.

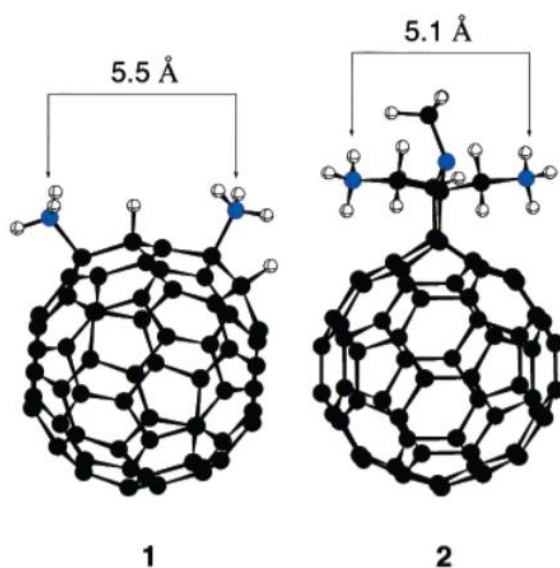
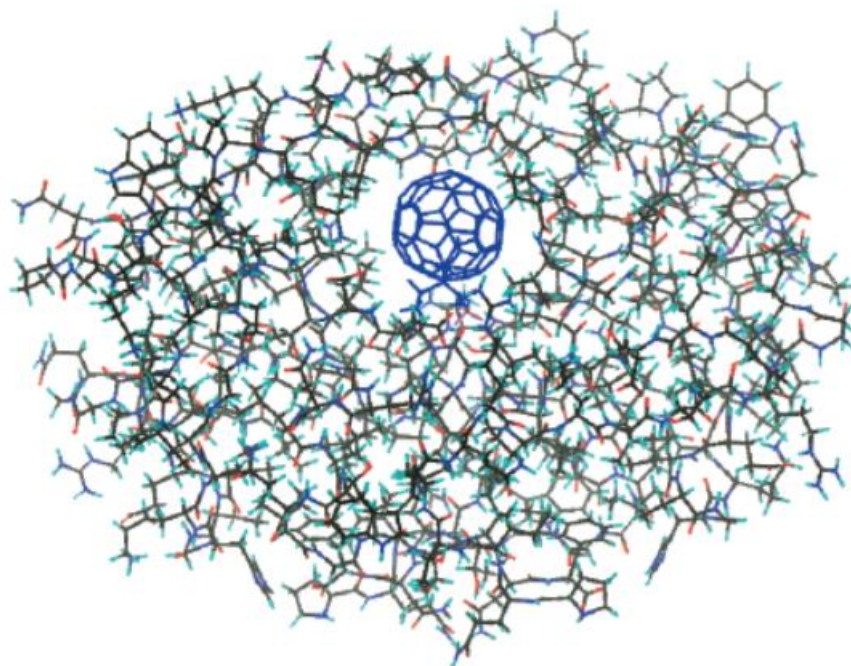


Рисунок 11. Взаимодействие между ВИЧ и производными фуллерена C60 по данным компьютерного моделирования.

На периферийных мононуклеарах крови РВМС показано, что действие производных фуллерена связано с электростатическим взаимодействием производного с остатками аспарагиновой кислоты в активном центре протеазы ВИЧ (Asp 25 и Asp125) [55].

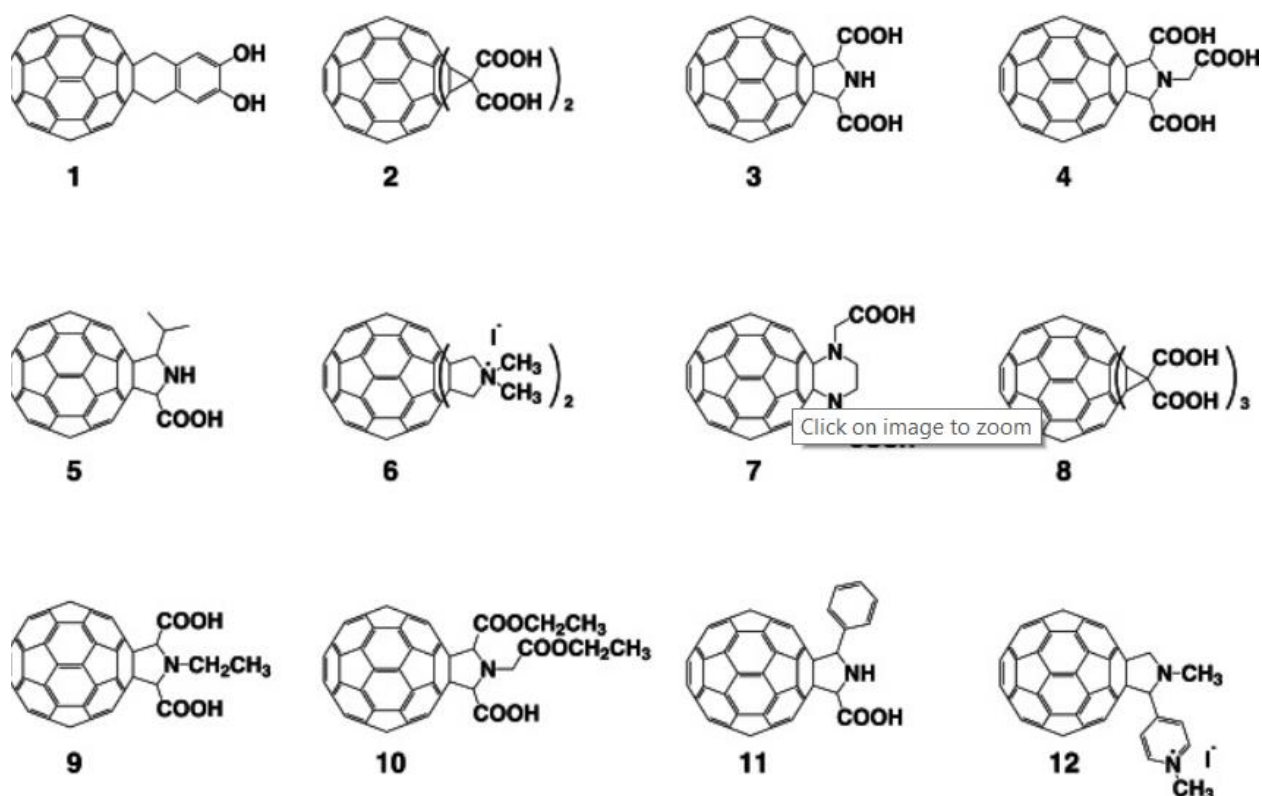


Рисунок 12. Структуры производных фуллерена C<sub>60</sub>, протестированные на РНК-полимеразе гриппа H1N1.

Кроме того, проведен молекулярный докинг, на основании которого сделаны выводы о том, как производные фуллерена C<sub>60</sub> могут связываться с субъединицей PA (рисунок 13). На основании полученных данных может быть сделан вывод о том, что исследованные производные фуллерена можно рассматривать как перспективные препараты против гриппа.

Кроме того, есть данные о том, что производные фуллерена C<sub>60</sub> активны против вируса гриппа [8]. Авторы указывают, что это является важным свойством, так как вирус свиного гриппа H1N1 и вирус птичьего гриппа H5N1 вызывали серьезные эпидемии. РНК-полимераза гриппа H1N1 состоит из субъединиц PA, PB1 и PB2, причем N-конец субъединицы PA обладает эндонуклеазной активностью. Авторы провели *in vitro* скрининг 12 различных производных фуллерена на предмет ингибирования нуклеазной активности субъединицы PA (рисунок 12).

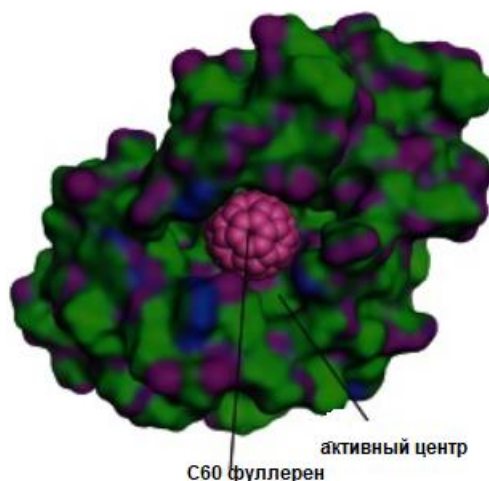


Рисунок 13. Молекулярный докинг молекулы фуллерена в активном центре эндонуклеазы РА.

### 1.1.6. Использование производных фуллеренов в качестве векторов для доставки лекарств

В последнее время все большее внимание исследователей уделяется поиску и разработке веществ, которые могут служить векторами для доставки лекарств в клетку. Подобная доставка может снизить дозировку необходимого лекарства за счет большей доли проникновения вещества внутрь клетки, а также сделать возможным использование тех веществ, которые не способны самостоятельно проникать через биологические мембраны.

На данный момент в качестве векторов предлагается использовать 4 альтернативы: катионные органические соединения, вектора вирусного происхождения, рекомбинантные белки или наноносители неорганической природы [56]. Фуллерены представляют собой частицы размером около 1 нм. Каркас фуллерена является гидрофобным, поэтому для получения водных растворов соединений на основе фуллеренов к углеродному каркасу необходимо присоединять гидрофильные радикалы. Показано, что производные фуллеренов проникают внутрь клетки и локализуются рядом с митохондриями (рисунок 14) [57]. На клетках COS-1 показано, что фуллерены, конъюгированные с ДНК, столь же эффективно проникают в клетку, как и коммерчески доступные векторы на основе липидов, при этом фуллерены образуют защитную оболочку вокруг молекулы ДНК, увеличивая время ее жизни [58].

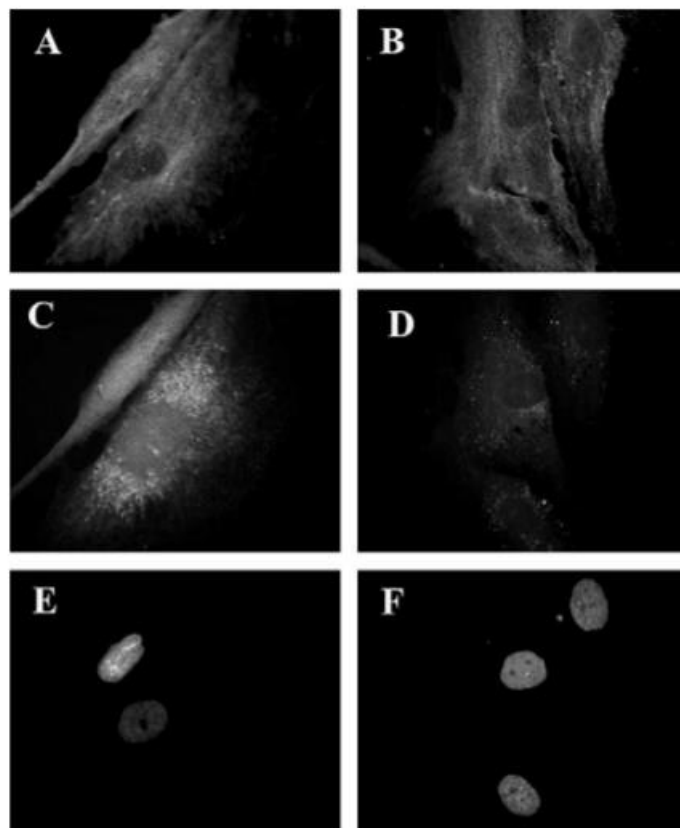


Рисунок 14. Локализация производного фуллерена  $C_{61}(CO_2H)_2$  в клетках Cos-7. Иммунофлуоресцентное мечение сети микротрубочек (А), производное фуллерена (С), ДНК меченная красителем Ноеchst 33342 (Е) в клетках, инкубированных с исследуемым производным. Микротрубочки (В), производное фуллерена (D), ДНК меченная красителем Ноеchst 33342 (F) в контрольных клетках.

Фуллерены и их производные способны проникать внутрь кожи, что расширяет спектр потенциального применения данных соединений [59].

Доксорубин - распространенный противораковый препарат, но его применение ограничено из-за низкой селективности действия и кардиотоксичности. Исследования показали, что конъюгат доксорубина с фуллереном  $C_{60}$  (рисунок 15) накапливается в ядрах раковых клеток гораздо быстрее, чем доксорубин без вектора. Проникновение комплекса доксорубина с фуллереном в клетки повышено на 20-30% по сравнению с таковым без фуллерена. Эффективность также увеличивается в 1.5 - 2 раза. В экспериментах *in vivo* с мышами, имеющими раковые опухоли, комплекс доксорубина с фуллереном  $C_{60}$  приводил к увеличению продолжительности жизни в 2,5 раза и



сокращению объема опухоли на 63% по сравнению с чистым доксорубицином. Важно отметить, что увеличение эффективности лекарства не приводило к усилению побочных эффектов, как показано с помощью морфофизиологического анализа [60].

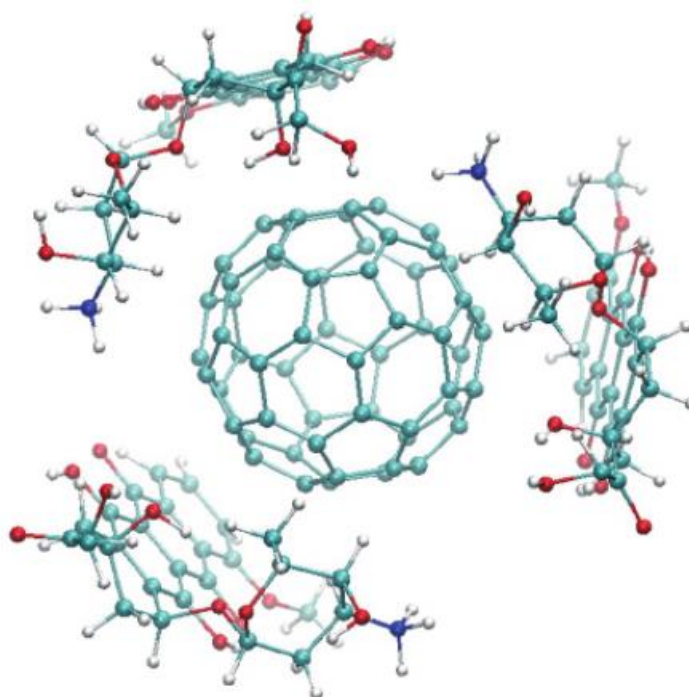


Рисунок 15. Комплекс фуллерена с доксорубицином. Компьютерное моделирование.

### 1.1.7. Другие потенциальные применения производных фуллеренов в медицине

Обнаружено, что некоторые производные фуллеренов проявляют интересные свойства.

Существует ряд заболеваний человека, связанный с неправильным сворачиванием белков и их отложением в клетках. Это амилоидозы различного генеза, например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, катаракта, диабет второго типа и др. Терапия данных заболеваний заключается в предотвращении формирования амилоидных отложений, а также в разрушении уже существующих амилоидных агрегатов. Фуллерен, а также диметоксиметано-производные фуллерена способны подавлять агрегацию бета-амилоидных пептидов. Получены данные о том, что ионные формы полигидроксилированных фуллеренов (рисунок 16) с общей формулой  $\text{Na}^+_n[\text{C}_{60}\text{O}_x(\text{OH})_y]^{n-}$  (фуллеренолаты натрия) подавляют агрегацию бета-амилоидов в течении 24 после начала инкубации и разрушают уже существующие фибриллы *in vitro*. Кроме того, фуллеренолаты натрия являются низкотоксичными веществами [61].

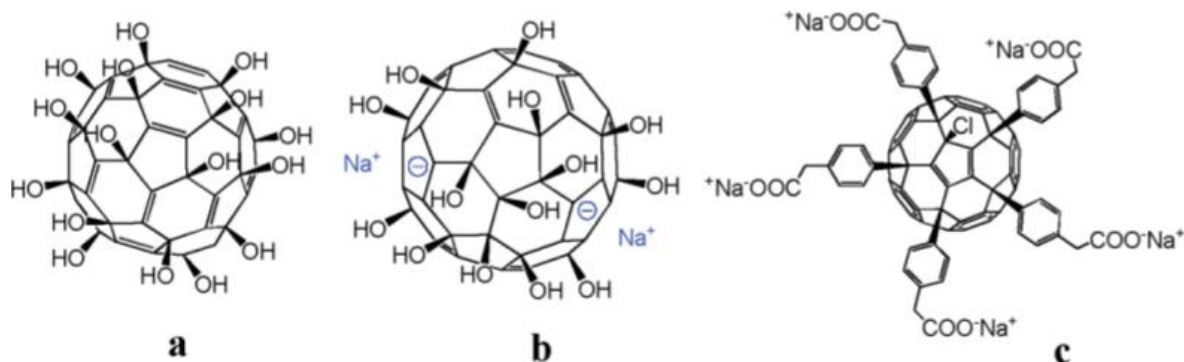


Рисунок 16. Структуры производных фуллерена. А – фуллеренол, Б – фуллеренолат натрия, С – NaPCF.

В литературе описано интересное свойство фуллеренов ингибировать аллергические реакции, воздействуя на тучные клетки. Производные фуллеренов стабилизируют оболочку тучных клеток и ингибируют испускание ими медиаторов воспаления [62]. Это свойство важно также для аллергических астм и болезней, схожих с ними, так как тучные клетки легких являются единственными клетками в данном органе, хранящими готовый TNF- $\alpha$  в гранулах и готовыми выпустить его при встрече с аллергеном. В связи с тем, что астма у тяжелых пациентов или пациентов, которые не реагируют на терапию стероидами, с трудом поддается лечению и контролю, исследование новых веществ, которые позволят снизить интенсивность и частоту приступов, очень важно. Согласно исследованиям [63], производные фуллеренов обладают способностью подавлять болезнь на начальной стадии, а также улучшать течение уже развитой астмы, что является особенно важным, так как противоастматическая терапия назначается только после подтверждения диагноза. Мыши, получавшие производные фуллерена C<sub>60</sub> и тетрагликолевой кислоты, не развивали бронхоспазм и воспаление. А у животных, получавших соответствующие производные на всем протяжении развития болезни, уровень эозинофилии и концентрации цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости оказался существенно ниже по сравнению с положительным контролем.

Производные фуллеренов предложено использовать в качестве противомикробных препаратов в фотодинамической терапии. В связи с тем, что все бактерии легко приобретают резистентность к используемым антибиотикам, в мире появляется все большее количество мультирезистентных бактерий. Заболевания,



вызванные подобными микроорганизмами, крайне трудно лечить в связи с ограниченностью вариантов воздействия. Поиск антибиотиков с принципиально новым механизмом действия представляет собой трудную задачу, альтернативой которой может быть использование других противомикробных препаратов. Фуллерен со сложной структурой (рисунок 17) оказывал противомикробное действие на три разных вида патогенов: грам-положительные устойчивые к метициллину бактерии *Staphylococcus aureus* (MRSA), грам-отрицательные бактерии *Escherichia coli* и грибы *Candida albicans*. Эффективность воздействия зависела от интенсивности освещения и концентрации фотосенсибилизатора, при этом УФ-излучение давало лучшие результаты [61].

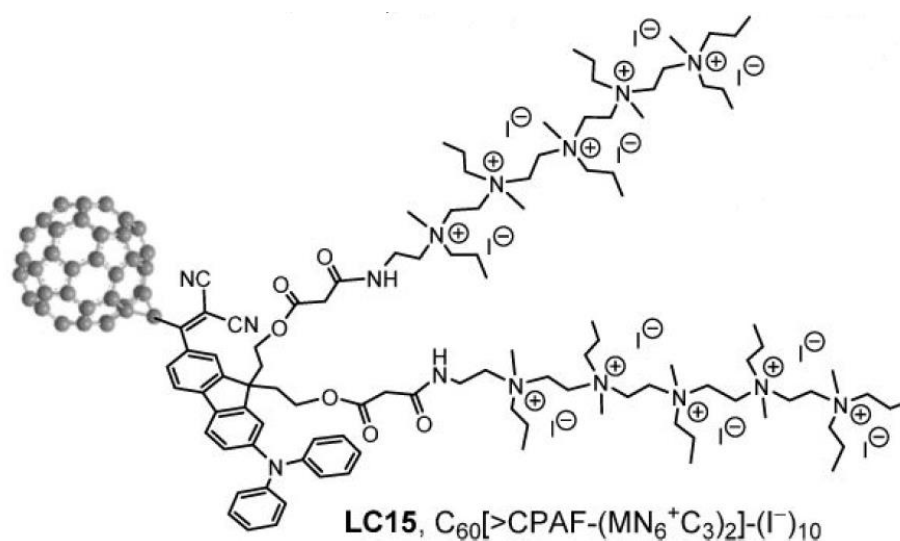


Рисунок 17. Фуллерен со сложной структурой.

Метилпирролидиновое производное фуллерена C<sub>60</sub> показало свою эффективность в качестве фотосенсибилизатора для противомикробной фотодинамической терапии. В экспериментах *in vivo* раны у мышей без обработки производным и у мышей, раны которых обрабатывались исследуемым соединением, но не облучались, оказались влажными и обнаруживали обилие бактерий, тогда как раны, обработанные фотодинамически в присутствии метилпирролидинового производного оставались чистыми в течение трех дней после обработки. Производное активно против золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* и не являлось токсичным для кератиноцитов человека, таким образом, оно может являться потенциальным фотосенсибилизатором для поверхностных ран [9].

Еще одним потенциальным применением производных фуллерена является биовизуализация. Показано, что при культивировании клеток НерG-2 с флуоресцентным нановолокном, состоящим из наночастиц фуллерена C60 и полилактида, наночастицы проникают в ядра клеток (рисунок 18). При возбуждении светом с длиной волны 405 нм ядра клеток начинают флуоресцировать в красной области спектра [65].

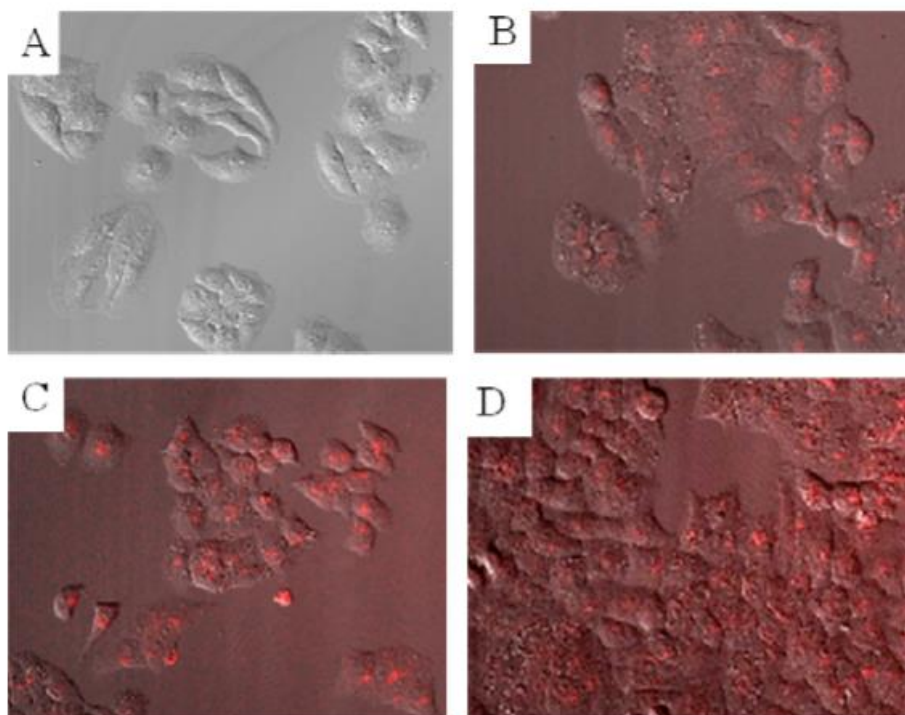


Рисунок 18. Клетки НерG-2: А – контроль, В, С, D с флуоресцентным нановолокном, состоящим из наночастиц фуллерена C60 и полилактида (12, 24, 48 ч).

### 1.1.8. Модели для исследования фуллеренов

Фуллерены имеют множество потенциальных применений в медицине. Однако прежде чем использовать их в качестве векторов для доставки веществ в клетку, противораковых препаратов или антиоксидантов, необходимо тщательно исследовать влияние производных фуллеренов на различные клетки человека, так как в клетках с разным пролиферативным потенциалом соединения могут вызывать разный ответ. Кроме того, в связи с уникальными физико-химическими свойствами начинается использование фуллеренов в промышленности, например, в электронике и в производстве противопожарных красок.

Для исследования выбраны клетки человека с разным пролиферативным потенциалом: эмбриональные фибробласты легкого человека, мезенхимальные стволовые клетки человека, полученные из жировой ткани и раковые клетки линии MCF7.

*а) Эмбриональные фибробласты легкого человека.*

Эмбриональные фибробласты являются хорошей клеточной моделью для исследования влияния различных соединений на клетки человека. Фибробласты легко культивировать, клетки дают хорошую повторяемость в ответе на исследуемые вещества. Кроме того, очевидным преимуществом фибробластов в качестве клеточной модели является то, что профиль экспрессии их генов мало меняется со временем.

*б) Мезенхимальные стволовые клетки.*

Мезенхимальные стволовые клетки могут быть выделены из жировой ткани. Они обладают способностью дифференцироваться в адипоциты (адипогенная дифференцировка), остеоциты (остеогенная дифференцировка) и миоциты (миогенная дифференцировка). В литературе показано, что стволовые клетки, выделенные из жировой ткани, обычно обладают следующими характеристиками. Они несут на своей поверхности маркеры CD13, CD29, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, MHC (I), HLA-ABC и при этом на их клеточной поверхности отсутствуют маркеры CD38, CD45, CD106, HLA-DR, DP, MHC (II), CD80, CD86, CD40, CD154 [66].

Данные клетки имеют ряд минусов, свойственных для клеток, выделяемых из организма (в отличие от клеточных линий): клетки, полученные от разных пациентов, в особенности различных возрастов, а также взятые из разных жировых прослоек, могут обладать различными характеристиками, так, показано, что стволовые клетки, выделенные из жировой ткани молодых пациентов обладают большим пролиферативным потенциалом, чем клетки, выделенные из тканей возрастных пациентов [67]. Клетки, взятые из абдоминальной жировой прослойки, наименее склонны к апоптозу у пациентов всех возрастов. Клетки, полученные из жировой ткани пациентов мужского пола, гораздо более склонны к остеогенной дифференцировке, чем клетки пациентов женского пола [68].

Направленная дифференцировка стволовых клеток представляет важную задачу, так как образующиеся миоциты можно использовать для лечения обширных травм или миодистрофических болезней, например, мышечной дистрофии Дюшенна, Ландузи-Дежерина или миотонической дистрофии. Эти заболевания на данный момент не лечатся.

Регенеративная медицина, основанная на клеточной терапии, могла бы помочь таким больным. МСК легко выделить, эти клетки обладают относительно высокой скоростью экспансии и хорошей миграционной способностью, кроме того, они не вызывают аллогенных реакций после трансплантации. В связи с этим МСК могут являться источником клеток для замены поврежденной мышечной ткани. Поэтому поиск индукторов миогенной дифференцировки МСК является актуальной задачей.

Миогенная дифференцировка МСК происходит при активации специфических транскрипционных факторов: MYOD, MYF5, MRF4, миогенин и др [69]. Установлено, что важную роль в миогенной дифференцировке играет аутофагия [70].

*в) Раковые клетки линии MCF7.*

MCF7 – это клеточная линия аденокарциномы молочной железы, выделенная из плеврального излияния метастатического рака. Данная клеточная линия – очень распространенная модель для изучения влияния различных веществ на клетки рака.

Клетки линии MCF7 чувствительны к эстрогену и являются представителями одного из наиболее часто встречающихся типов рака – рака молочной железы. Они обладают относительно низким метастатическим потенциалом и легко поддаются культивированию. В биомедицинских исследованиях эту модель используют уже более 40 лет.

### **1.1.9. Сигнальные пути и транскрипционные факторы, активирующиеся в клетках под влиянием производных фуллеренов**

Транскрипционные факторы - это белки, которые связываются с определенными участками ДНК за счет наличия в их структуре ДНК-связывающих доменов и регулируют (усиливают или подавляют) транскрипцию генов-мишеней. Они могут активироваться в ответ на изменения в окружающей среде или через активацию сигнальных каскадов, подвергаясь фосфорилированию/дефосфорилированию и образуя комплексы с белками-регуляторами. Так как ДНК находится в ядре клетки, а биосинтез белка происходит в цитоплазме, ключевым событием в активации транскрипционных факторов является их транслокация в ядро клетки.

*а) NF-κB - сигнальный путь.*

NF-κB (Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells) - универсальный транскрипционный фактор, вовлеченный в регуляцию воспалительных процессов,

апоптоза, клеточного цикла и др. NF-κB регулирует экспрессию цитокинов, хемокинов, клеточных рецепторов и молекул клеточной адгезии [71]. NF-κB представляет собой димеры различного состава, которые получаются при комбинации пяти белков: p65 (RelA), c-Rel, RelB, NF-κB1 и NF-κB2 [71]. Все белки семейства NF-κB содержат гомологичный домен Rel, который позволяет им образовывать димеры и связываться с последовательностью ДНК GGGRNNYYCC, (где R - пурины, Y - пиримидины, N - любые основания) [73].

В отсутствие стимулов транскрипционный фактор NF-κB находится в цитоплазме в виде неактивного комплекса с белком-ингибитором IκB, который закрывает ДНК-связывающий домен NF-κB [74]. В ответ на стимуляцию клеток различными агентами белки IκB могут быстро фосфорилироваться киназой IκK (IKK) по специфическим остаткам серина, убиквитинилироваться и, в результате этих модификаций, деградироваться протеасомой 26S, при этом транскрипционный фактор NF-κB освобождается и способен транслоцироваться в ядро клетки [71]. Активация NF-κB и его перемещение в ядро активирует экспрессию огромного количества генов, играющих роль в регуляции иммунного ответа, воспалении, выживании клеток и их пролиферации, а также в ангиогенезе и метастазировании [75, 76].

Влияние фуллеренов и их производных на активность транскрипционного фактора NF-κB изучено мало, однако известно, что другие наносоединения углерода, а именно нанотрубки, увеличивают экспрессию этого транскрипционного фактора, а также его мишеней [77]. Замечено, что некоторые углеродные нанотрубки повышают уровень АФК, активируя сигнальный путь MAPK, который, в свою очередь, активирует NF-κB-сигнальный путь и, таким образом, регулирует апоптоз [78].

*б) NRF-2 - сигнальный путь.*

NRF2-антиокислительный ответ направлен на уничтожение активных форм кислорода, образующихся в клетке под действием внешних факторов, и усиление работы антиоксидантных систем клетки. В норме транскрипционный фактор NRF2 в клетке находится в инактивированном состоянии за счет образования комплекса с белком цитоскелета KEAP1. Окислительный стресс вызывает перемещение NRF2 в ядро, где он может связываться с ARE (antioxidant response elements). ARE - это цис-регуляторные элементы, регулирующие экспрессию генов, которые кодируют цитопротекторные белки

и ферменты детоксикации, а именно HO-1 (гемоксигеназу-1), NQO1 (NADPH хинон оксидоредуктазу-1) и GSTA2 (глутатион S- трансферазу A2) [78].

NRF2 - это белок, который содержит 605 аминокислот и экспрессируется в широком диапазоне различных типов клеток. Молекула NRF2 состоит из шести консервативных доменов – NEH 1-6 (NRF2-ECH homology) [80]. Домен NEH 1 обеспечивает связывание с белками small MAF (musculoaroneurotic fibrosarcoma). Домен NEH 2 является областью связывания NRF2 с KEAP1. NEH 3 - это ко-активаторный домен, способствующий транскрипции ARE[81]. NEH 4 и NEH 5 способны связываться с ацетилтрансферазой CREB (сAMP Responsive Element Binding protein), что ведет к деконденсации хроматина и вовлечению в сигнальный каскад следующих транскрипционных факторов. Домен NEH6 необходим для деградации NRF2 [80].

В результате активации генов-мишеней в NRF2-сигнальном пути происходит ряд событий, направленный на выживание клетки: экспрессируются ферменты, которые непосредственно элиминируют оксиданты, повышается уровень синтеза глутатиона, увеличивается уровень NADPH, усиливается экспорт токсина, репарация и удаление поврежденных белков, повышается активность систем, отвечающих за репарацию нуклеотидов, а также ингибируется цитокин-опосредованное воспаление [82].

Для взаимодействия с ДНК фактору NRF2 необходимо образовать гетеродимеры с другими транскрипционными факторами, обладающими доменом bzip, такими как белки семейства малых Maf (MafF, K и G), ATF4 и c-Jun в ядре (Рисунок 2.24) [83]. Ядерная транслокация NRF2 может также произойти после фосфорилирования некоторых остатков треонина или серина NRF2 - киназами, такими как протеинкиназа C, митоген-активированные протеинкиназы (MAPK), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/Akt, и казеинкиназа 2 [82, 83].

О влиянии различных производных фуллерена на активность транскрипционного фактора NRF2 известно мало. Показано, что фуллеренолы C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> в концентрации 100 мкМ вызывают транслокацию NRF2 в ядро в клетках карциномы легкого человека A549. Также выяснено, что фуллеренол замедляет клеточную смерть при окислительном стрессе, часть этого эффекта достигается как раз за счет активации фактора NRF2. [84]

## 1.2. Транскрипционные факторы, ответственные за миогенную дифференцировку (Myog, MyoD, MYF5, MRF4)

В миогенной дифференцировке МСК задействованы несколько специфических миогенных факторов транскрипции, включая MYOD, MYF5, миогенин и MRF4 [92 - 94]. Эти факторы также участвуют в восстановлении мышечной ткани после травм [93]. Миогенная дифференцировка регулируется различными биохимическими путями. В том числе, показано, что аутофагия играет важную роль в механизме миогенной дифференцировки МСК [70].

Транскрипционный фактор MYOD контролирует экспрессию ранних генов при дифференцировке - молекул адгезии, клеточного матрикса; промежуточных генов факторов транскрипции; и поздних генов, кодирующих белки цитоскелета [94]. MYOD активирует активность транскрипции в ранее «молчащих» локусах, действуя как ген «мастер-переключатель», что способствует превращению клеток разных линий и стадий дифференцировки в клетки скелетных мышц.

Ген MYF5 активируется в ранний период дифференцировки, однако отмечается, что уровень мРНК может сохраняться повышенным во время процесса дифференцировки МСК, уменьшаясь только в поздний период дифференцировки [95 - 97].

В ряде работ отмечается снижение уровня экспрессии белка MYF5 при прогрессии клеточного цикла в результате протеолитической деградации [98,99], что связывается с прекращением пролиферативных сигналов. Однако, фуллерен F-827 имеет длительный период выведения из МСК, что способствует постоянной инициации дифференцировки и повышению экспрессии MYF5. Кроме того, показано, что в отличие от процесса миогенной дифференцировки у мышей, где повышенная экспрессия белка MYOD считается отличительной особенностью дифференцировки, MYOD1 обнаружен в ~ 5% стволовых клеток скелетных мышц человека, в то время как MYF5 обнаружен в ~ 90% клеток [97]. Перекрестные взаимодействия между генами также отличаются у человека и мыши - нокдаун MYOD1 в стволовых клетках скелетных мышц человека не влияет на экспрессию MYF5, а отмечается положительное регуляторное взаимодействие, при котором MYF5 прямо или косвенно усиливает экспрессию MYOD1 [97], тогда как в стволовых клетках у мышей нокдаун MYOD1 приводит к увеличению экспрессии белка MYF5 [100].

Как *in vitro*, так и *in vivo* экспрессия миогенина предшествует терминальной дифференцировке стволовых клеток и контролирует синтез белков, составляющих сократительный аппарат клеток [101].

В ряде работ отмечается, что период полувыведения мРНК миогенина длиннее периода полувыведения белка миогенина [102]. Миогенин играет ключевую роль в миогенезе у мышей, однако, у человека существуют механизмы компенсации, способствующие миогенной дифференцировке стволовых клеток в отсутствие экспрессии миогенина [103].

MRF4 является маркером позднего времени мышечной дифференцировки, MRF4 отвечают за терминальную дифференцировку мышечных волокон [104].

### **1.3. Ферменты, принимающие участие в синтезе АФК, NOX4**

В связи с тем, что некоторые производные фуллеренов вызывают увеличение синтеза активных форм кислорода в клетке, принято решение исследовать это явление.

Семейство NADPH - оксидаз состоит из пяти ферментов NOX 1-5 и DUOX 1 и 2 [105]. Ферменты NOX (1-5) - это трансмембранные оксидоредуктазы, состоящие из шести трансмембранных компонентов и с цитоплазматическим С-концом, содержащим ФАД - и НАДФ - связывающие области. NADPH - оксидазы способны связывать NADPH в С-концевой области и переносить электроны на два железосвязывающих остатка, а затем на молекулярный кислород. При этом образуется короткоживущий радикал  $O_2\bullet$ , который сначала преобразуется в перекись водорода ( $H_2O_2$ ), а после в гидроксил-радикал ( $\bullet OH$ ) или в кислород и воду под действием каталазы. [106].

NOX4 является одной из самых распространенных изоформ NOX [107]. Количество активных форм кислорода (АФК) производимых NOX4, в первую очередь, регулируется на уровне транскрипции [106]. Хотя в последнее время появились доказательства посттрансляционного контроля уровня АФК, производимых NOX4 [105].

Ген, кодирующий NOX4, находится на хромосоме 11 и содержит 34 интрона; фермент NOX4 состоит из 578 аминокислот, молекулярная масса – 67 кДа [106]. В результате альтернативного сплайсинга образуется 16 изоформ, отличающихся друг от друга отсутствием фрагментов разной длины, разные варианты сплайсинга NOX4 локализуются в разных компартментах клеток [106].



Фермент NOX4 активен в фибробластах, нейронах, клетках эндотелия, гемопоэтических стволовых клетках, в клетках гладких мышц, кардиомиоцитах, адипоцитах, клетках меланомы, эмбриональных стволовых клетках, эпителиальных клетках, хондроцитах и т.п. [106]. Показано, что NOX4 локализован не только на мембране клеток, но и на структурах внутри клетки, что может определять различную активность фермента, тип продуцируемых АФК, активацию различных путей передачи сигнала [105].

Активность промотора NOX4 регулирует ряд факторов транскрипции: NF-κB, SMAD2/3, E2F, HIF1α, NRF2, пути активации, вероятно, также зависят от стимулов и типа клеток [108].

#### **1.4. Заключение по данным литературы**

В литературе содержится огромное количество данных о потенциальных применениях фуллеренов и их производных в разных сферах медицины. Кроме того, имеются разрозненные данные, касающиеся токсичности и влияния фуллеренов и их производных на клетки млекопитающих. Прежде чем переходить к применению данных соединений в медицине, необходимо тщательным образом исследовать их влияние на различные клетки человека, диапазоны нетоксичных концентраций, цито- и генотоксичность.

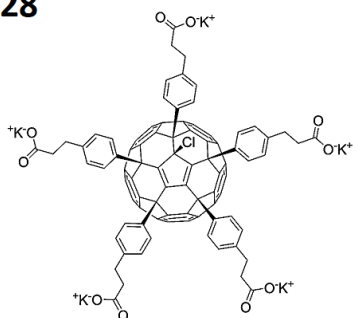
Помимо использования в медицине, производные фуллеренов предполагается также использовать в технике, поэтому важно исследовать, насколько токсичными эти соединения окажутся при контакте с клетками человека, будут ли они проникать в клетки, могут ли оказывать влияние на активацию генов сигнальных путей.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

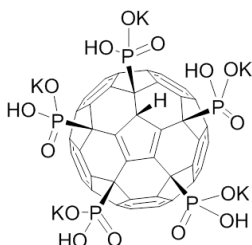
### 2.1. Объект исследований

Объектом исследований являлись различные новые водорастворимые производные фуллерена C<sub>60</sub>, предоставленные лабораторией П.А. Трошина (ИПХФ РАН, г. Черноголовка). Образцы представляли собой очищенные порошки с окраской от ярко-рожей до черно-бурой. Растворимость образцов в воде в основном колебалась в пределах 10 мг/мл. Структуры исследуемых производных представлены на рисунке 19.

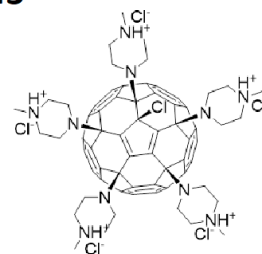
**828**



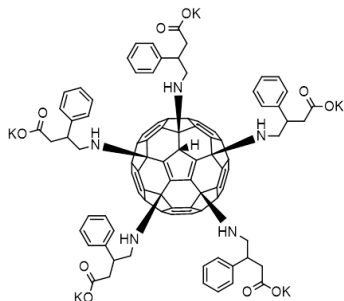
**827**



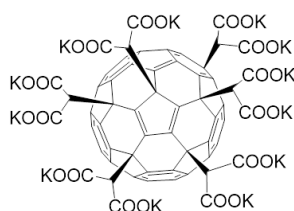
**243**



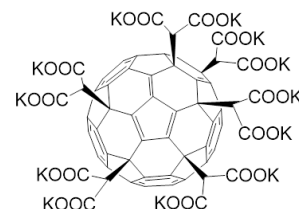
**G1 - 761**



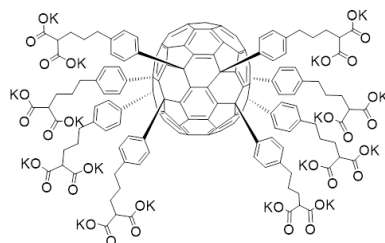
**OKR - 111**



**OKR - 112**



**V1 - 419 - P3K**



**vi - 434K2**

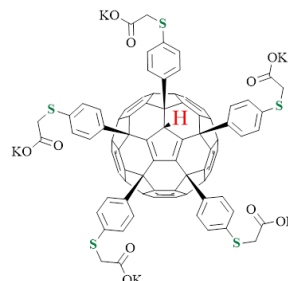


Рисунок 19. Химические структуры исследованных водорастворимых производных фуллерена.

## **2.2. Определение флуоресценции**

Растворы производных фуллеренов в воде и среде для культивирования клеток помещали в 96-луночный планшет и записывали спектры поглощения и испускания на люминесцентном спектрометре «LS 55» («PerkinElmer», Англия). В качестве фоновых значений использован спектр растворителя.

## **2.3. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток**

МСК выделены из жировой ткани больных с аденокарциномой молочной железы, полученной из ФГБУ «РОНЦ им. Блохина» РАМН (г. Москва) в течение 60 мин после операции по резекции опухоли [109]. Образцы механически измельчались в среде культивирования ДМЕМ («ПанЭко», Москва), содержащей 60 Ед/мл пенициллина, 250 мкг/мл гентамицина и 60 Ед/мл стрептомицина («ПанЭко»). Далее измельченные образцы ферментативно диссоциировались в среде ДМЕМ инкубацией препарата в присутствии 0,04% коллагеназы («Sigma»), тех же антибиотиков и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («РАА», Австрия) в течение 16 ч при температуре 37°C [109]. Затем клетки центрифугировали (200g, 10 мин) и переносили во флаконы, где их культивировали при температуре 37°C в среде AmnioMax C-100 Basal Medium («Gibco»), которая содержала AmnioMax Supplement C-100, 20 мкмоль/л HEPES («ПанЭко»), а также антибиотики [109].

## **2.4. Культивирование эмбриональных фибробластов легкого человека**

Для эксперимента использовались клетки эмбриональных фибробластов легкого человека (HELFL) 4-го пассажа. Клетки получены из коллекции культур клеток ФГБУ «МГНЦ» РАМН. Плотность посева составляла примерно 30 тыс/лунку, культивирование проводилось при температуре 37°C в среде ДМЕМ («ПанЭко»), обогащенной 20%-ной телячьей сывороткой (РАА, Австрия). Также в среде находились 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10 мг/мл гентамицина.

Фибробласты в обедненной сывороткой среде выращивались аналогичным образом, но концентрация телячьей сыворотки составляла 5% вместо обычных 20%.

## **2.5. Культивирование клеток линии MCF7 рака молочной железы**

Клетки раковой линии MCF7 куплены в ATCC (США, Кат. № HTB-22). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10%-ную телячью сыворотку, 2 мМ L-

глутамин, 100 Ед/мл пенициллин и 100 мкг/мл стрептомицин. Клетки растили во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C.

## **2.6. Инкубация клеток с фуллеренами**

Раствор фуллеренов добавляли к среде культивируемых клеток в разном объеме. Затем клетки инкубировали с веществами в течение 5 мин, 0,5 ч, 1 ч, 3 ч, 24 ч, 72 ч. Для исследования дифференцировки МСК клетки инкубировали с производными фуллеренов в течение 1, 2 и 3 недель, среду меняли раз в неделю, добавляя новые порции исследуемых веществ.

## **2.7. МТТ-тест**

МТТ-тест проводили в 96 луночных планшетах. Раствор МТТ (метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид) готовили из расчета 5 мг вещества на 1 мл стерильной воды. Клетки инкубировали с исследуемыми производными фуллеренов в течение 1 или 3 дней, затем среду для культивирования заменяли на раствор МТТ и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C в атмосфере 7,5% CO<sub>2</sub>, затем планшет сливали, заполняли ДМСО и инкубировали 15 мин при температуре +5°C. После этого флуоресценцию окрашенного продукта измеряли на приборе EnSpire Equipment (Финляндия), длина волны возбуждения составляла  $\lambda_{ex} = 488$  нм, длина волны испускания  $\lambda_{em} = 528$  нм.

## **2.8. Определение количества активных форм кислорода**

Уровень активных форм кислорода (АФК) исследовался с помощью красителя 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (H<sub>2</sub>DCFH-DA) («MolecularProbes/Invitrogen», «СА», США) [110]. Это нефлуоресцирующее вещество окисляется под действием АФК с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF). H<sub>2</sub>DCFH-DA добавляли к клеткам до получения конечной концентрации 5 мкМ, инкубировали 10 мин. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буфером и анализировали. Количество АФК определяли флуориметрически в 96-луночных планшетах на приборе EnSpire Equipment (Финляндия), длина волны возбуждения составляла  $\lambda_{ex} = 488$  нм, длина волны испускания  $\lambda_{em} = 528$  нм. Кроме того, АФК детектировались методом проточной

цитометрии (Partec CyFlow® ML, Германия) и флуоресцентной микроскопии (Axio Vert, «Carl Zeiss Microscopy», Германия).

Константа скорости образования DCF рассчитывалась по углу наклона прямой на графике зависимости уровня флуоресценции от времени.

### **2.9. Определение одно- и двуцепочечных разрывов ДНК методом комет.**

Одно- и двуцепочечные разрывы ДНК определяли стандартным методом ДНК-комет, адаптированным под конкретные условия [111]. Для этого клетки подвергали воздействию трипсина (0,25% раствор трипсина, «ПанЭко», Россия), помещали в 1%-ный раствор легкоплавкой агарозы («Sigma», США) на 30 мин при температуре 37°C, затем наносили на стекла с 1,5%-ной агарозой («Sigma», США). Полученный препарат обрабатывали раствором, содержащим 2,5 моль/л NaCl, 1% N-лаурилсаркозинат, 0,1 моль/л EDTA (pH 10,0), 10% DMSO, 10 ммоль/л Tris (pH 9,6) и 1% Triton X-100 при температуре 25°C в течение 2 чов. После этого промывали дистиллированной водой, переносили в электрофорезную камеру, наполненную щелочным буфером, содержащим 0,3 моль/л NaOH и 1 ммоль/л EDTA (pH 10,0) на 20 мин при температуре 15°C и силе тока 300 мА. Препараты фиксировали 70%-ным раствором этанола, окрашивали 10%-ным раствором этидий бромид («ПанЭко», Россия). Кометы детектировали с помощью флуоресцентной микроскопии (увеличение×40) и программного обеспечения CASPlab.

### **2.10. Связывание аннексина V**

Для определения уровня связывания аннексина V клетки снимали, промывали ФСБ, затем обрабатывали флуоресцентно меченным Аннексином-ФИТЦ и пропидий йодидом в буфере, содержащем 10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, при температуре 20 °C в течение 15 мин. Затем клетки анализировали на проточном цитофлуориметре (Partec, Германия).

### **2.11. Метод $\gamma$ -фокусов**

Двуцепочечные разрывы ДНК в ядрах клеток определяли с помощью антител к фосфорилированной по серину 139 форме гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX). [111]. Клетки фиксировали 2%-ным параформальдегидом («ХимМед», Россия) в течение 15 мин при температуре 25°C, затем обрабатывали 0,2%-ным раствором Тритона X-100 («Merck»,

Германия) и отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). После этого блокировали в 3%-ном растворе БСА и инкубировали с первичными антителами в течение 1 часа при температуре 24°C, отмывали и инкубировали со вторичными антителами 45 минут при температуре 24°C, после чего окрашивали DAPI. Флуоресценцию детектировали методом флуоресцентной микроскопии (Axio Vert, «Carl Zeiss Microscopy», Германия), а также проточной цитометрии (Partec CyFlow® ML, Германия).

### **2.12. Выделение РНК и определение ее концентрации**

Тотальную РНК выделяли набором RNeasy Mini kit (Qiagen, Германия) по стандартной методике набора и обрабатывали ДНКазой I. Выделенную РНК хранили при температуре -70°C.

Концентрацию полученной РНК определяли флуориметрически на люминесцентном спектрофлуориметре "LS 55" ("PerkinElmer", Англия). Использовали РНК-связывающий краситель Quant-iT™ RiboGreenRNAreagent (MoViTec) с длиной волны возбуждения  $\lambda_{\text{возб}} = 487$  нм и длиной волны испускания  $\lambda = 524$  нм. Краситель разводили в соотношении 1 : 2000 в буфере TE, содержащем 0.01 М Tris-HCl с pH 7.5 и 0.001 М ЭДТА и смешивали с 5 мкл раствора РНК. Далее измеряли флуоресценцию раствора. Стандартная относительная ошибка определения составляет 5%.

### **2.13. Обратная транскрипция**

Обратную транскрипцию выполняли с помощью реактивов фирмы "Силекс" (Россия) при использовании гексануклеотидных праймеров произвольной последовательности. Для этого смешивали 5 мкл РНК, 1 мкл гексапраймеров и 12 мкл mQ воды. Полученный раствор нагревали до 70°C и выдерживали в течение 5 минут, затем помещали в холод на 10 минут, центрифугировали, добавляли 2,5 мкл ОТ-буфера, 4 мкл 1,5 мМ dNTP и 0,5 мкл обратной транскриптазы M-MLV. Полученный раствор выдерживали 10 минут при температуре 25 °C, а затем 60 минут при температуре 34 °C.

### **2.14. Определение уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени**

Для проведения ПЦР в реальном времени проведен выбор гена внутреннего стандарта из шести разных генов, наиболее часто используемых в литературе: *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), *TBP* (белок, связывающийся с ТАТА-

последовательностью), *βACT* ( $\beta$ -актин), *HRPT* (гипоксантинфосфорибозилтрансфераза 1), *B2M* ( $\beta$ -2микроглобулин), *PPIA* (пептидилпропилизомераза А) [113-116]. Выбран *TBP* как ген, наименее подверженный изменению при воздействии. ПЦР проводили с праймерами “Синтол” и интеркалирующим красителем SybrGreen на приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США). Реакционная смесь состояла из (в расчете на 25 мкл): 2,5 мкл ПЦР буфера (700 ммоль/л Tris-HCl, pH 8,6; 35 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 166 ммоль/л сульфата аммония), по 1 мкл 30 пкмоль/л раствора праймеров, 2 мкл 1,5 ммоль/л раствора dNTP, 1 мкл кДНК. Условия для проведения ПЦР подбирались индивидуально для каждой пары праймеров. Стандартными для большинства праймеров являются следующие условия. После денатурации при температуре 95°C в течение 4 мин проводят 40 циклов амплификации в режиме: 94°C – 20 сек, (56 - 62)°C – 30 сек, 72°C - 30 сек. Затем выдерживают при температуре 72°C в течение 5 мин.

Уровень экспрессии генов анализировали в нескольких независимых экспериментах, результаты обрабатывали в программном обеспечении прибора для ПЦР. Ошибка составляла примерно 2%.

Данные, полученные в ходе ПЦР в реальном времени, можно обрабатывать двумя методами: с помощью калибровочного графика, либо прямо сравнивая полученные данные. Методы обработки данных ПЦР в реальном времени основаны на применении уравнения:  $C(T) = - (1/\log E) * \log N_0 + \log NC(T)/\log E$ , где  $C(T)$  – пороговый цикл реакции (threshold cycle),  $E$  – эффективность реакции,  $N$  – количество продуктов реакции на цикле  $c(T)$ ,  $N_0$  – количество целевых молекул в начале реакции. При использовании метода калибровочного графика необходимо построить график в координатах  $C(T)$  от  $\log N_0$  с различным разведением субстрата ДНК. Затем с помощью этого графика находят концентрацию ДНК в исследуемых образцах. Нашей задачей являлось определение относительной концентрации субстрата, поэтому для построения калибровочного графика использовали серию разведений разных экспериментальных образцов и сравнили эффективности. Разброс значений при использовании серийных разведений составила 1,2%. Все экспериментальные значения попадали в область построенной линейной калибровочной прямой.

Эффективность реакции рассчитывают как  $E = 10^{-1/k}$ , где  $k$  берется из уравнения прямой  $C(T) = k \cdot \log N_0 + b$ , которая получается при линейной аппроксимации экспериментальных данных. При  $E = 2$  (или 100% (часто заменяем на 1) максимально

теоретически возможном значении)  $k \sim -3,32$ . В нашем случае  $k > -3,8$ , а эффективность  $E > 1,82$  (или  $>91\%$ , часто заменяем на  $>0,91$ ). Условия ПЦР (и эффективность амплификации) серии стандартов (гены *GAPDH*, *TBP*) близки к условиям ПЦР исследуемых образцов. Поэтому проводилось прямое сравнение данных экспрессии исследуемых генов в программном обеспечении прибора для ПЦР StepOnePlus («Applied Biosystems», США). Данные, полученные с использованием программы прибора и посчитанные при сравнении концентраций на основе калибровочных кривых, совпадают. В серии опытов получена хорошая воспроизводимость результатов, ошибка составила  $\sim 2\%$ .

Использованы следующие праймеры:

*TBP* (F: 5'-GCCCGAAACGCCGAATAT-3'; R: 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTCT-3');  
*GAPDH* (GAAGGTGAAGGTCGGAGTC; GAAGATGGTGATGGGATTTTC);  
*NOX4* (TTGGGGCTAGGATTGTGTCTA; GAGTGTTTCGGCACATGGGTA);  
*SELE* (CAGCAAAGGTACACACACCTG; CAGACCCACACATTGTTGACTT);  
*SOD1* (AGGGCATCATCAATTTTCGAGC; GCCCACCGTGTTTTCTGGA);  
*BCL2* (TTTGAAATCCGACCACTAA; AAAGAAATGCAAGTGAATGA);  
*BCL2A1* (TACAGGCTGGCTCAGGACTAT; CGCAACATTTTGTAGCACTCTG);  
*BCL2L1* (CGACGAGTTTGAACCTGCGGTA; GGGATGTCAGGTCACCTGAATG);  
*NF-KB1* (CAGATGGCCCATACCTTCAAAT; CGGAAACGAAATCCTCTCTGT);  
*BIRC2* (GAATCTGGTTTCAGCTAGTCTGG; GGTGGGAGATAATGAATGTGCAA);  
*BIRC3* (AAGCTACCTCTCAGCCTACTTT; CCACTGTTTTCTGTACCCGGA);  
*TNF* (ATCAATCGGCCCGACTATCTC; GCAATGATCCCAAAGTAGACCTG);  
*IL6* (AAATTCGGTACATCCTCGACGGCA; AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCACAC);  
*CCND1* (TTCGTGGCCTCTAAGATGAAGG; GAGCAGCTCCATTTGCAGC);  
*CDKN2A* (ATGGAGCCTTCGGCTGACT; GTAACATTCGGTGCCTTGGG);  
*BRCA1*(GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTTA;  
GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGGT);  
*NF-KB1* (CAGATGGCCCATACCTTCAAAT; CGGAAACGAAATCCTCTCTGT);  
*MYOD1* (GGTCCCTCGCGCCCAAAAGAT; GTTCTCCCGCCTCTCCTAC);  
*MYOG* (AGTGCACTGGAGTTCAGCG; TTCATCTGGGAAGGCCACAGA);  
*MYF5* (CTGCCAGTTCTCACSTTCTGA; CGTCCCCAAATTCACCCTCG);  
*MRF4* (AATCTTGAGGGTGCGGATTTTC; CTCCTCCTTCCTTAGCCGTTA);



*RUNX2* (CCGTCTTCACAAATCCTCCCC; CCCGAGGTCCATCTACTGTAAC);  
*SPP1* (CTCCATTGACTCGAACGACTC; GGTCTGCGAAACTTCTTAGAT);  
*OCN* (CCCTCACACTCCTCGCCCTATT; AAGCCGATGTGGTCAGCCAACTCGT);  
*LPL* (ACAAGAGAGAACCAGACTCCAA; GGTAGTTAAACTCCTCCTCC);  
*AP2* (TGTGCAGAAATGGGATGGAAA; CAACGTCCCTTGGCTTATGCT);  
*PPARG* (ACCAAAGTGCAATCAAAGTGGA; AGGCTTATTGTAGAGCTGAGTCT);  
*NRF2* (TCCAGTCAGAAACCAGTGGAT; GAATGTCTGCGCCAAAAGCTG);  
*KEAP1* (GTGGTGTCCATTGAGGGTATCC; GCTCAGCGAAGTTGGCGAT).

## 2.15. Определение уровня экспрессии белков

Клетки промывали раствором Версена, выдерживали в 0,25% растворе трипсина, промывали средой для культивирования и ресуспендировали в ФСБ. Для фиксации клеток использовали раствор параформальдегида (PFA, Sigma) в концентрации 2%. Клетки выдерживали в этом растворе при температуре 37°C в течение 10 мин. Затем клетки отмывали три раза раствором ФСБ, содержащим 0,5% бычьего сывороточного альбумина. После этого их пермеабелизовали 0,1% раствором TritonX-100 в ФСБ в течение 15 мин при температуре 20°C или 90% метанолом при 4°C. Затем клетки промывали 0,5% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ и окрашивали антителами в концентрации 1 мкг/мл в течение 2 ч при температуре 4°C, а после отмывали три раза 0,5% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ и инкубировали 2 ч при температуре 20°C с конъюгатом, меченным FITC. Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре (Partec CyFlow® ML, Германия).

Химическая структура фуллеренов такова, что они могут быть потенциальными тушителями флуоресценции. Поэтому проведен эксперимент, позволяющий оценить изменение сигнала антител и пропидий йодида в присутствии фуллеренов. Оказалось, что при фиксации клеток фуллерен вымывается и поэтому не оказывает влияния на интенсивность флуоресценции антител и пропидий йодида в клетках.

В работе использовались следующие антитела: FITC-γH2AX (pSer139) (Temecula, США); FITC-Ki-67, EEA1, PCNA, VECLIN, NRF2, NF-κB (p65), NF-κB (p65) (pSer529), NOX4, и вторичные антитела, меченные FITC (коза анти-кролик IgG, Abcam). Для оценки фоновой флуоресценции клетки окрашивались только вторичными флуоресцентно-меченными антителами.

## **2.16. Флуоресцентная микроскопия**

Фотографии клеток получены с помощью микроскопа AxioScopeA1 (CarlZeiss).

Клетки выращивали в слайд-флаконах. После инкубации с производными фуллеренов проводили фиксацию клеток 3%-ным парафармальдегидом при 4 °С в течение 20 мин, промывали раствором ФСБ и пермеабилizировали 0,1%-ным Тритона X-100 в ФСБ в течение 15 мин при комнатной температуре, затем блокировали 0,5% раствором БСА в ФСБ в течение ч и инкубировали ночь с антителами. После этого промывали раствором 0,1% Тритона X-100 в ФСБ, инкубировали 2 ч при комнатной температуре с ФИТЦ-меченными коза анти-кролик антителами IgG, промывали раствором ФСБ и окрашивали DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л).

## **2.17. Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программ Excel Microsoft Office и StatGraph. При анализе различий между выборками исходили из нуль-гипотезы об отсутствии различий, которую затем проверяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия являются достоверными при  $p < 0,05$ . Распределения параметров сравнивали по методу Колмогорова-Смирнова.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Водорастворимые производные фуллерена C<sub>60</sub> обладают способностью флуоресцировать в клетках

Флуоресценция соединений, проникающих в клетку, является важным физическим свойством по ряду причин, во-первых, с помощью нее можно локализовать вещество в клетке, что важно для исследования биологического действия соединения, во-вторых, поиск невыгорающих красителей, в особенности витальных, всегда является актуальной задачей. При исследовании ряда производных фуллеренов обнаружили, что их можно подразделить на две группы: производные, обладающие собственной флуоресценцией как в водных растворах, так и в клетках, и производные, не флуоресцирующие в растворах, но обнаруживающие флуоресценцию при проникновении в клетки. К соединениям первого типа можно отнести F-828, F-243, F-827, vi-434K2, VI-419-P3K, а к соединениям второго - GI-761. Также обнаружено соединение (vi-434K2), которое обладает способностью прокрашивать ядра клеток и может быть использовано в качестве витального красителя.

Исследования выполнены с использованием трех групп методов: (1) флуоресценции в водных растворах с использованием спектрофлуориметра; флуоресценции клеток и среды с использованием флуоресцентного планшетного ридера; (2) проточной цитометрии и (3) флуоресцентной микроскопии.

#### 3.1.1. Соединения, флуоресцирующие и в воде, и в живых клетках

Все исследованные производные фуллерена C<sub>60</sub> флуоресцируют в красной области спектра (600 - 800 нм) с максимумом флуоресценции: F-828 - максимум 705 нм, F-243, F-827, vi-434K2 - максимум флуоресценции  $\lambda = 630$  нм, VI-419-P3K, OKR111 и OKR112 – максимум - 565 нм при возбуждении УФ светом в диапазоне длин волн 300-400 нм (с максимумом 365 нм) как в ФСБ и в среде культивирования клеток, так и внутри клеток. На рис. 20 в качестве примера приведены спектры возбуждения и испускания флуоресценции соединения VI-419-P3K в водном растворе, в фосфатно-солевом буфере и в среде культивирования клеток.

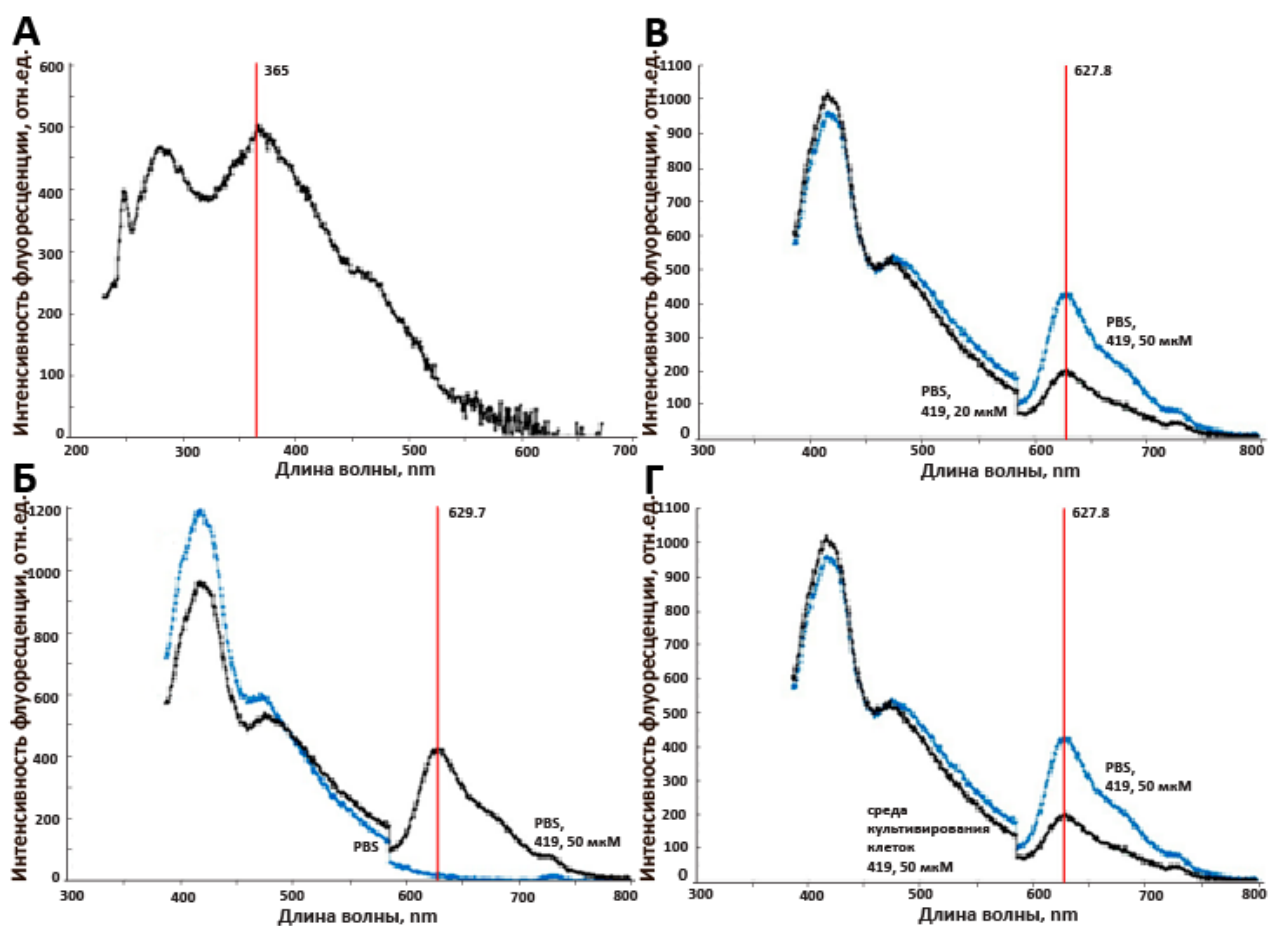


Рисунок 20. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции фуллерена. А - Спектр возбуждения фуллерена VI-419-РЗК. Б, В – спектры флуоресценции фуллерена в разных концентрациях (50 и 20 мкМ) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Г - спектры флуоресценции фуллерена в среде культивирования клеток.

Спектры возбуждения и флуоресценции водных растворов фуллеренов имеют схожий характер, отличаясь длиной волны максимума флуоресценции, как показано на рисунке 21.

Свойство фуллеренов флуоресцировать в водных растворах использовали для анализа их проникновения и локализации в клетках.

Соединения фуллерена проникают в клетку в течение 1 - 24ч, их локализацию можно обнаружить с помощью флуоресцентного микроскопа, где частицы фуллерена визуализируются в виде темно-красных пятен. Локализацию фуллерена в клетках ФЛЭЧ анализировали с помощью метода флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентного микроскопа AxioVert, («CarlZeiss», Германия) и видеокамеры с высоким разрешением.

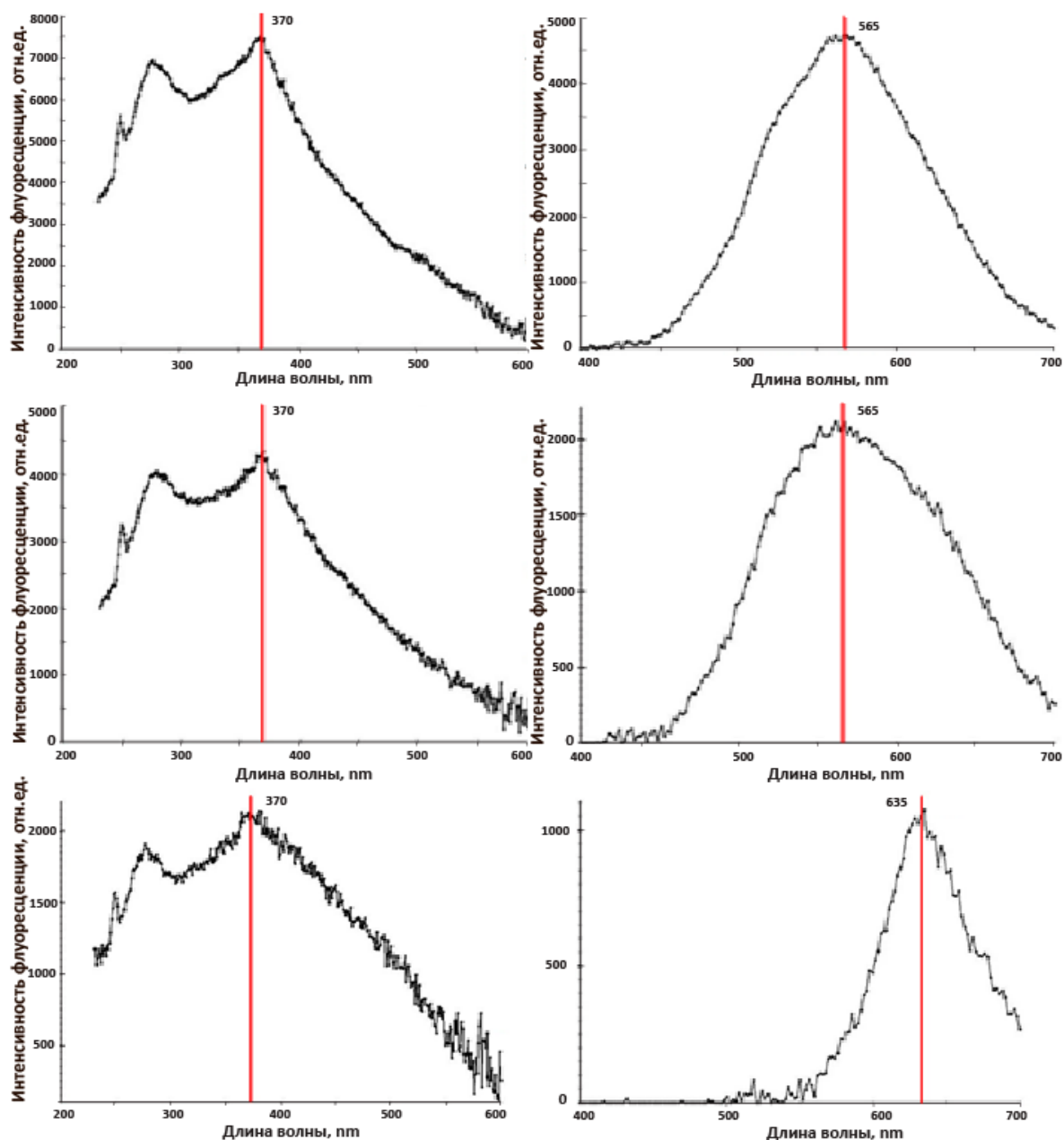


Рисунок 21. Спектры возбуждения и флуоресценции водных растворов фуллеренов в концентрации 1 мг/мл. А – ОКР-111 (0,62 мкМ). Б – ОКР-112 (0,62 мкМ), В – VI-434К2 (0,62 мкМ).

В течение 24 ч в используемых условиях культивирования фуллерен F-828 проникает через клеточную мембрану, локализуется в цитоплазме, накапливаясь вблизи клеточного ядра. При большем увеличении в цитоплазме детектируются цепочки, состоящие из отдельных темно-красных пятен разного размера (рис. 22). В ядре сигналы отсутствуют (рис. 22). Темно-красная флуоресценция наблюдается только в

нефиксированных клетках, которые анализировали сразу же после непродолжительной отмывки препарата ФСБ. После фиксации клеток 3% параформальдегидом интенсивность сигналов значительно уменьшается. После последующей отмывки фиксированных клеток 0.1% раствором тритона X100 сигналы полностью исчезают (рис. 3.3, фиксированные клетки). Можно предположить, что наночастицы взаимодействуют преимущественно с мембраной клеток и/или митохондрией клеток. Ранее показано, что наночастицы растворимого фуллерена  $C_{60}(OH)_{18-22}$  взаимодействуют с биомембранами [117]. При разрушении мембран в результате фиксации формальдегидом и отмывки раствором детергента наночастицы, по-видимому, вымываются из клеток.

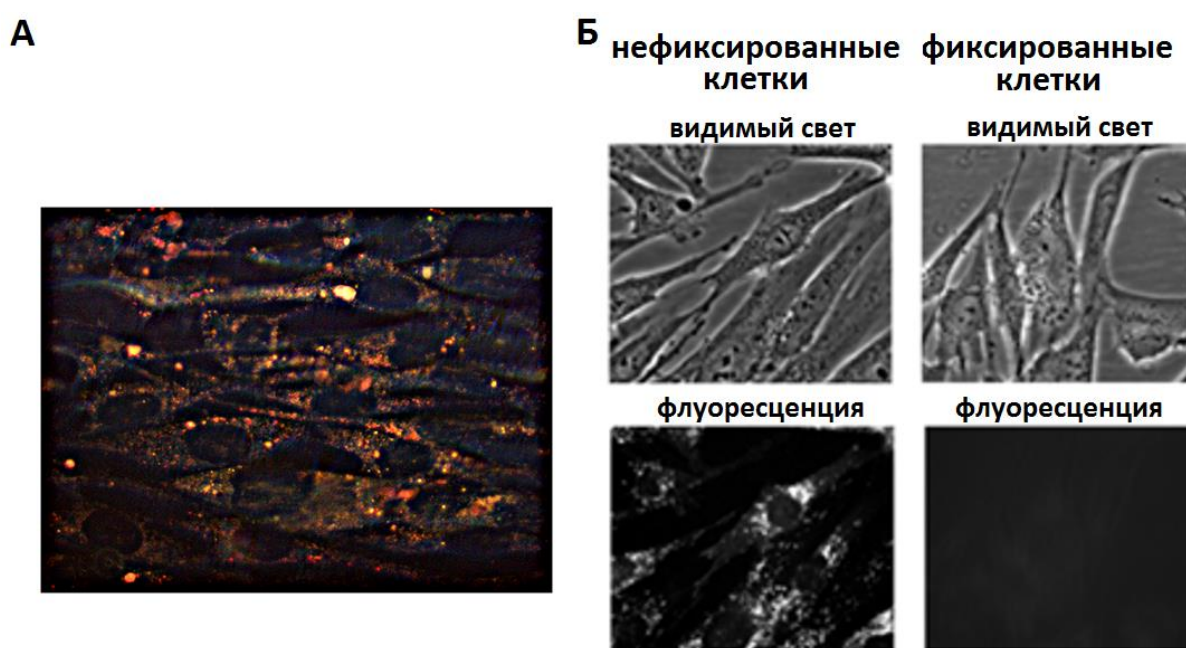


Рисунок 22. Флуоресценция фуллерена F-828 в клетках ФЛЭЧ. А - Флуоресценция фуллерена F-828 в клетках ФЛЭЧ при облучении светом с длиной волны 350 нм. Увеличение X60. Б - Флуоресценция фуллерена F-828 в фиксированных и нефиксированных клетках ФЛЭЧ при облучении светом с длиной волны 350 нм. Увеличение X40.

Свойство F-828 вымываться из фиксированных, обработанных раствором детергента клеток позволяет без проблем использовать флуоресцентные метки в случае фиксированных клеток. Фуллерены являются очень сильными тушителями флуоресценции. Однако, не обнаружили признаков тушения флуоресценции флуоресцеина в фиксированных клетках при использовании для анализа клеточных белков антител, меченных флуоресцеином.

Соединение VI-419-РЗК проникает в цитоплазму клеток быстрее – через 3 ч культивирования ФЛЭЧ в присутствии фуллерена VI-419-РЗК в цитоплазме клеток обнаруживаются темно-красные флуоресцирующие пятна, наблюдаемые при облучении обработанных фуллереном клеток светом с длиной волны 350 нм (рис.23).

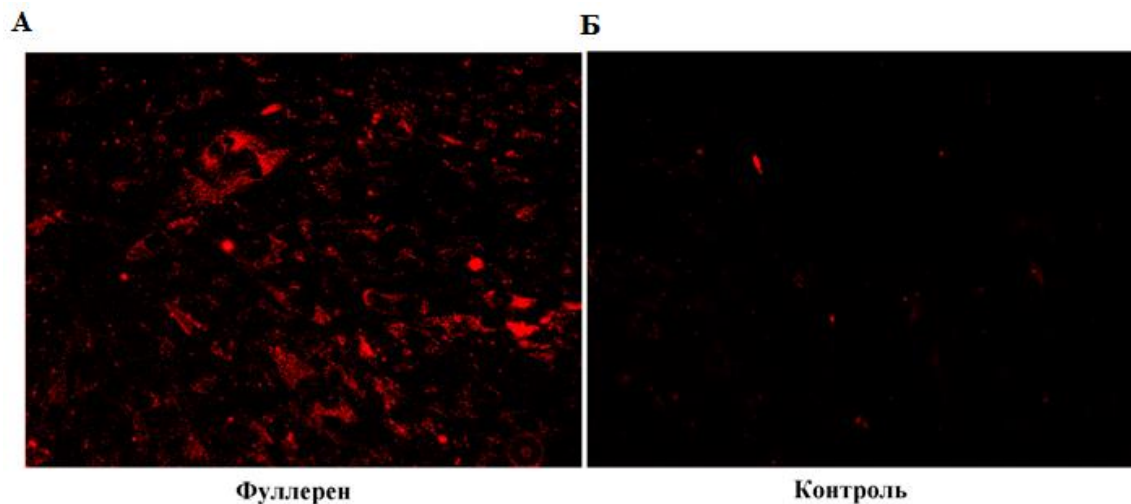


Рисунок 23. Флуоресцентная микроскопия. А - Флуоресценция фуллерена VI-419-РЗК в клетках ФЛЭЧ при облучении светом с длиной волны 350 нм. Б – autofлуоресценция клеток ФЛЭЧ в тех же условиях. Увеличение X20.

В течение 3 - 24 ч в используемых условиях культивирования ФЛЭЧ фуллерен VI-419-РЗК проникает через клеточную мембрану, локализуется в цитоплазме, накапливаясь вблизи клеточного ядра (рис. 24).

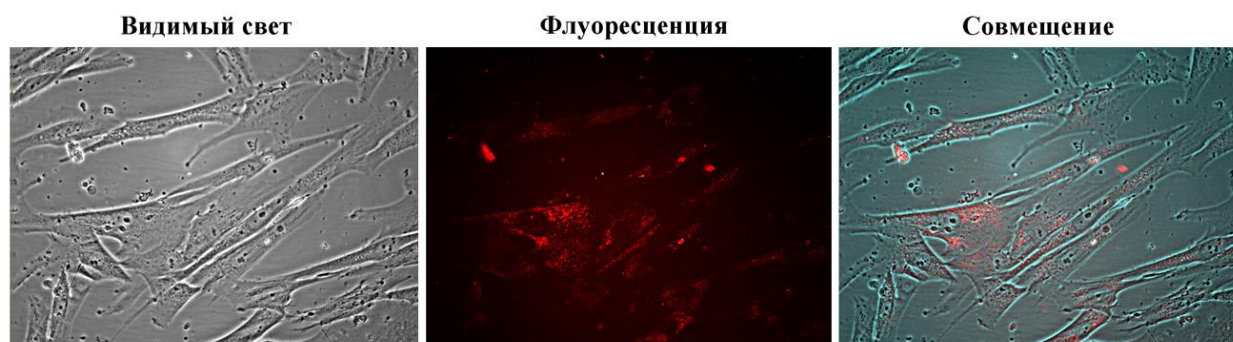


Рисунок 24. Локализация фуллерена VI-419-РЗК в клетках (ФЛЭЧ) через 24 ч после добавления к среде культивирования. Увеличение X40.

При большем увеличении в цитоплазме детектируются цепочки, состоящие из отдельных темно-красных пятен разного размера, в ядре сигналы отсутствуют (рис. 25).



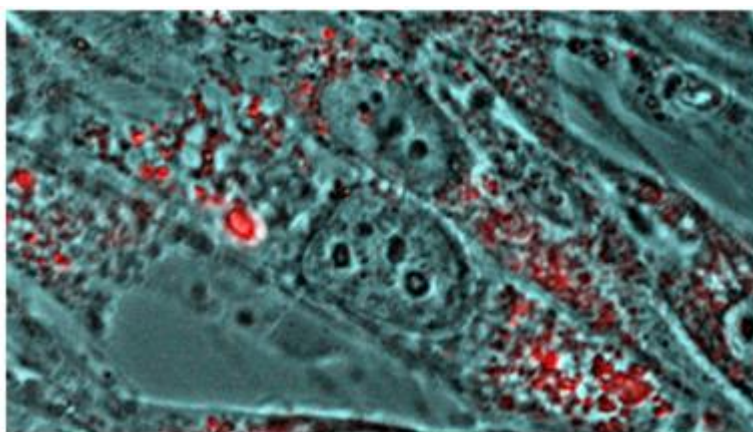


Рисунок 25. Локализация производного VI-419-РЗК в клетках ФЛЭЧ через 24 ч после начала инкубации. Увеличение X100.

Соединения F-827 и F-243 проникают в клетки через 2 ч (рис. 26).

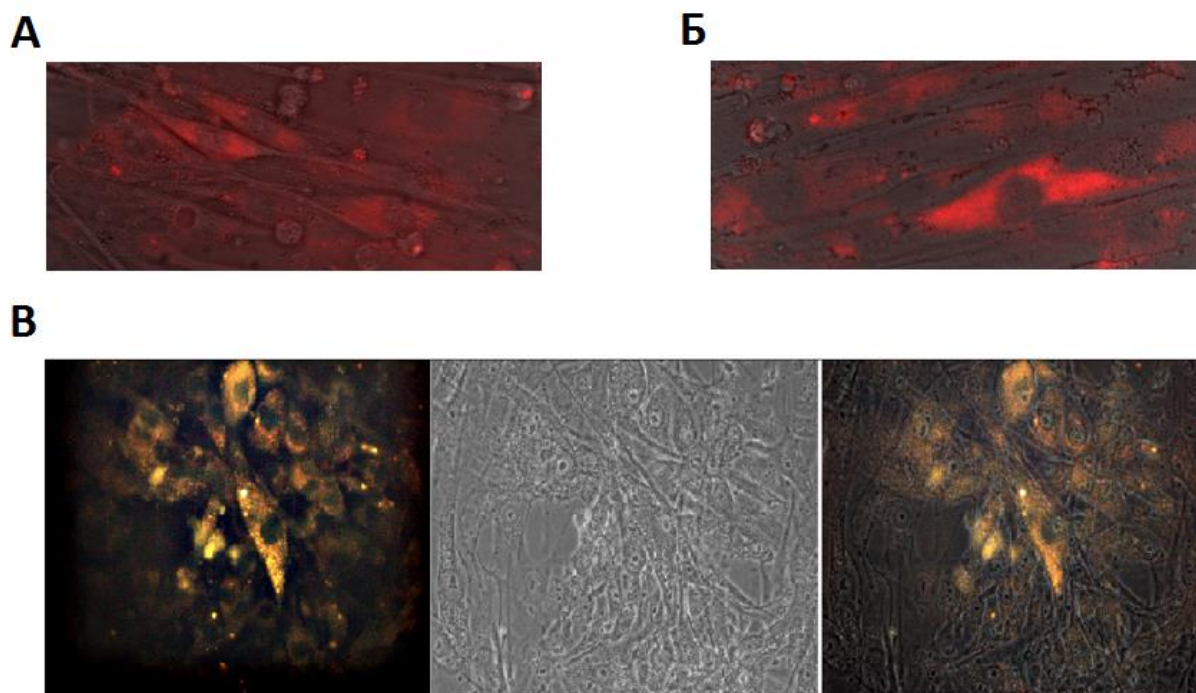


Рисунок 26. Флуоресценция производных фуллерена F-827 (А) и F-243 (Б) в клетках, наблюдаемая при облучении обработанных фуллереном ФЛЭЧ светом с длиной волны 350 нм (через 2 ч после добавления к среде культивирования). Увеличение X40.- Проникновение соединения F-243 в МСК по данным видимой и флуоресцентной микроскопии. Увеличение X40.



Показано, что производные фуллеренов ОКР-111 и ОКР-112 быстро (в течение 1 ч) проникают через клеточную мембрану ФЛЭЧ и локализуются в цитоплазме, через 24 ч флуоресценция соединений увеличивается (рис. 27).

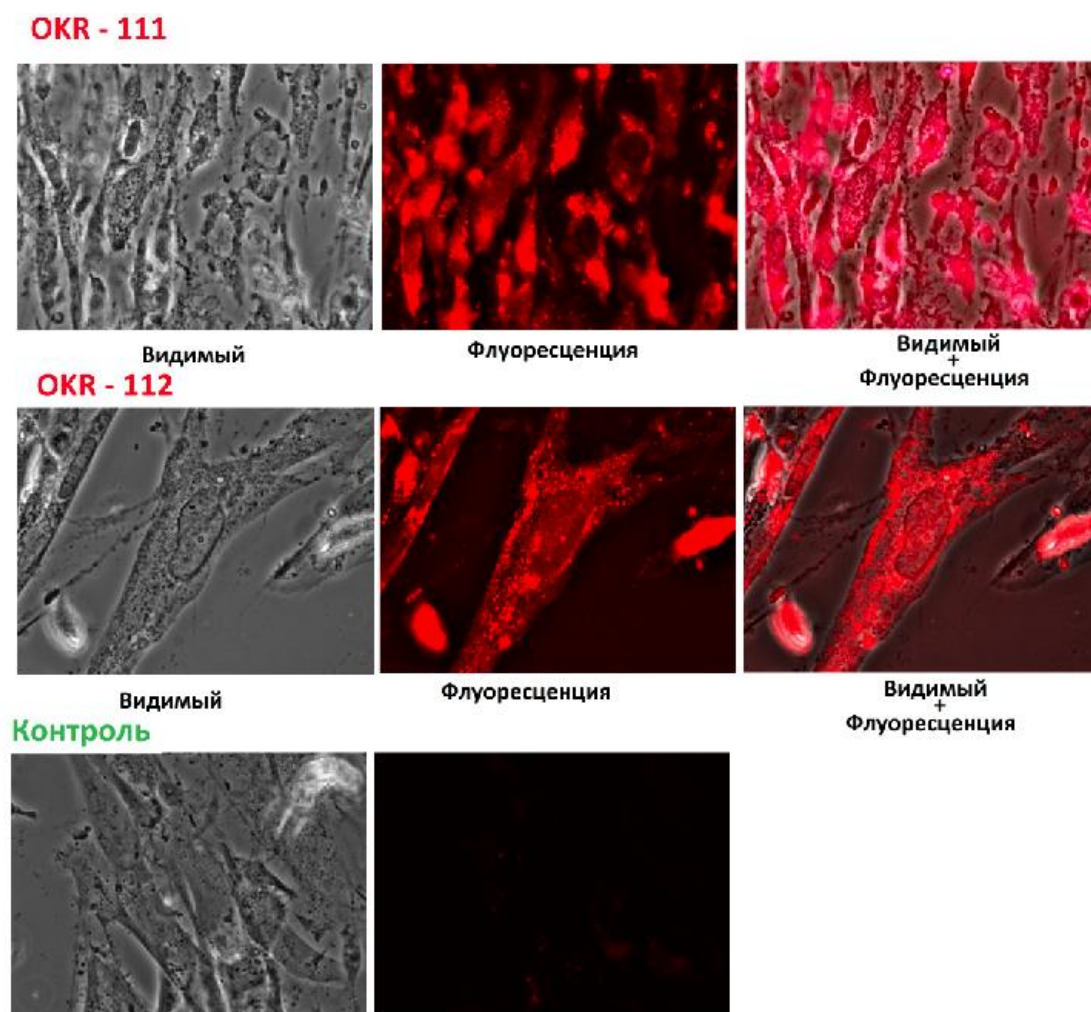


Рисунок 27. Флуоресценция производных фуллерена ОКР-111 и ОКР-112 в клетках, наблюдаемая при облучении обработанных фуллереном ФЛЭЧ светом с длиной волны 350 нм (через 24 ч после добавления к среде культивирования). Увеличение X40.

Результаты, полученные при исследовании накопления производных фуллеренов в клетках методом флуоресцентной микроскопии, полностью подтверждаются данными проточной цитометрии (FCA). Сигнал флуоресценции фуллерена в клетках возрастает с увеличением концентрации соединений.

Таким образом, показано, что водорастворимые производные фуллеренов имеют собственную флуоресценцию в красной области (600-800 нм), возбуждаемую УФ-излучением (300-400 нм). С использованием этого свойства показано, что соединения проникают внутрь клетки и локализуются в цитоплазме вблизи ядра. Производные

фуллеренов являются сильными тушителями флуоресценции, однако при фиксации клеток фуллерены вымываются из них, поэтому клетки, обработанные фуллеренами, можно анализировать флуоресцентно-мечеными антителами, не опасаясь тушения флуоресценции.

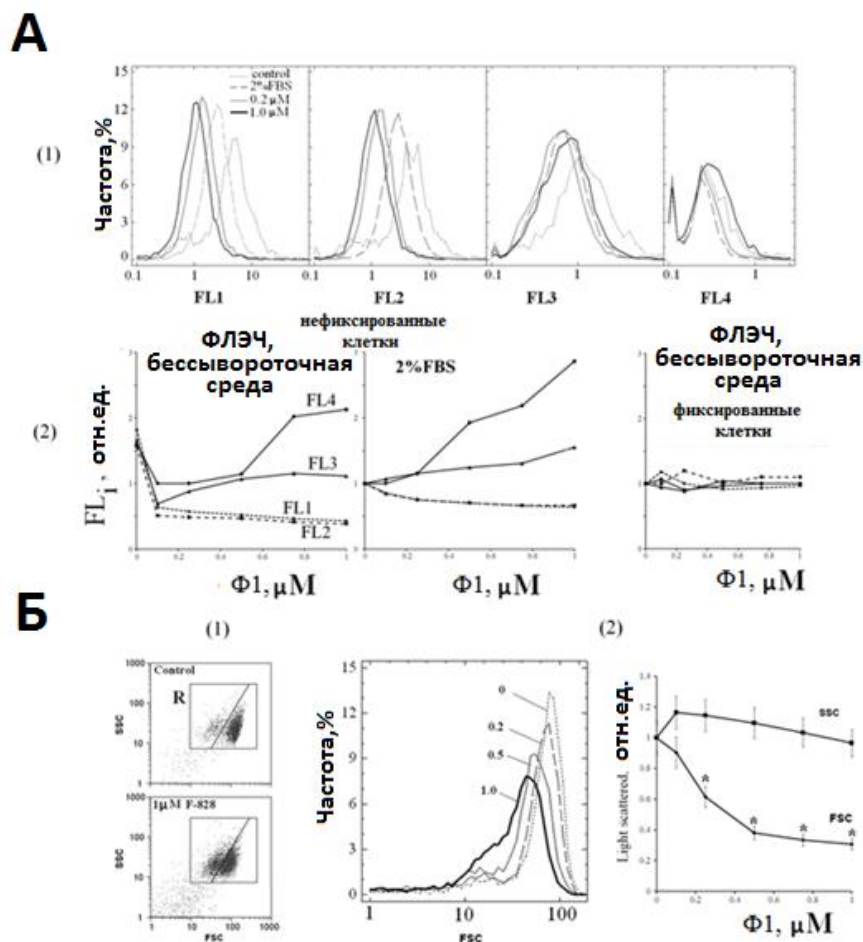


Рисунок 28. Данные проточной цитофлуориметрии: А (1) – Распределение клеток, обработанных F-828 через 48 ч по сигналу FL1- FL4; концентрации F-828 в бессывороточной среде указаны на рисунке; control – клетки культивировали в бессывороточной среде в отсутствии фуллерена. (2) - Зависимость медиан значений сигнала FL1- FL4 от концентрации фуллерена. Для нефиксированных клеток сигналы нормировали к значениям FL1- FL4, полученным для интактных клеток, которые культивировали в присутствии 2% сыворотки. Б (1) –SSC против FCS. Область R обогащена фракцией ФЛЭЧ с низкими значениями FCS; (2) – Распределение клеток, обработанных F-828 через 48 ч по FCS; зависимость медиан значений FCS и SSC от концентрации фуллерена.

Данные проточной цитофлуориметрии говорят о накоплении фуллерена в нефиксированных клетках. На рисунке 28.Б приведен график SSC – FSC (Side-scattered light – Forward-scattered light, боковое и прямое светорассеяние) и гистограммы для

параметра FSC для клеток, инкубированных с соединением F-828 в течение 48 ч. В присутствии фуллерена наблюдали значительное уменьшение параметра FSC при неизменном значении параметра SSC. FSC (Forward-scattered light) - это параметр, измеряющий преимущественно дифрагированный свет, обнаруживающийся в непосредственной близости от оси падающего лазерного пучка перед фотодиодом. Хотя FSC измерение обычно описывается как показатель размера клеток, есть публикации, которые говорят, что такие измерения также зависят от поглощающих веществ внутри клеток [118]. Поскольку фуллерен содержит большое количество двойных связей, он обладает способностью поглощать свет в широком диапазоне длин волн. Таким образом, данные микроскопии не позволяют утверждать, что фуллерен существенно влияет на размеры клеток, а уменьшение параметра FSC отражает накопление фуллерена в клетках, так же, как и увеличение параметров FL3 и FL4 (рис. 28).

На графиках, представленных на рисунке 28.Б, различаются 2 субфракции клеток с относительно высокими и низкими значениями параметра FSC. В контроле фракция с низким сигналом FSC составляет 5% от всей популяции. Размер этой фракции возрастает до 12, 17 и 35% соответственно в присутствии 0.2, 0.5 и 1.0  $\mu\text{M}$  фуллерена. Предполагая, что эти фракции различаются по количественному содержанию фуллерена, сравнили сигналы FL3 и FL4 для клеток этих двух фракций. Существенной разницы в интенсивности сигналов не обнаружили. Следует подчеркнуть, что фиксированные, обработанные 0.1% тритоном X100 клетки представлены только одной фракцией. Возможно, клетки двух фракций в популяции необработанных детергентом клеток различаются по локализации фуллерена относительно клеточной мембраны.

Данные, полученные при исследовании флуоресценции других производных фуллеренов методом микроскопии также полностью подтверждаются данными, полученными с использованием метода проточной цитометрии.

Повышение флуоресценции в нефиксированных ФЛЭЧ наблюдали при использовании фильтров FL1-FL2, максимальные различия тестировали для FL1. Величину суммарного сигнала снижает тушение автофлуоресценции клеток, вызываемое фуллереном, и увеличивает флуоресценция самого фуллерена, которая максимальна при использовании фильтра FL4. Фуллерен VI-419-РЗК (20  $\mu\text{M}$ -4 нМ) значительно тушит сигналы FL1 в нефиксированных ФЛЭЧ (рисунок 29 В). FL3 и FL4 в нефиксированных ФЛЭЧ, содержащих фуллерен, возрастают при увеличении концентрации фуллерена (в

диапазоне концентраций 4 нМ – 20 мкМ) (рисунок 29 Б, В).

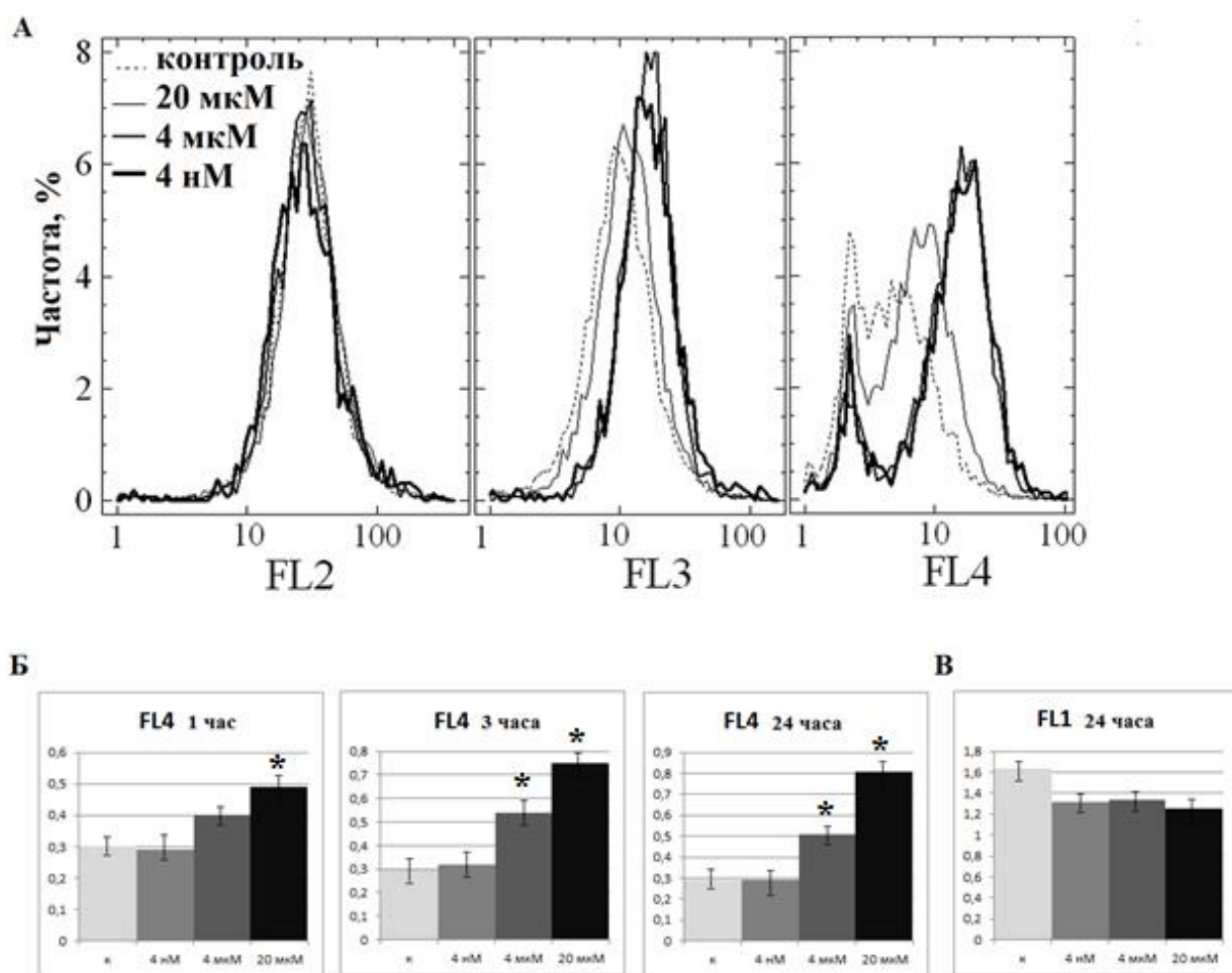


Рисунок 29. Проточная цитометрия. А – Распределение нефиксированных клеток (ФЛЭЧ), обработанных VI-419-РЗК через 48 ч по сигналу FL1- FL4; концентрации VI-419-РЗК указаны на рисунке; Контроль – клетки культивировали в отсутствии фуллерена. Б - Зависимость медиан значений FL4 сигнала от концентрации фуллерена через 1, 3 и 24 ч. В - Зависимость медиан значений FL1-сигнала от концентрации фуллерена через 24 ч. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

Сигнал флуоресценции фуллерена ОКР-111 в клетках также возрастает с увеличением концентрации, в нефиксированных клетках увеличение флуоресценции также наиболее заметно при использовании фильтра FL4 (рис. 30).

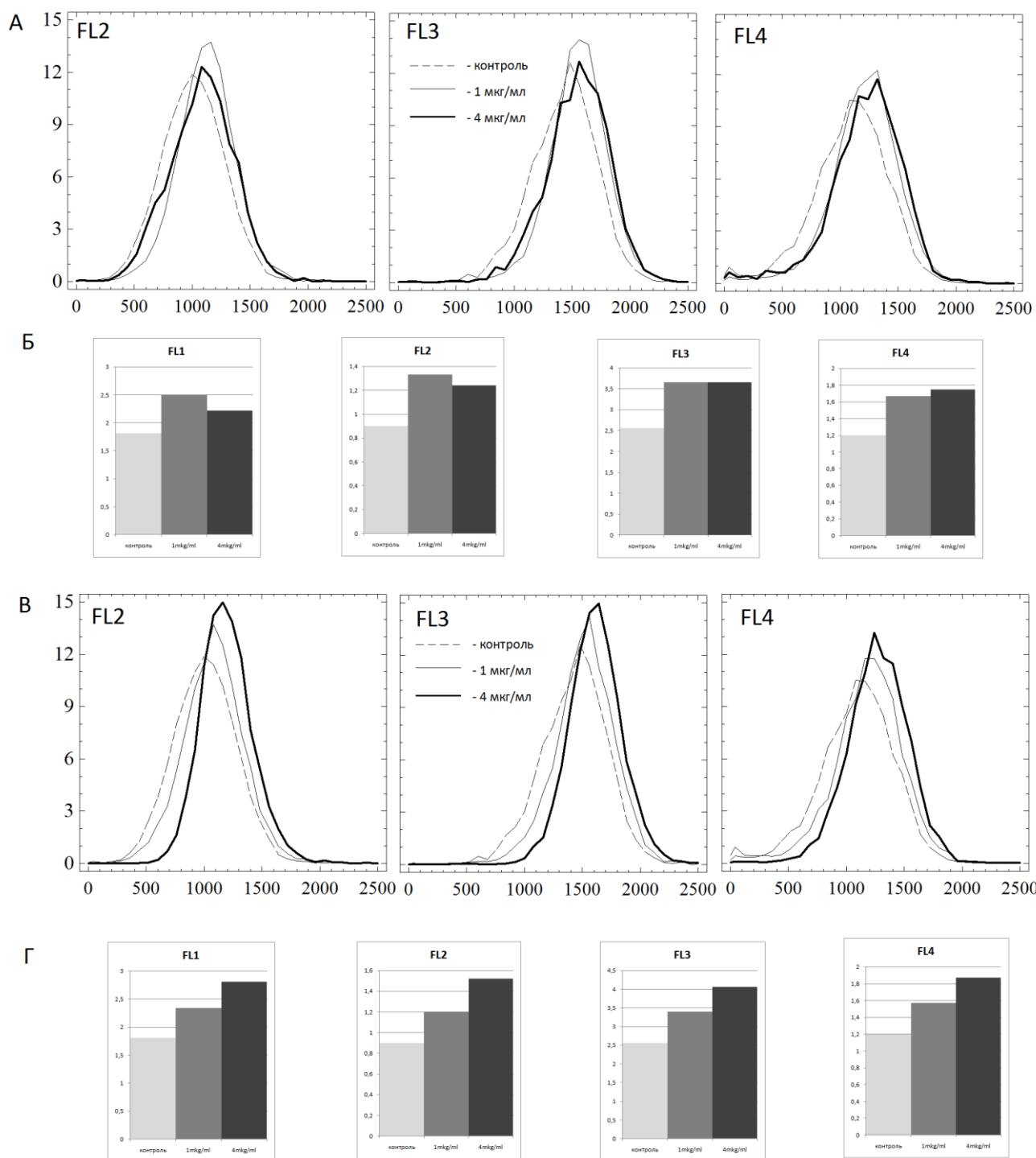


Рисунок 30. Проточная цитометрия. А – Распределение нефиксированных клеток (ФЛЭЧ), обработанных ОКР-111L через 24 ч по сигналу FL2- FL4; концентрации указаны на рисунке; Контроль – клетки культивировали в отсутствии фуллерена. Б - Зависимость медиан значений FL1-FL4 сигнала от концентрации ОКР-111L фуллерена через 24 ч. По критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ). В – Распределение нефиксированных клеток (ФЛЭЧ), обработанных ОКР-111L через 24 ч по сигналу FL2- FL4; концентрации указаны на рисунке; Контроль – клетки культивировали в отсутствии фуллерена. Г - Зависимость медиан значений FL1-FL4 сигнала от концентрации ОКР-111L фуллерена через 24 ч по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

Сигнал флуоресценции фуллерена в клетках возрастает не только с увеличением концентрации добавляемого фуллерена, но и во времени (рис. 30. Б). Увеличение сигнала FL4 наблюдалось уже через 1 ч после добавления фуллерена VI-419-P3K (4 нМ – 20 мкМ) в среду культивирования ФЛЭЧ, сигнал значительно повышался через 3 и 24 ч (рис. 30.Б). Это говорит о том, что фуллерен VI-419-P3K накапливается в клетках. После фиксации клеток параформальдегидом и последующей отмывки 0.1% тритоном X100 также наблюдали увеличение флуоресцентных сигналов FL3 и FL4 (рис. 31). По всей видимости, фуллерен VI-419-P3K прочно связывается с какими-то структурами в клетке и не вымывается из фиксированных клеток с поврежденной мембраной.

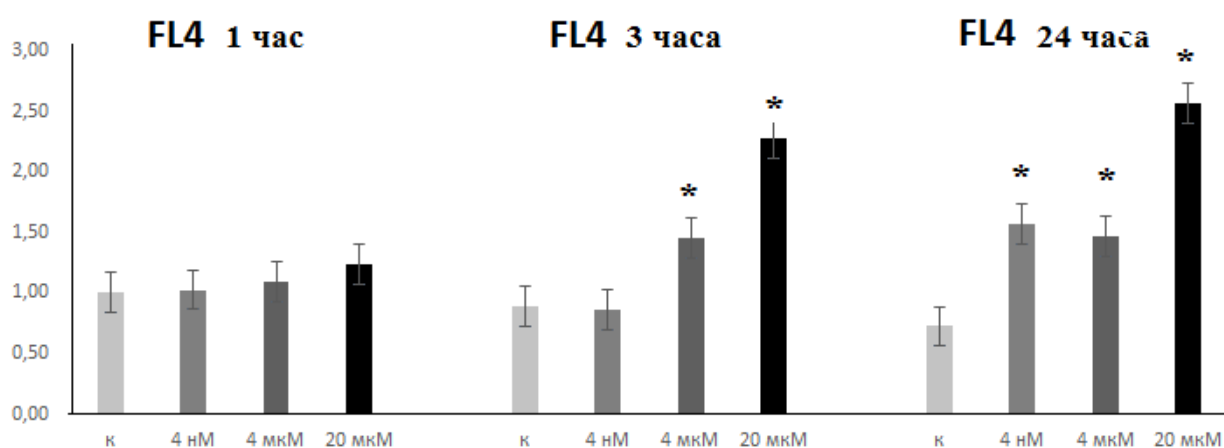


Рисунок 31. Зависимость медиан значений FL4 сигнала (в отн. ед.) от концентрации фуллерена VI-419-P3K через 1, 3 и 24 ч в фиксированных параформальдегидом клетках (ФЛЭЧ).

Важно отметить, что, накапливаясь в клетках, некоторые производные фуллерена C60 прочно связываются со структурами клеток, а некоторые, в частности, соединения F-243 и F-828 вымываются из клеток при фиксации.

Производные фуллеренов имеют свойство покидать клетки при замене среды, содержащей эти соединения, на чистую среду. Возможно данный эффект является следствием понижения содержания фуллерена в среде и смещением равновесия между процессом диффузии соединения в клетку из растворителя и обратным процессом.



### 3.1.2. Водорастворимые производные фуллерена, флуоресцирующие в клетках, но не обладающие флуоресценцией в водных растворах

При исследовании флуоресцентных свойств производных фуллеренов заметили, что некоторые соединения практически не флуоресцируют в водных растворах, но обладают автофлуоресценцией при попадании внутрь клетки.

Водный раствор производного фуллерена C60 GI-761 при УФ-облучении (длина волны 300-400 нм с максимумом 346 нм) обладает крайне слабой темно-красной флуоресценцией (с максимумом 732 нм). На рисунке 32 приведены спектры возбуждения и флуоресценции фуллерена в концентрации 50 мкМ в ФСБ.

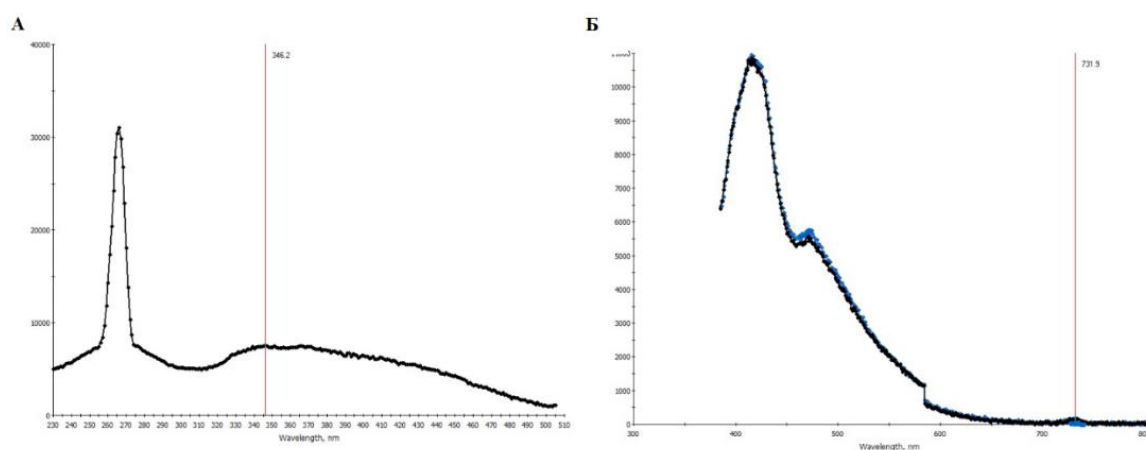


Рисунок 32. Спектр возбуждения и флуоресценции соединения GI-761. А - Спектр возбуждения фуллерена GI-761. Б – спектр флуоресценции фуллерена в концентрации 50 мкМ в ФСБ (синим цветом обозначена фоновая кривая флуоресценции ФСБ).

Несмотря на крайне слабую флуоресценцию в водном растворе, ФСБ и среде культивирования клеток фуллерен GI-761 обладает сильной флуоресценцией в клетках ФЛЭЧ. При облучении клеток, обработанных производным фуллерена, светом с длиной волны 350 нм (рис. 33, нефиксированные клетки) наблюдалось появление темно-красных флуоресцирующих пятен. Локализацию фуллерена в клетках анализировали с помощью метода флуоресцентной микроскопии. Производное GI-761 флуоресцирует в интервале 600 – 950 нм (максимум эмиссии – 732 нм), возбуждается в широком диапазоне длин волн (от 300 до 600 нм), максимум флуоресценции наблюдается при возбуждении GI-761 светом с длиной волны 340-350 нм.

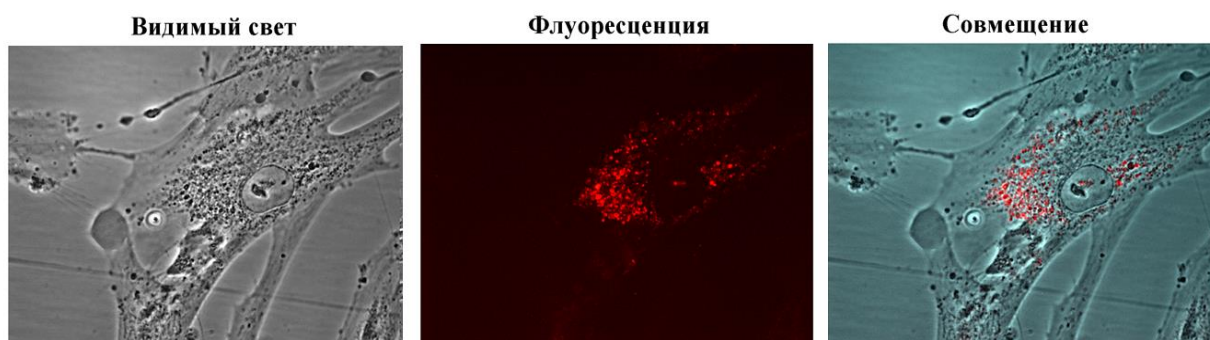


Рисунок 33. Флуоресцентная микроскопия. А - Флуоресценция фуллерена GI-761, наблюдаемая при облучении обработанных фуллереном клеток (ФЛЭЧ) светом с длиной волны 350 нм, в клетках (ФЛЭЧ) через 24 ч после добавления к среде культивирования. Увеличение X40.

В течение 3 - 24 ч после начала инкубации ФЛЭЧ с исследуемым соединением фуллерен GI-761 проникает через клеточную мембрану, где он локализуется в цитоплазме и накапливается вблизи клеточного ядра (рис. 33).

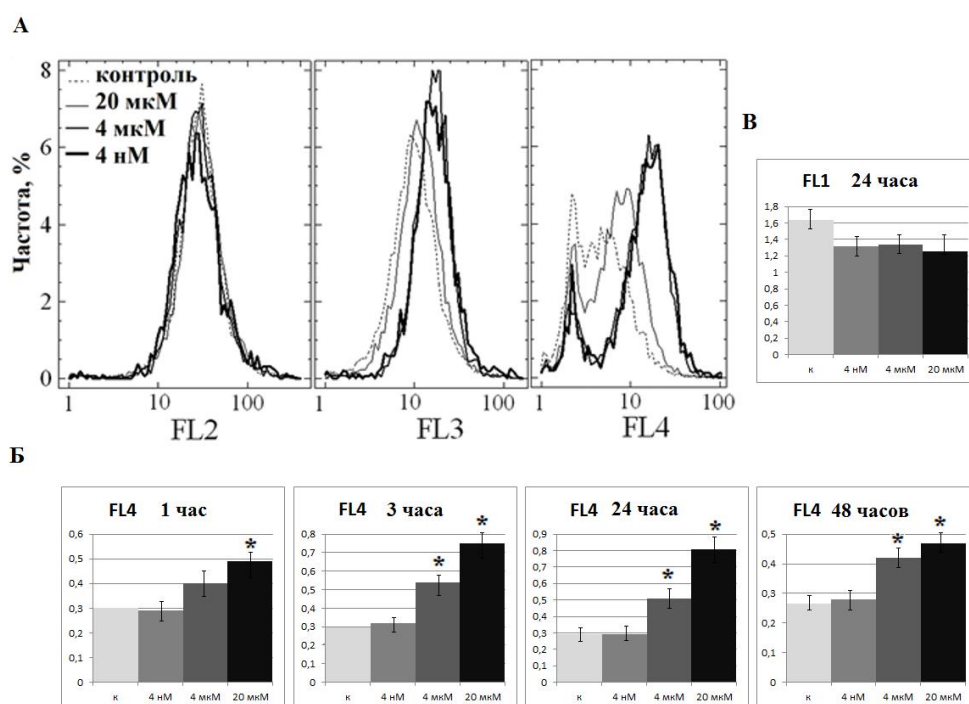


Рисунок 34. Проточная цитофлуориметрия. А – Распределение нефиксированных клеток (ФЛЭЧ), обработанных GI-761 через 48 ч по сигналу FL1- FL4; концентрации GI-761 указаны на рисунке; Контроль – клетки культивировали в отсутствии фуллерена. Б - Зависимость медиан значений FL4 сигнала от концентрации фуллерена через 1, 3, 24, 48 ч. В - Зависимость медиан значений FL1 сигнала от концентрации фуллерена через 24 ч. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).



По всей видимости, разгорание флуоресценции соединения GI-761 в клетках при практически отсутствующей автофлуоресценции в водных растворах, связано с тем, что соединение взаимодействует с активными формами кислорода. Появление собственной флуоресценции может быть результатом химической модификации исследуемого производного.

Повышение флуоресценции в нефиксированных ФЛЭЧ наблюдали при использовании фильтров FL1-FL2. Величина суммарного сигнала снижена из-за тушения автофлуоресценции клеток фуллереном и увеличена из-за флуоресценции самого фуллерена (рис. 34. А, Б). Фуллерен GI-761 (20 мкМ-4 нМ) значительно тушит сигналы FL1 в нефиксированных ФЛЭЧ (рис. 34. В). FL3 и FL4 в нефиксированных ФЛЭЧ, содержащих фуллерен, возрастают при увеличении концентрации фуллерена (в диапазоне концентраций 4 мкМ – 20 мкМ) и во времени (рис. 34. Б, В).

Уже через 1 час после добавления производного фуллерена GI-761 в концентрации 20 мкМ в среду культивирования ФЛЭЧ наблюдается увеличение сигнала флуоресценции, а через 3 и 24 ч сигнал повышается значительно. Это свидетельствует о накоплении соединения в клетках. После фиксации клеток параформальдегидом с последующей отмывкой 0.1% тритоном X100 наблюдалось аналогичное увеличение флуоресцентных сигналов FL3 и FL4 (рис. 35.). Это может говорить о том, что данное соединение при проникновении прочно связывается со структурами внутри клетки и не вымывается из фиксированных клеток с поврежденной мембраной.

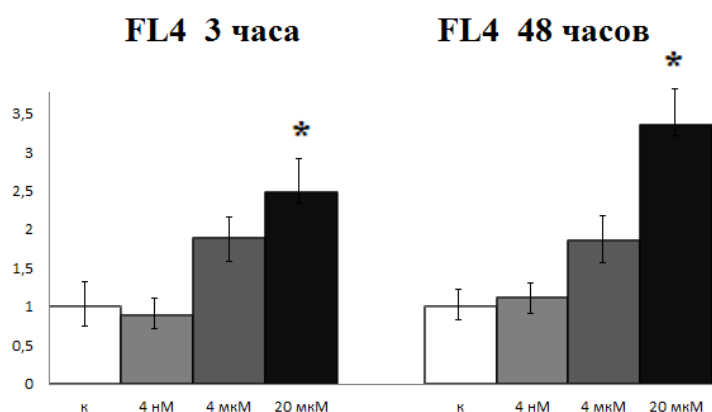


Рисунок 35. Зависимость медиан значений FL4 сигнала (в отн. ед.) от концентрации фуллерена через 3 и 48 ч в фиксированных параформальдегидом клетках (ФЛЭЧ). (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, показано, что фуллерен GI-761 в концентрациях 4 нМ – 20 мкМ обладает очень слабой флуоресценцией в водных растворах, однако в клетках приобретает способность к сильной флуоресценции в темно-красной области при возбуждении УФ-светом (длина волны возбуждения - 300-400 нм с максимумом 346 нм, максимум флуоресценции 732 нм). Флуоресценция фуллерена GI-761 позволяет детектировать его в клетках ФЛЭЧ. В течение 1 - 24 ч фуллерен GI-761 проникает через клеточную мембрану ФЛЭЧ, локализуется в цитоплазме и накапливаясь вблизи клеточного ядра.

Таким образом, исследованные производные можно разделить на две группы. Соединения из первой группы обладают собственной флуоресценцией как в водных растворах и среде для культивации клеток, так и внутри клеток. Соединения из второй группы проявляют крайне слабые флуоресцентные способности или их отсутствие в водных растворах, однако, их флуоресценция разгорается при попадании внутрь клетки. Все исследованные производные флуоресцируют в красной области спектра (600-800 нм) при облучении УФ с длиной волны 300-400 нм.

### **3.1.3. Водорастворимое производное фуллерена, которое обладает способностью прокрашивать ядра клеток и может быть использовано в качестве витального красителя**

Отдельного внимания заслуживает производное фуллерена vi-434K2. Оно обнаруживает флуоресценцию в красной области спектра при облучении УФ и является низкотоксичным, что позволяет использовать данное соединение в качестве потенциального витального красителя для обнаружения ядра в живых клетках.

В используемых условиях культивирования ФЛЭЧ фуллерен vi-434K2 проникает через клеточную и ядерную мембрану в течение 20 мин, накапливаясь в ядре. О локализации фуллерена в клетках свидетельствуют темно-красные флуоресцирующие области, наблюдаемые при облучении обработанных фуллереном клеток светом с длиной волны 350 нм (рис. 36). Через 24 ч фуллерен vi-434K2 в еще большей степени накапливается в ядре, прокрашивая структуру ядрышек (рис. 36). Это единственное водорастворимое производное фуллерена C60 из всех ранее исследованных, проникающее через ядерную мембрану.

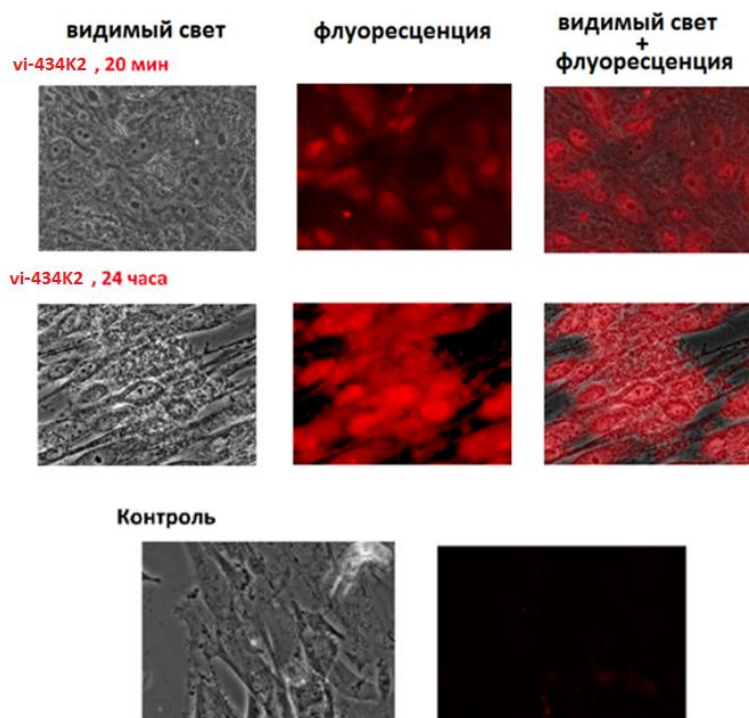


Рисунок 36. Проникновение соединения vi-434K2 в клетки ФЛЭЧ по данным видимой и флуоресцентной микроскопии (микроскоп AxioVert, CarlZeiss, Германия). Увеличение Х40.

С помощью проточной цитометрии показали, что в нефиксированных клетках увеличение флуоресценции наиболее заметно при использовании фильтров FL4-FL4. Сигнал флуоресценции фуллерена в клетках возрастает с увеличением концентрации соединений (рис 37).

Таким образом, показано, что соединение vi-434K2 обладает красной флуоресценцией при УФ-облучении (максимум флуоресценции 630 нм). Флуоресценция этого соединения позволяет детектировать его в клетках ФЛЭЧ. В течение 20 мин соединение VI-434K2 проникает через клеточную и ядерную мембрану ФЛЭЧ, локализуется в ядре, что позволяет использовать это водорастворимое производное фуллерена в качестве витального красителя для выявления ядра в живых клетках. Благодаря свойству этого соединения выявлять ядро в живых клетках, в соединении с его слабой токсичностью даже в высоких концентрациях, vi-434K2 будет востребован в качестве красителя в практике лабораторной работы.

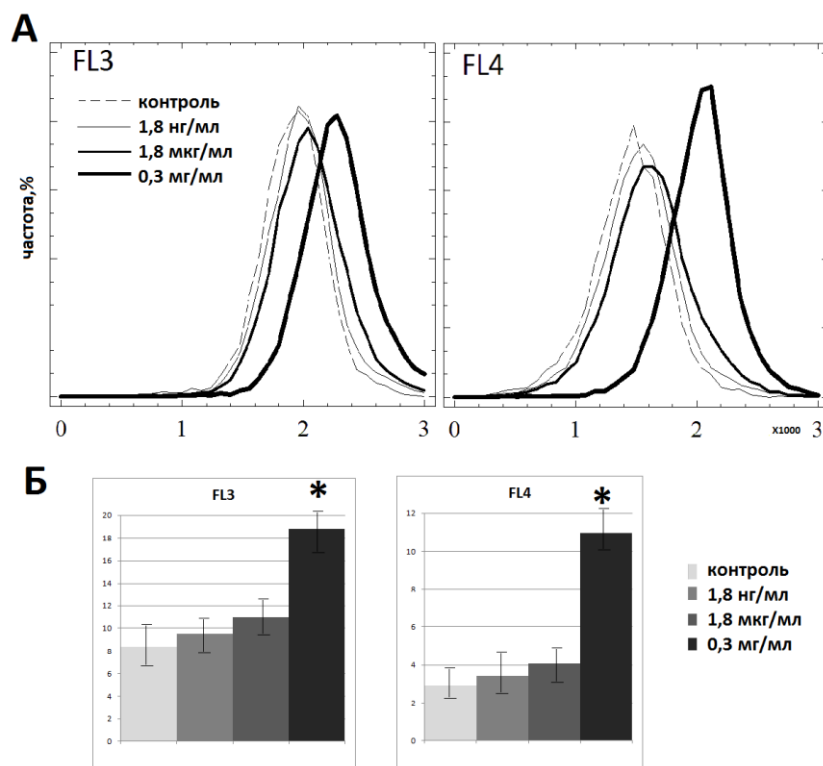


Рисунок 37. А – Распределение нефиксированных клеток (ФЛЭЧ), обработанных VI-434K2 через 24 ч по сигналу FL3- FL4; концентрации 434 указаны на рисунке; Контроль – клетки культивировали в отсутствии фуллерена. Б - Зависимость медиан значений FL3-FL4 сигнала от концентрации фуллерена через 24 ч. \* - по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Токсичность водорастворимых производных фуллеренов в отношении ФЛЭЧ

Литературные данные о токсичности фуллеренов довольно противоречивы, к тому же в большинстве исследований приводятся данные об одной концентрации и одном времени. Более того, исследованные в данной работе производные фуллеренов являются новыми, поэтому исследовать диапазоны их токсичности необходимо.

Для оценки цитотоксичности исследуемых производных фуллерена использовали МТТ-тест, выявляющий относительное количество живых метаболически активных клеток. Митохондриальные и цитоплазматические дегидрогеназы живых клеток восстанавливают бесцветный 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в окрашенный формазан. Для проведения МТТ-теста клетки ФЛЭЧ инкубировали с фуллеренами в течение 72 ч. Для каждого производного исследован

широкий диапазон концентраций и определена граница токсичности. Данные для диапазонов токсичности приведены в таблице 1.

Наиболее цитотоксичным является соединение фуллеренов с N-метилпиперазиновыми заместителями F-243: гибель фибробластов наблюдалась при концентрациях этого соединения более 50 нМ. Менее цитотоксичным оказалось соединение фуллерена, имеющее 3-фенилпропионильную группу F-828: гибель клеток наблюдалась при концентрации этого соединения выше 25 мкМ, еще менее токсичным отказалось соединение F-827 с фосфоновокислотными заместителями – гибель клеток наблюдалась при концентрации этого соединения выше 1 мМ (таблица 1).

Таблица 1. Диапазон цитотоксичных концентраций исследованных соединений для клеток ФЛЭЧ, данные МТТ-теста.

Производное фуллерена	Нетоксичные концентрации	Токсичные концентрации
F-828	0,01 – 3 мкМ	>25 мкМ
F-827	0,01 – 900 мкМ	> 1 мМ
F-243	0,01 – 45 нМ	> 50 Нм
GI-761	30 пМ – 0,4 мМ	> 0,4 мМ
F-419	30 пМ – 0,4 мМ	> 0,4 мМ
OKR-111	<80 нМ	> 80 Нм
OKR-112	< 1,4 нМ	> 1,4 Нм
VI-434K2	< 350 мкг/мл	> 350 мкг/мл

При низких концентрациях (таблица 1) все исследуемые производные фуллерена не оказывали влияния на интенсивность сигнала, однако при действии на фибробласты соединения фуллерена F-828 в субцитотоксичной концентрации наблюдали нелинейную зависимость количества метаболически активных клеток от концентрации производного фуллерена (рис. 38; II область концентраций). Поэтому решили исследовать процессы, происходящие с ФЛЭЧ под воздействием фуллерена F-828 более подробно.

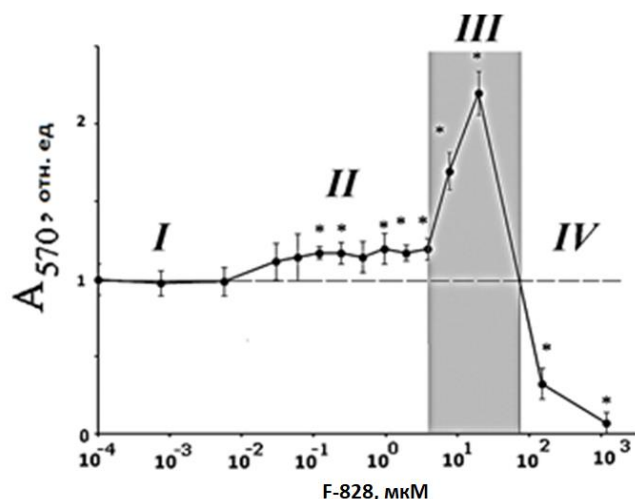


Рисунок 38. МТТ-тест: зависимость изменения поглощения формазана от концентрации F-828 в среде культивирования ФЛЭЧ. Пунктирная линия – поглощение для контрольных клеток принято за 1. Римскими цифрами обозначены интервалы концентраций F-828, обсуждаемые в тексте. Клетки культивировали 72 ч.

В интервале концентраций от 0.1 нМ до 30 нМ (область I) F-828 не оказывал влияние на интенсивность сигнала, концентрации 0,03 - 3 мкМ (область II) увеличивали интенсивность сигнала на 30% ( $p < 0.05$ ), 3 - 20 мкМ (область III) вызывают значительное увеличение сигнала (рис. 38). Дальнейшее увеличение концентрации ( $> 25$  мкМ) F-828 (область IV) приводило к значительному уменьшению сигнала по сравнению с контролем (рис. 38). В литературе имеются данные о том, что некоторые нано-частицы способны восстанавливать МТТ даже в отсутствии клеток [120]. Поэтому был дополнительно проведен эксперимент с МТТ и фуллереном в среде для культивирования без клеток, который показал, что F-828 самопроизвольно не восстанавливает МТТ. Таким образом, изменение сигнала в МТТ-тесте связано с клеточным ответом, а не с прямым взаимодействием фуллерена с МТТ в среде культивирования.

Далее проанализировали препараты, одновременно окрашенные формазаном (рис. 39А, фото 1 и 2) и фуллереном (светящиеся области, рис. 39А, фото 3). В присутствии фуллерена (10  $\mu$ М, 48ч) пятна формазана крупнее и интенсивнее, чем для контрольных клеток. Анализ с использованием флуоресцентной микроскопии (возбуждение 350 нм, рис. 39.А, фото 3) позволил колокализовать светящиеся красные сигналы от F-828 и фиолетовые сигналы от формазана. Примерно половина пятен формазана (темные

области) локализована вблизи флуоресцирующих пятен фуллерена (белые пятна, рис. 39.А, фото 4 и 5).

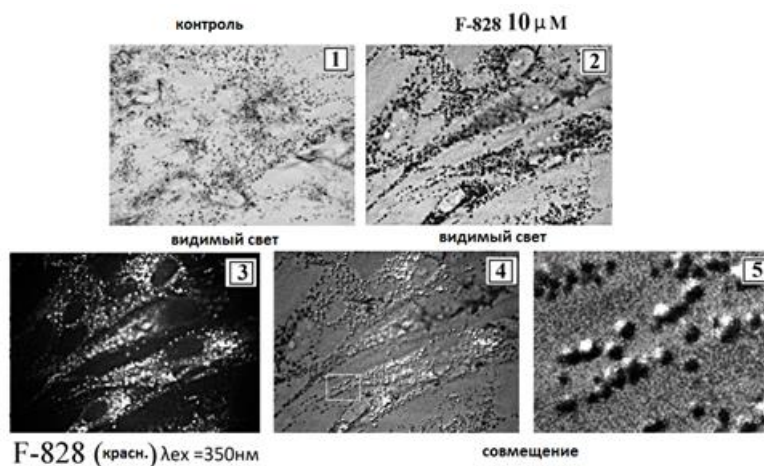


Рисунок 39. Данные для фуллерена F-828. (МТТ-тест, микроскопия): 1 – контрольные клетки (видимый свет); 2 и 3 (соответственно видимый свет и флуоресценция,  $\lambda_{ex} = 350\text{nm}$ ); 4 и 5 - совмещение изображений 2 и 3. Фото 1-4 – увеличение X40; фото 5 – изображение в рамке на фото 4 увеличено в 8 раз. ФЛЭЧ культивировали 72 ч в присутствии 10 мкМ F-828.

Отсутствие флуоресценции вблизи некоторых темных пятен формазана трактуется неоднозначно. Возможно, флуоресценция в этих пятнах тушится большими количествами формазана. Можно предположить, что, хотя бы частично, восстановление МТТ до формазана в цитоплазме клеток происходит вблизи молекул F-828.

Предполагается, что МТТ тест оценивает, в основном, состояние митохондрий клеток. Поэтому проанализировали состояние митохондрий, применив митотрекер TMRM. Методом флуоресцентной микроскопии показано, что интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных митотракером, уменьшается уже при концентрации фуллерена 4 мкМ (рис. 40. Б). Флуоресцентная микроскопия подтверждает снижение интенсивности сигнала TMRM в митохондриях экспонированных клеток. Однако не наблюдали изменения рисунка и площади митохондрий, характерного для деградирующих митохондрий (рис. 40.Б).

Снижение интенсивности сигнала TMRM могло быть связано с двумя процессами: (1) тушение молекулами F-828; (2) перенос энергии с митотрекера на молекулу F-828. Оба механизма возможны в том случае, если молекулы митотрекера и фуллерена локализованы вблизи друг друга, т.е. в митохондриях. Ранее уже сообщалось о



преимущественной локализации других производных фуллеренов в митохондриях клеток [121-123].

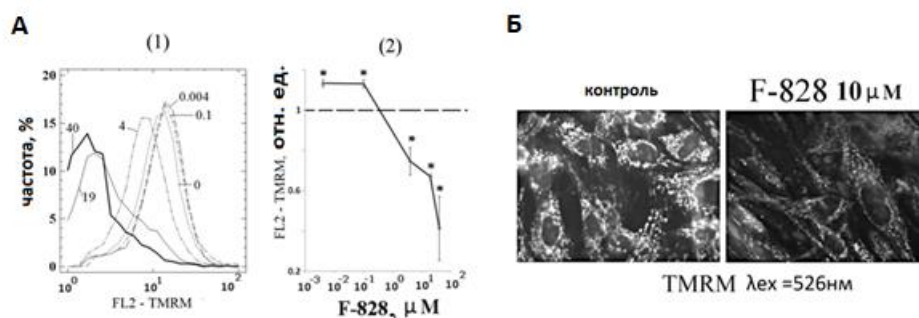


Рисунок 40. Данные для фуллерена F-828. А (проточная цитофлуориметрия) Клетки культивировали в присутствии F-828 48 ч и окрашивали TMRM. (1) – распределение клеток по интенсивности сигнала TMRM, цифрами указаны концентрации F-828 в мкМ. (2) – зависимость медианы значений сигнала TMRM от концентрации F-828. Б (флуоресцентная микроскопия): Окраска контрольных и культивированных с F-828 (10 мкМ, 48 ч) ФЛЭЧ митотрекером,  $\lambda_{ex} = 350$  нм.

Увеличение сигнала МТТ-теста при действии производным фуллерена F-828 в концентрации 10-20  $\mu\text{M}$  на фибробласты могло быть связано как с увеличением количества пролиферирующих клеток в популяции, так и с клеточным ответом на стресс, вызываемый фуллереном. Кроме того, известно, что наночастицы могут индуцировать восстановление МТТ до формазана в определенных условиях, продуцируя супероксид анион [124, 125]. Для того, чтобы понять данный эффект, исследованы уровень пролиферации и клеточной гибели (см. стр. 128).

Для оценки цитотоксичности других исследованных водорастворимых производных фуллеренов также проведен стандартный МТТ-тест. Не отмечалось нелинейной зависимости с резким возрастанием показателей ни для одного из других соединений. Показано, что в диапазоне концентраций 30 пМ – 0,4 мМ соединения GI-761, VI-419-РЗК не токсичны для ФЛЭЧ (рис. 41. А, В). Поскольку использование МТТ-теста для производных фуллерена не всегда корректно [126], подтвердили полученные результаты, проанализировав количество прикрепленных фибробластов через 3 суток после воздействия исследуемого соединения на культуру ФЛЭЧ и оценили количество ДНК прикрепленных клеток (рисунок 41. Б, Г).



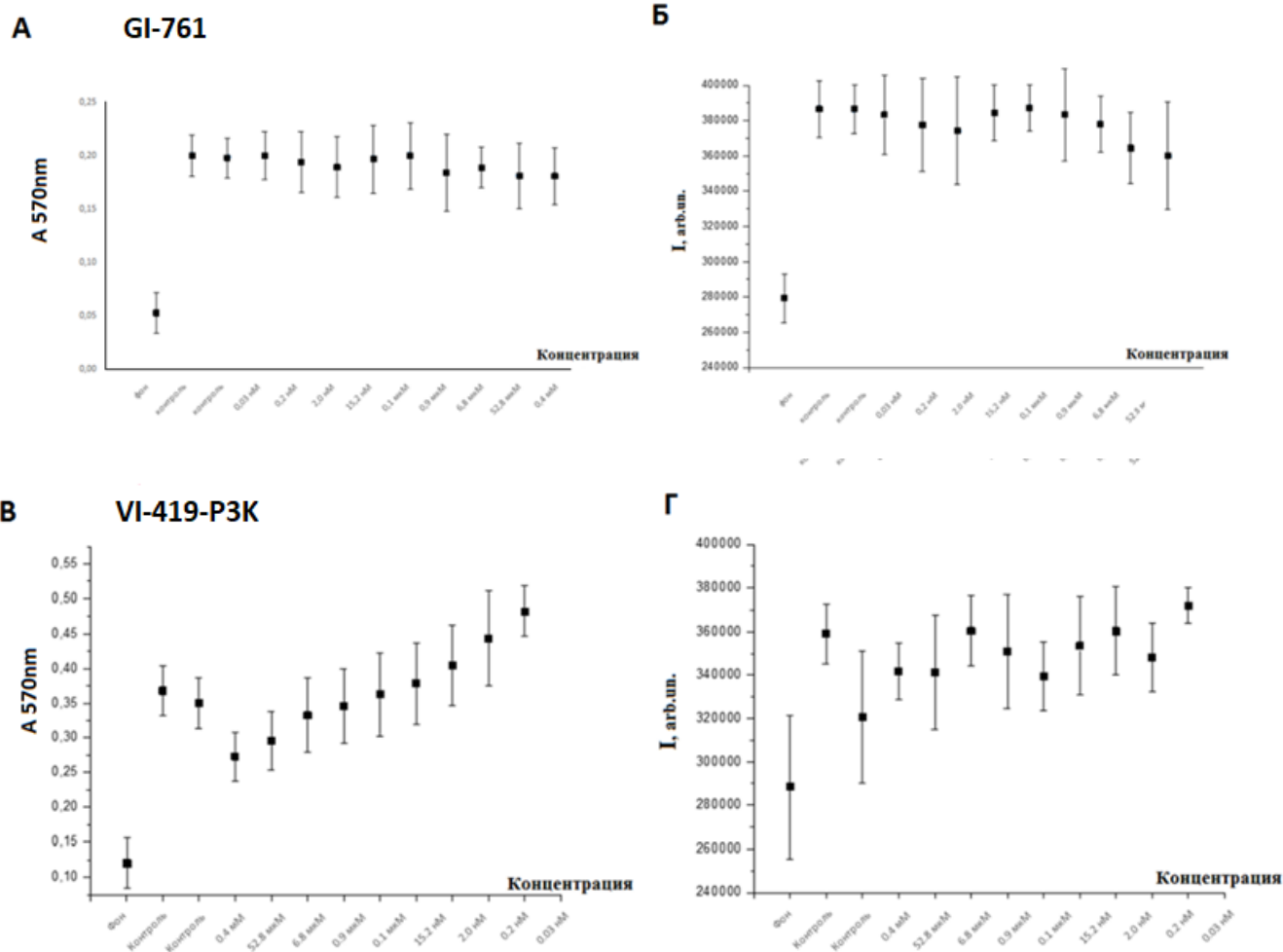


Рисунок 41. GI-761: А, В - МТТ-тест: по оси X- концентрации фуллерена GI-761, по оси Y – оптическая плотность при 570нм. Б, Г - по оси X- концентрации фуллерена GI-761, по оси Y – интенсивность сигнала красителя Hoechst 33342.

Для соединения ОКР-111 не цитотоксичными для клеток являются концентрации ниже 80 нМ (рис. 42. А, Б). ОКР-112 в большей степени подавляет метаболическую активность эмбриональных фибробластов – отсутствие ингибирующего эффекта соединения ОКР-112 отмечалось для концентраций менее 1,4 нМ. Наименее цитотоксичным для ФЛЭЧ является водорастворимое производное VI-434К2 с присоединенными остатками арилмеркаптокарбоновой кислоты: концентрация соединения ниже 350 мкг/мл является нетоксичной для клеток (рис. 42. В), это самое нетоксичное из всех исследованных водорастворимых производных фуллерена C60.

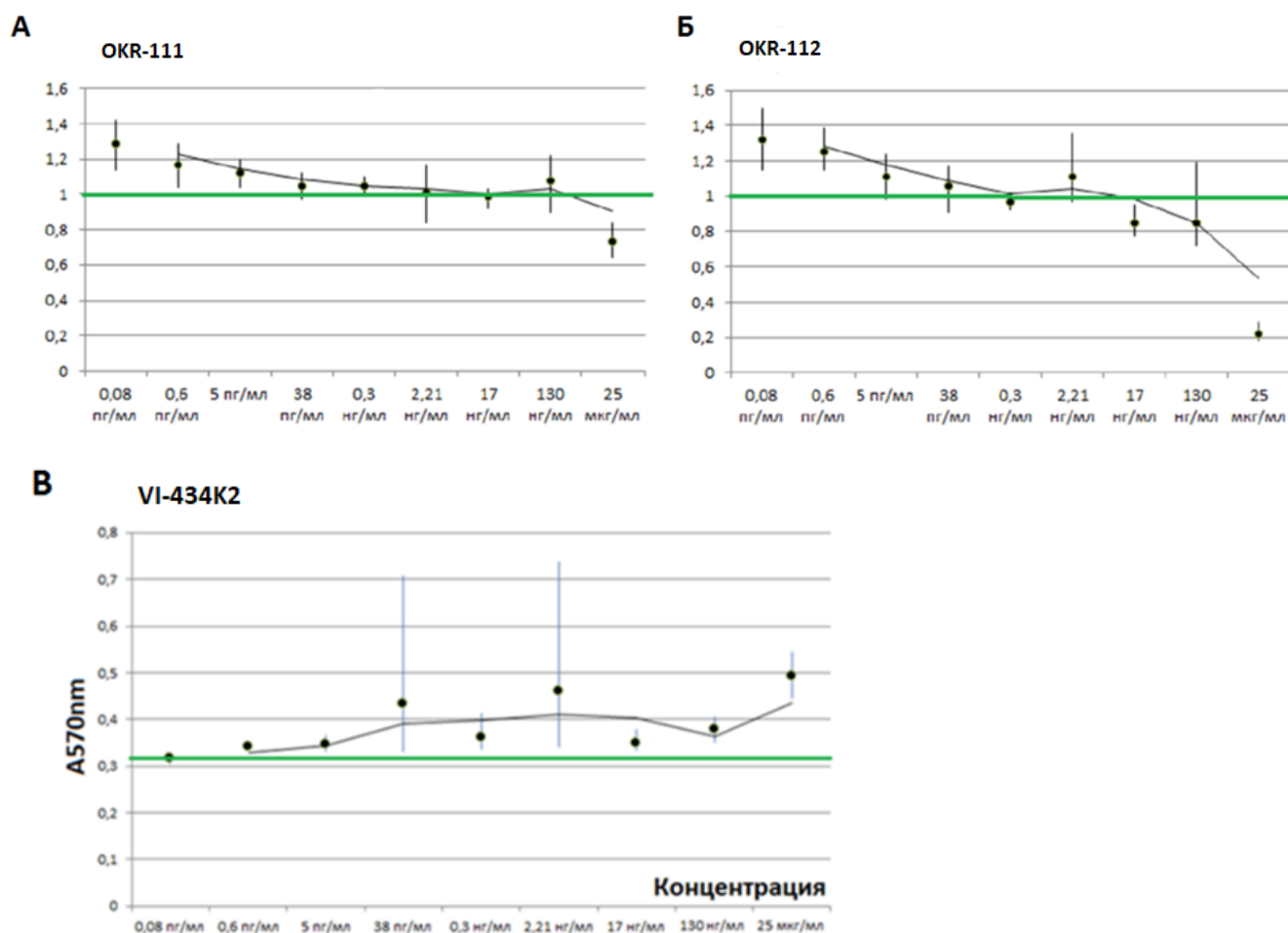


Рисунок 42. Данные МТТ-теста. А- МТТ-тест для соединения ОКR-111, Б – МТТ-тест для соединения ОКR-112, В - МТТ-тест для соединения VI-434K2: по оси X- концентрации фуллерена, по оси Y – оптическая плотность при 570 нм.

### 3.3. Влияние водорастворимых производных фуллерена на синтез активных форм кислорода и на экспрессию генов, отвечающих за развитие окислительного стресса в клетках ФЛЭЧ

Производные фуллеренов в водных растворах являются мощными антиоксидантами за счет наличия большого количества сопряженных двойных связей в их структуре, которые могут выступать в качестве «губки» для свободных радикалов. Однако в литературе наличествует большое количество противоречивых данных: некоторые исследователи описывают мощные антиокислительные способности производных фуллеренов, тогда как другие отмечают признаки окислительного стресса в клетках, инкубированных с веществами на основе каркаса фуллерена. Для подробного исследования этого вопроса проведена серия экспериментов с исследованием скорости

образования активных форм кислорода в клетках, культивированных с производными фуллерена C<sub>60</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и другие активные формы кислорода (АФК) имеют большое значение для функционирования клеток. В живой клетке образование АФК имеет место в цитоплазме, на поверхности клеточной мембраны и в ядре. Кроме того, клетки продуцируют молекулы пероксида водорода в межклеточную среду. АФК принимают участие в реализации многих клеточных процессов, таких, как пролиферация, апоптоз и межклеточная сигнализация, участвуют в регуляции клеточного цикла, активности протеинкиназ и генной экспрессии. Увеличение уровня АФК в клетке приводит к окислительному стрессу и может вылиться в гибель клетки [127-129].

Предполагается, что АФК являются причиной многих заболеваний и старения организма человека. Поэтому постоянно проводится поиск новых соединений, связывающих АФК. Химическая структура исследуемых производных фуллерена позволяет предположить, что они могут взаимодействовать с активными формами кислорода, которые образуются в результате клеточных процессов и могут являться потенциальными антиоксидантами. Каркас фуллерена обладает большой электроотрицательностью, легко образует комплексы с переносом заряда и служит эффективным акцептором электронов. Поэтому исследовали изменение уровня АФК в клетках ФЛЭЧ в присутствии различных производных фуллерена C<sub>60</sub>. Эмбриональные фибробласты легкого выбраны как удобная модель для исследования действия любых соединений на клетки, поскольку эти клетки позволяют проводить большее количество пассажей и на этих же клетках можно исследовать такие свойства фуллеренов как противовирусная активность, радиопротекторные свойства и т.д., которые в данной работе не исследованы.

Для изучения влияния производных фуллерена на изменение уровня АФК в клетке использован известный реагент H<sub>2</sub>DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат), который используется для определения АФК в клетках с 1992 года [130]. Этот краситель проникает через мембрану клеток, где он подвергается деацетилированию внутриклеточными эстеразами. В цитоплазме нефлуоресцирующий дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH) может окисляться различными радикалами АФК до флуоресцентного дихлорфлуоресцеина (DCF) [130].

Детекция синтеза АФК может быть осуществлена разными методами. С помощью метода флуоресцентной микроскопии можно проанализировать локализацию сигналов

АФК в клетках. Метод проточной цитометрии позволяет определить средний уровень АФК в клетке. Метод, включающий использование планшетного ридера, в отличие от цитометрии, позволяет количественно определить суммарный уровень АФК в культуре клеток. С помощью этого метода можно проанализировать синтез АФК в очень большом количестве образцов в одинаковых условиях, поэтому он оптимален для первичного анализа влияния различных факторов на синтез АФК в клетках. Этим методом проанализирован уровень АФК в клетках ФЛЭЧ под действием всех исследованных в работе производных фуллеренов. Выяснили, что в зависимости от функциональных групп фуллерены могут как снижать уровень синтеза АФК, так и вызывать вторичное повышение уровня АФК в широком диапазоне концентраций.

Влияние фуллерена на уровень АФК в клетках ФЛЭЧ проанализировано для всех исследуемых производных фуллерена C<sub>60</sub>.

### **3.3.1. Исследование влияния соединений GI-761 и VI-419-РЗК на синтез активных форм кислорода и на экспрессию (на уровне РНК и белка) генов, отвечающих за развитие окислительного стресса (семейства NOX) в ФЛЭЧ**

Уровень синтеза АФК определяли с помощью планшетного ридера с термостатируемой платформой (Enspire, Финляндия). Клетки ФЛЭЧ культивировали в CO<sub>2</sub> – инкубаторе в присутствии фуллерена GI-761 в концентрации 0.004, 0.4, 4 и 20 мкМ в течение 1, 3 и 24 ч. Опыт проводили в 8 параллельных лунках планшета. Определяли средние значения интенсивности сигнала и стандартное отклонение для 8 лунок. В качестве контролей использовались клетки, которые культивировали такое же время, но без фуллерена (контроль) и среду культивирования (фон). По окончании времени воздействия фуллерена на клетки добавляли раствор H<sub>2</sub>DCFH-DA и анализировали изменение флуоресценции сигнала (длины волн  $\lambda$  возбуждения = 495 нм,  $\lambda$  эмиссии = 526 нм) в зависимости от времени инкубации клеток в присутствии красителя. Получали зависимость увеличения флуоресценции DCF от времени, которая представлена на рисунке 43. Угол наклона между кривой и осью X отражает скорость синтеза DCF (*k*). Для получения величины угла наклона применяли линейную аппроксимацию. Коэффициенты линейной регрессии оказались не ниже 0.96 ( $p < 0.0001$ ). Скорость синтеза DCF отражает количество АФК в клеточной культуре. Результаты представляли в виде отношения констант скорости синтеза *ki/k0*.

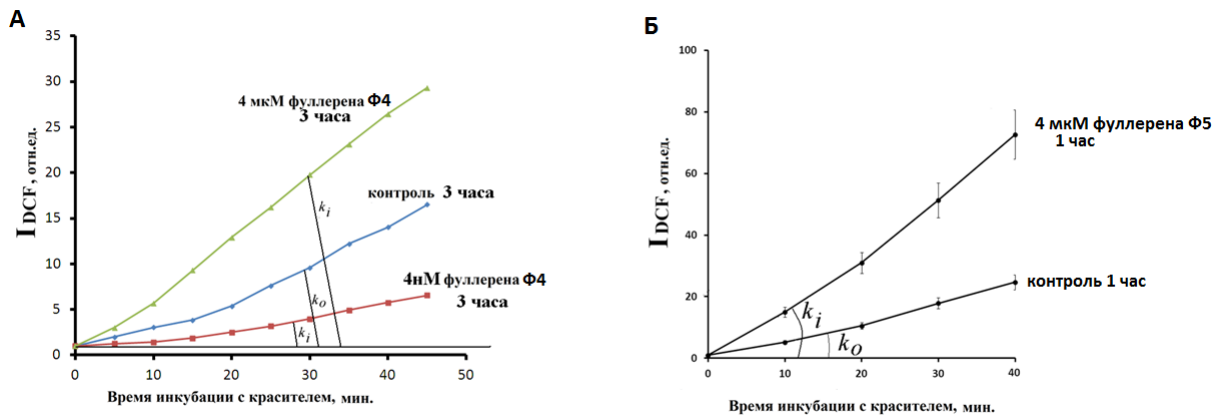


Рисунок 43. Пример анализа уровня АФК в клетках ФЛЭЧ при действии фуллерена GI-761 (А) и VI-419-РЗК (Б). Клетки культивировали 3 ч в присутствии GI-761 (А), 1 час в присутствии фуллерена VI-419-РЗК (Б) или без фуллерена (контроль).

На рисунке 44 приводятся соответствующие зависимости для анализируемых концентраций фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК через 1, 3 и 24 ч инкубации клеток с фуллереном.

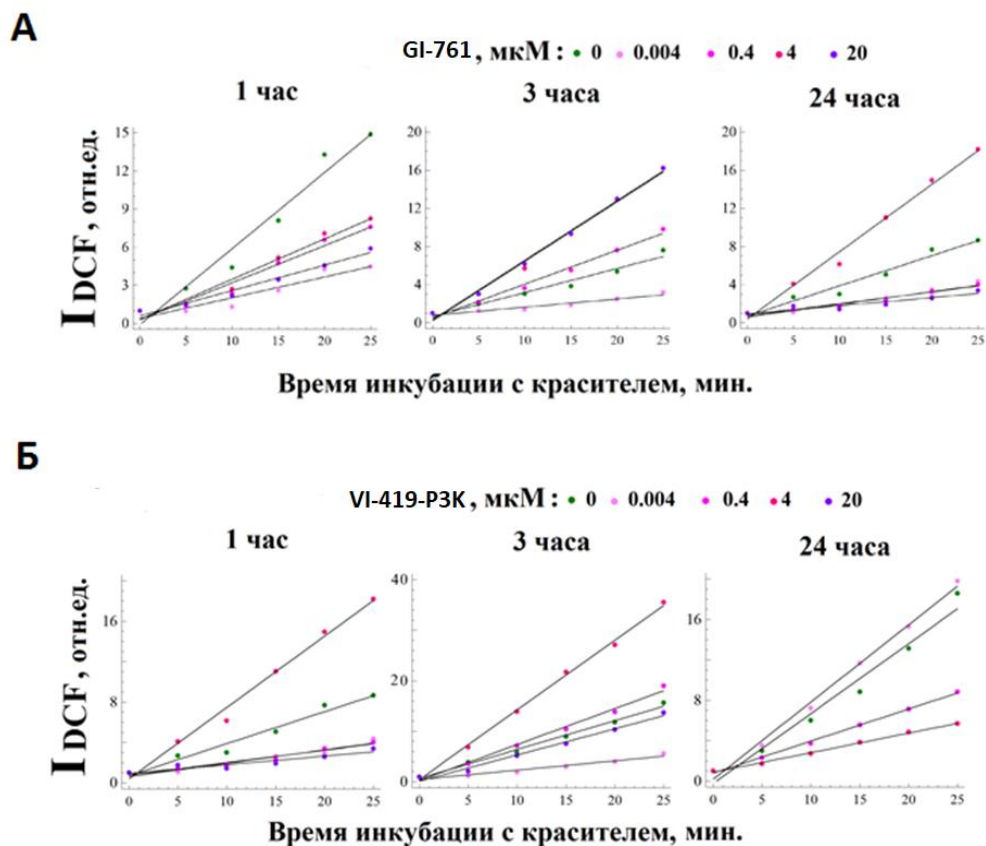


Рисунок 44. Зависимость сигнала DCF от времени инкубации клеток в присутствии GI-761 и VI-419-РЗК. Приводятся данные линейной аппроксимации (прямые).

На рисунке 3.17. приведены данные относительных констант скорости синтеза DCF в клетках.

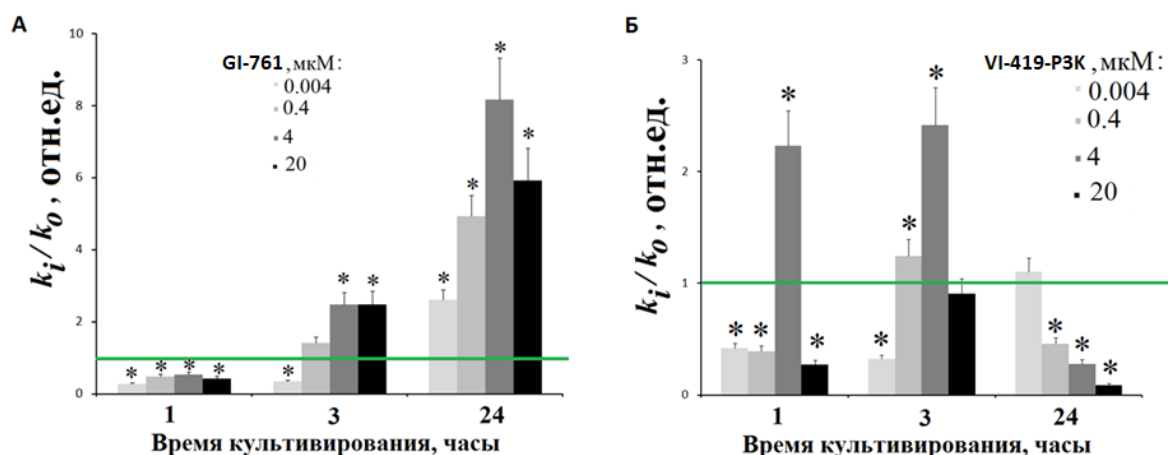


Рисунок 45. Гистограммы, отражающие зависимость уровня АФК в клетках от времени инкубации и от концентрации GI-761 (А) и VI-419-РЗК (Б) в клетках. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля, зеленая линия ( $p < 0.05$ ).

При малом времени действия фуллерена GI-761 на клетки (1 час) низкие (0.004 и 0.4 мкМ) и высокие (4 мкМ и 20 мкМ) концентрации фуллерена значительно снижают количество АФК в клетках. Еще через 2 ч количество АФК в клетках в присутствии 0.4, 4 и 20 мкМ фуллерена возрастает. При концентрации 4 нМ уровень АФК не изменяется, он по-прежнему ниже контрольного. Через сутки инкубации ФЛЭЧ в присутствии фуллерена GI-761 наблюдали значительное возрастание уровня АФК при концентрациях 4 нМ, 0.4, 4 и 20 мкМ фуллерена.

При малом времени действия фуллерена VI-419-РЗК на клетки (1 час) низкие (0.004 и 0.4 мкМ) и высокая (20 мкМ) концентрации фуллерена значительно снижают количество АФК в клетках. Концентрация 4 мкМ стимулирует синтез АФК. Еще через 2 ч количество АФК в клетках в присутствии 0.4 и 20 мкМ фуллерена возрастает. При концентрации 4 нМ уровень АФК не изменяется. В концентрации 4 мкМ фуллерен по-прежнему стимулирует синтез АФК в наибольшей степени. Через сутки инкубации ФЛЭЧ в присутствии фуллерена VI-419-РЗК вновь наблюдали значительное уменьшение уровня АФК при концентрациях 0.4, 4 и 20 мкМ фуллерена. Уровень АФК возрастал в присутствии 4 нМ фуллерена, но не превышал контрольных значений.

На рисунке 46 приводится схема, иллюстрирующая изменение уровня АФК в фибробластах при действии фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК.

При всех исследуемых концентрациях GI-761 в среде культивирования наблюдается быстрое снижение уровня АФК в клетках, которое к трем ч сменяется возрастанием уровня АФК. Максимальное увеличение уровня АФК через 24 ч культивирования наблюдается при концентрации фуллерена 4 мкМ.

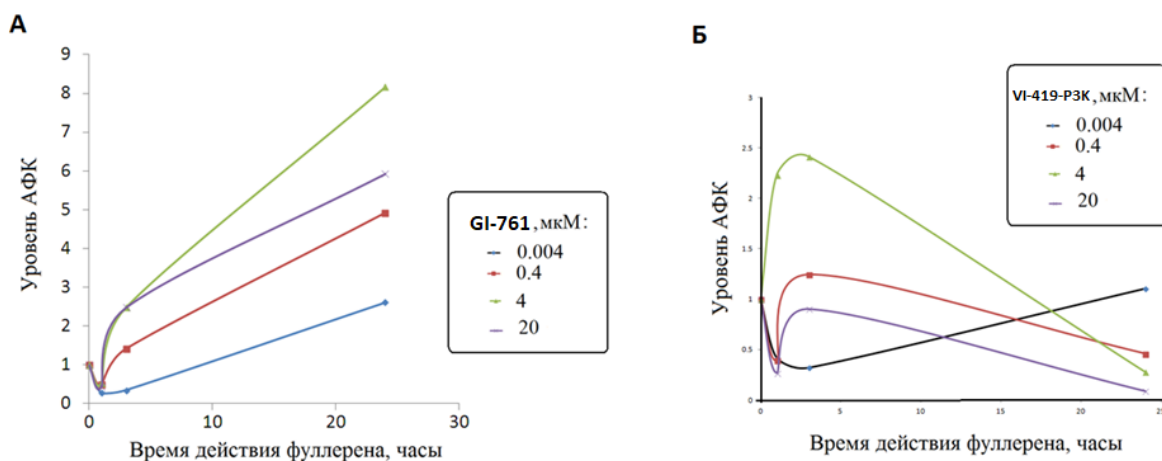


Рисунок 46. График зависимости уровня АФК от времени культивирования. Построено по данным рисунка 4-3. Погрешность измерения для удобства не приводится.

При очень низких концентрациях VI-419-P3K в среде культивирования (в наномолярном интервале) наблюдается быстрое снижение уровня АФК в клетках, которое продолжается не менее трех ч, и возвращение уровня АФК до контрольных значений через 24 ч культивирования.

При низкой концентрации (0,4 мкМ) уровень АФК через 1 час падает, затем через 3 ч возрастает выше контрольного и через 24 ч вновь уменьшается.

При средней концентрации VI-419-P3K в среде культивирования (4 мкМ) значительное увеличение уровня АФК наблюдали уже через 1 час после воздействия. Через 3 ч уровень АФК оказался также значительно повышен. Через 24 ч синтез АФК клеткой оказался блокирован ниже контрольных значений.

Высокая концентрация фуллерена способствовала быстрому снижению уровня АФК через 1 час, повышению до контрольного уровня через 3 ч и вновь очень сильному снижению через 24 ч культивирования клеток.

Нелинейные зависимости изменения уровня АФК от времени действия фуллерена при различных концентрациях указывают на сложный характер воздействия фуллерена на уровень АФК в клетках и среде культивирования. Можно предположить, что на

измеряемый уровень АФК в клетках влияют два разнонаправленных процесса. Первый процесс – это связывание АФК наночастицами фуллерена, которые вводим в среду культивирования. Однако, в ответ на первичное снижение уровня АФК фуллереном, в клеточной культуре быстро развивается процесс, направленный на увеличение уровня АФК. Результирующий эффект определяется концентрацией фуллерена и временем наблюдения. Чтобы определить, что является причиной обнаруженной нелинейной зависимости ответа клеток на действие GI-761 и VI-419-РЗК, проанализировали несколько клеточных параметров, которые могут влиять на уровень АФК в клетке.

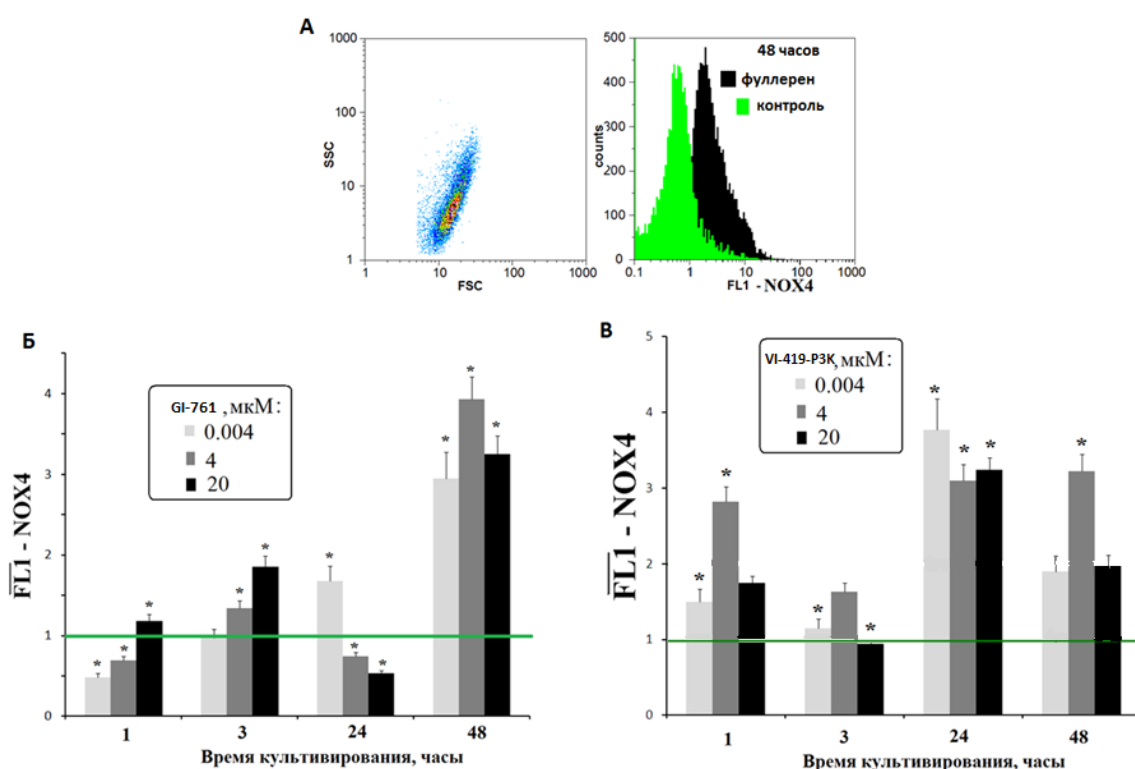


Рисунок 47. А - Пример определения количества белка NOX4 в клетках ФЛЭЧ с использованием проточной цитометрии. На графике слева приведены параметры, отражающие гомогенность культуры. Гистограммы отражают распределение клеток по содержанию белка NOX4 в клетках. Б, В - Изменение количества белка NOX4 в клетках ФЛЭЧ при действии фуллерена GI-761 (Б) и VI-419-РЗК (В) в концентрации 0.004, 4 и 20  $\mu\text{M}$  в течение 1, 3, 24 и 48 ч. По оси У приводится среднее значение интенсивности флуоресценции одной клетки культуры, обработанной антителами к белку NOX4. Учтены фоновые значения флуоресценции, обусловленные неспецифичной сорбцией флуорохромированных антител на клетках. Контроль – среднее значение сигнала для всех опытов. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля, зеленая линия ( $p < 0.05$ ).



Основным продуцентом физиологических количеств АФК в клетках являются NADPH оксидазы [133] (семейство NOX). В фибробластах экспрессируются два фермента семейства NOX – это NOX2 и NOX4. Эти ферменты катализируют синтез супероксиданиона (NOX2) и пероксида водорода (NOX4). Количественное определение белка NOX4 проводили с использованием метода проточной цитометрии (рис. 47. А).

Для характеристики содержания белка в клетках использовали средние значения показателя FL1-NOX4 (флуоресценция антител к NOX4 с максимумом длины волны 488 нм) на одну клетку. На рисунке 47.Б приведены результаты эксперимента. Спустя 1 час после добавления в среду культивирования GI-761 в концентрации 4 нМ или 4 мкМ фуллерен вызывает снижение уровня экспрессии белка NOX4 в клетках. Концентрация 20 мкМ повышает уровень этого белка. Через 3 ч культивирования в клетках наблюдается повышение количества белка при всех исследуемых концентрациях фуллерена. Максимальные количества NOX4 тестируются по-прежнему при 20 мкМ фуллерена. Более длительное культивирование (24 ч) сопровождается повторным снижением количества белка NOX4 в фибробластах при 4 и 20 мкМ концентрациях производного фуллерена GI-761. Через 48 ч повышенный уровень экспрессии белка наблюдали при всех использованных концентрациях фуллерена. Таким образом, как и для изменений уровня АФК, для изменений уровня белка NOX4 в фибробластах обнаружена нелинейная зависимость содержания белка в клетках от времени и концентрации добавленного в среду культивирования клеток фуллерена.

При действии фуллерена VI-419-РЗК на ФЛЭЧ (рис. 47. В) спустя 1 час после добавления соединения в среду культивирования в концентрации 4 мкМ фуллерен вызывает повышение уровня экспрессии белка в клетках. Концентрации 0.004 и 20 мкМ снижают уровень белка. Через 3 ч культивирования в клетках наблюдается снижение количества белка при всех исследуемых концентрациях фуллерена. Максимальные количества NOX4 тестируются по-прежнему при 4 мкМ фуллерена. Более длительное культивирование (24 ч) сопровождается повторным увеличением количества белка NOX4 в фибробластах при всех исследуемых концентрациях фуллерена VI-419-РЗК. Через 48 ч повышенный уровень экспрессии белка наблюдали только при 4 мкМ фуллерена VI-419-РЗК.

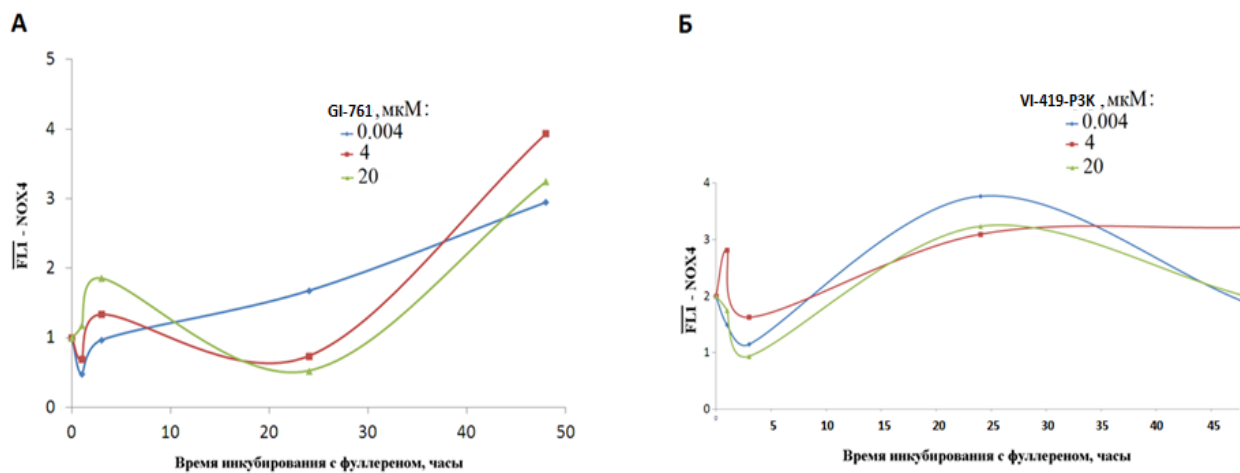


Рисунок 48. График зависимости уровня белка NOX4 от времени культивирования ФЛЭЧ в присутствии различных концентраций в среде культивирования фуллерена GI-761 (А) и VI-419-РЗК (Б). Погрешность измерения приводится на рисунке 47.

Таким образом, как и для изменений уровня АФК, так и для изменений уровня белка NOX4 в фибробластах, обнаружена нелинейная зависимость содержания белка в клетках от времени и концентрации добавленного в среду культивирования клеток фуллерена.

На рисунке 48 приводится профиль изменения количества в клетках белка NOX4 в зависимости от времени культивирования клеток в присутствии фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК.

Проанализирована зависимость уровня АФК в клетках, определяемого по скорости образования DCF, от уровня фермента NOX4, который определяли методом проточной цитометрии. Для трех времен культивирования клеток в присутствии трех различных концентраций фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК построена зависимость. Результаты анализа приведены на рисунке 49.

В случае действия фуллерена GI-761 на клетки наблюдается подъем уровня экспрессии NOX4 через 3 ч воздействия, что ожидаемо сопровождается повышением уровня АФК в клетках. Однако, через 24 ч, несмотря на снижение уровня NOX4 в клетках, повышен синтез АФК. При действии соединения VI-419-РЗК на клетки в концентрации 4 мкМ и 20 мкМ уже через 1 час возрастает уровень экспрессии NOX4, что через 3 ч сопровождается повышенным синтезом АФК в клетках. Однако, через 24 ч уровень экспрессии NOX4 в клетках возрастает, при этом уровень АФК снижается.

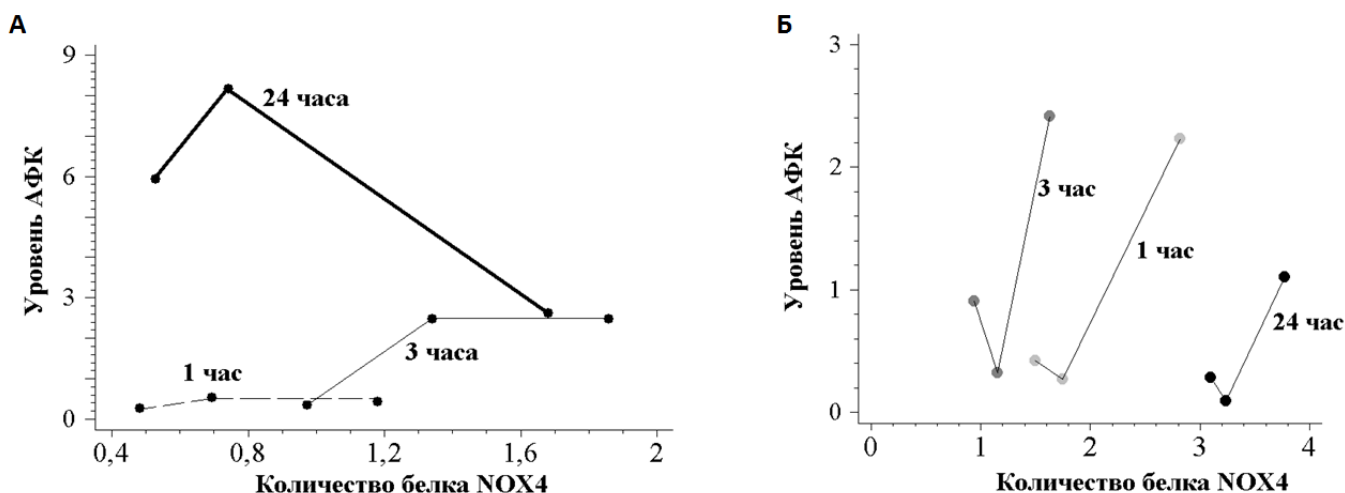


Рисунок 49. Зависимость уровня АФК в клетках ФЛЭЧ от уровня белка NOX4 при различных временах инкубирования ФЛЭЧ с фуллереном GI-761 (А) и VI-419-РЗК (Б).

Уровень NOX4 и АФК определяли с использованием флуоресцентных методов. Известно, что интенсивность флуоресценции существенно зависит от окружения флуоресцирующей группы. Наличие тушителей флуоресценции и поглощение сигнала другими оптически плотными структурами может привести к неверному выводу о снижении количества флуоресцирующих групп. Например, кажущееся снижение интенсивности сигнала АФК при малом увеличении количества NOX4 могло быть связано с миграцией продуцента АФК с клеточной поверхности или из цитоплазмы в структуры ядра. Поэтому важно проследить, каким образом изменяется локализация фермента в клеточных структурах.

Для оценки локализации белка NOX4 в клетках, обработанных фуллереном, применили метод флуоресцентной микроскопии. Клетки фиксировали 3% раствором формальдегида, обрабатывали 0.1 % раствором тритона X-100 для повышения проницаемости мембраны и белок визуализировали путем связывания с антителами, мечеными ФИТЦ. Анализ проводили с использованием микроскопа AxioScoreA1 (фирма CarlZeiss, Германия). На рисунке 50 приводятся фотографии клеток при действии производного фуллерена GI-761.

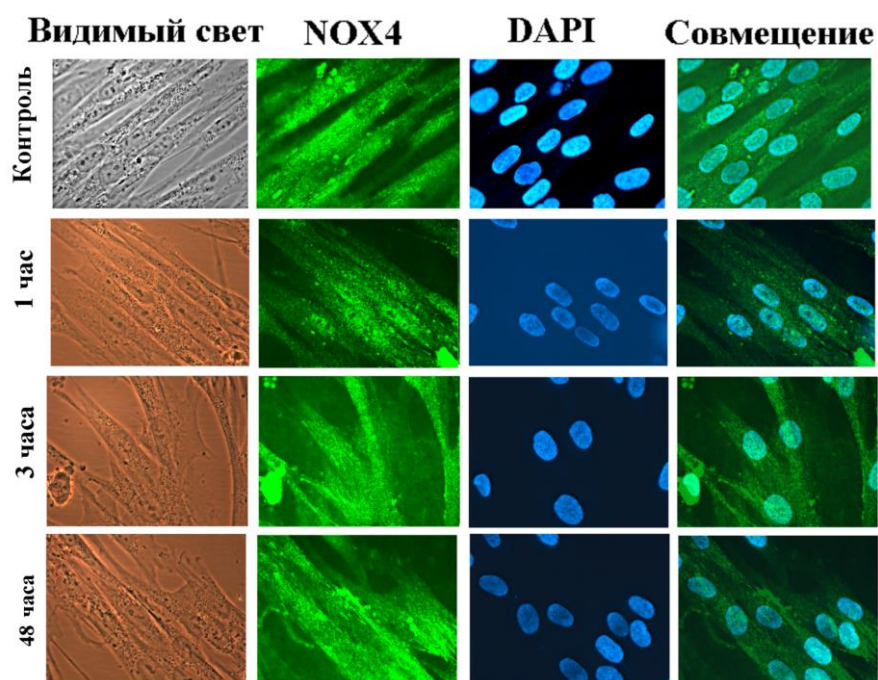


Рисунок 50. Фотографии клеток ФЛЭЧ, обработанных фуллереном в концентрации 4 мкМ в течение 1, 3 и 48 ч. Для визуализации ядер клеток, клетки подкрашивали раствором ДНК-связывающегося красителя DAPI. Фотографии клеток в видимом свете (видимый свет), при использовании фильтра FITC (флуоресценция антител, меченных флуоресцеином, обозначено NOX4), при использовании фильтра DAPI (DAPI).

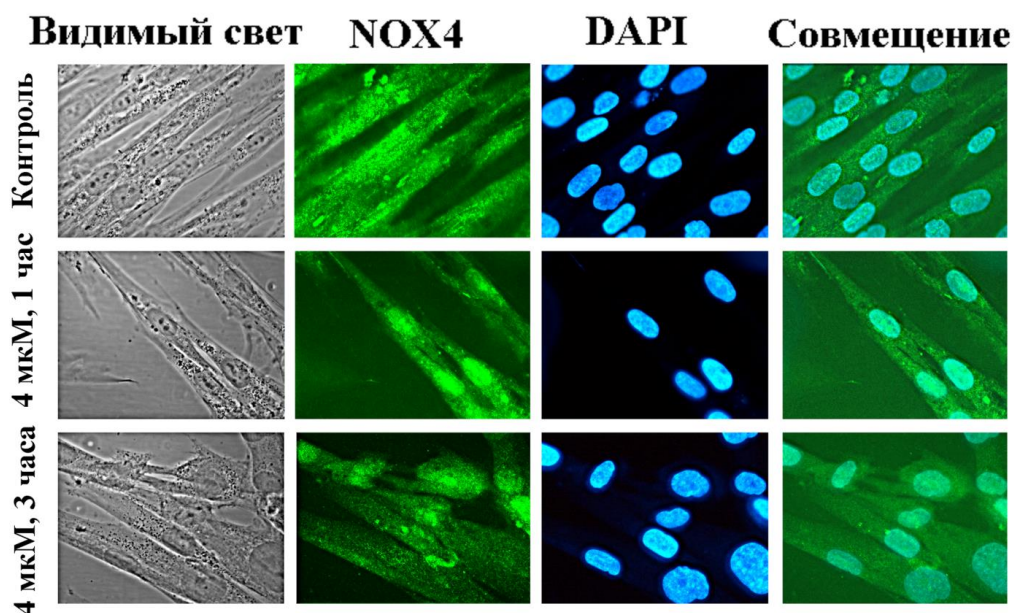


Рисунок 51. Фотографии клеток ФЛЭЧ, обработанных фуллереном VI-419-P3K в концентрации 4 мкМ в течение 1 и 3 ч. Для визуализации ядер клеток, клетки подкрашивали раствором ДНК-связывающегося красителя DAPI.

В контрольных клетках белок NOX4 локализован преимущественно в цитоплазме и вблизи цитоплазматической мембраны клеток. Малые количества белка обнаруживаются в ядрах некоторых клеток (верхний ряд фотографий на рисунке 51). Концентрации фуллеренов GI-761 и VI-419-P3K 0.004, 4 и 20 мкМ оказывали однотипное действие на изменение локализации NOX4 в зависимости от времени. Наиболее сильные изменения наблюдали в случае 4 мкМ фуллерена. На рисунках 50 и 51 в качестве примера приводятся данные именно для этой концентрации. Фуллерен стимулирует экспрессию NOX4 в ядрах клеток. Через 1 час наблюдается четкая локализация сигнала в ядрах по сравнению с цитоплазмой клеток (рисунок 50 и 51, второй ряд фотографий клеток). Через 3 ч NOX4 по-прежнему присутствует в клеточном ядре. При этом возрастает количество белка в других структурах клетки. При длительном культивировании (48 ч) уровень экспрессии NOX4 снижается в ядрах клеток и возрастает в цитоплазме клеток.

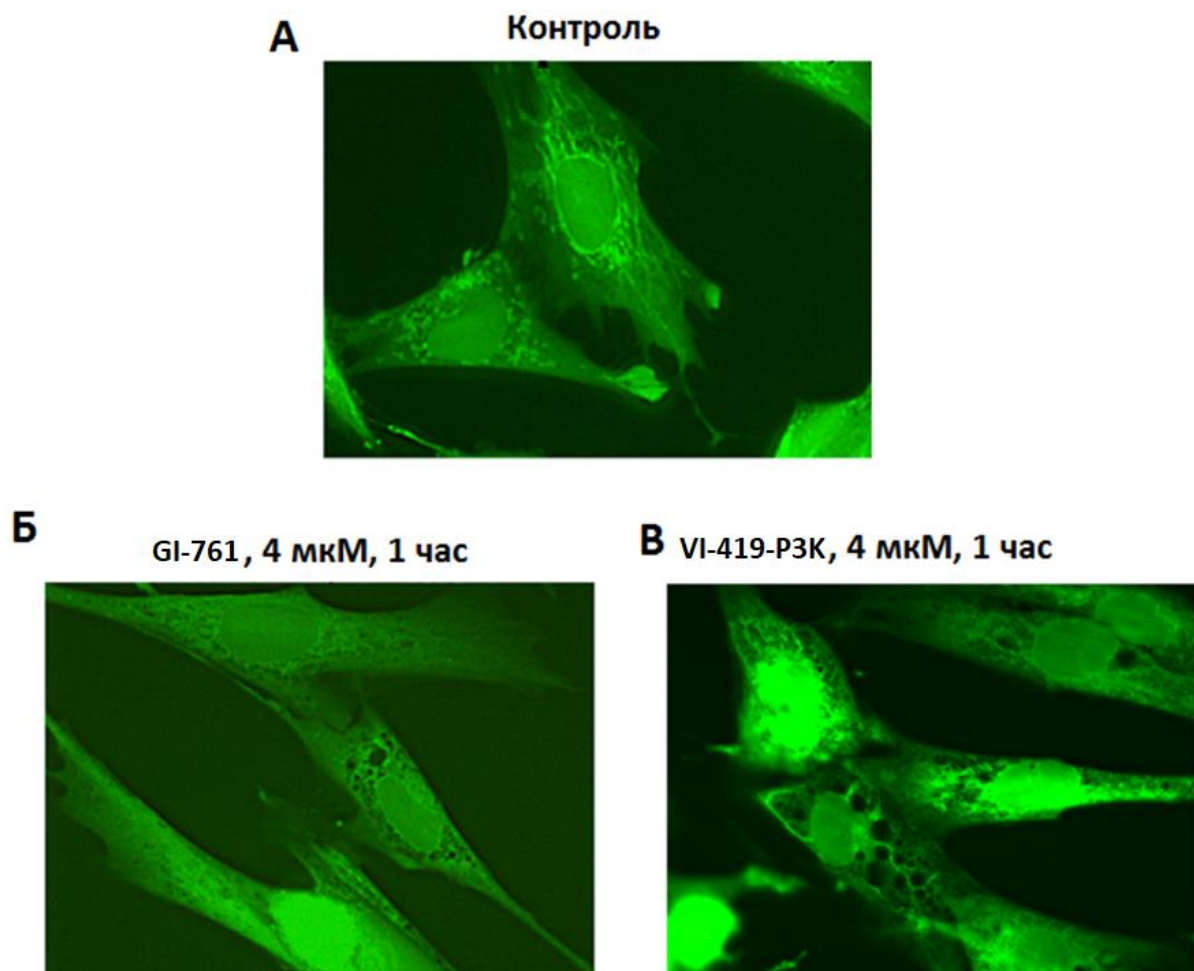


Рисунок 52. Локализация АФК в клетках контрольных (А) и обработанных 4 мкМ фуллерена GI-761 (Б) и фуллерена VI-419-P3K (В) в течении 1 ч. Увеличение X100.

Таким образом, при кратковременном культивировании ФЛЭЧ в присутствии фуллерена повышается количество NOX4 в ядрах клеток, что должно приводить к усилению синтеза АФК в ядрах клеток. Чтобы подтвердить данные иммунофлуоресценции, определена напрямую локализация АФК в нефиксированных клетках, обработанных 4 мкМ фуллерена в течение 1 ч. Для определения уровня АФК применили краситель H<sub>2</sub>DCFH-DA (2мкМ). Данные приведены на рисунке 52.

В контрольных клетках синтез АФК происходит в цитоплазме, в основном в митохондриях (извилистые яркие линии) и на поверхности клеточной мембраны (яркие пятна, удаленные от ядер). В присутствии фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК основной сигнал красителя DCF сосредоточен в клеточном ядре. Уровень АФК увеличивается, но при этом изменяется локализация АФК в клетке, что может сопровождаться кажущимся небольшим снижением уровня АФК.

Исследовано, на каком уровне регулируется экспрессия гена *NOX4*, основного продуцента АФК в клетках ФЛЭЧ, при действии фуллерена – на транскрипционном или посттранскрипционном. Определена экспрессия гена *NOX4* на уровне РНК гена. Для этого применялся метод количественной реал-тайм ПЦР. Из клеток, обработанных 4 нМ или 4 мкМ фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК, выделяли РНК, конвертировали в кДНК с помощью РНК-зависимой ДНК полимеразы и определяли методом ПЦР количество ДНК фрагмента гена *NOX4*. Данные приведены на рисунке 53.

Данные содержания РНК *NOX4* в клетках при культивировании с 4 нМ фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК (рис. 53) коррелируют с данными о содержании белка NOX4 (рис. 47). Таким образом, можно сказать, что регуляция экспрессии гена *NOX4* в ответ на действие 4 нМ фуллерена осуществляется преимущественно на уровне транскрипции гена. Количество белка в случае действия 4 мкМ фуллерена GI-761 отличается от количества РНК гена. Несмотря на одинаковые количества РНК гена, количество белка в случае действия 4 мкМ фуллерена оказалось гораздо выше, чем в случае действия 4 нМ. Исключения составили также данные для фуллерена VI-419-РЗК через 48 ч культивирования. По-видимому, фуллерен при некоторых условиях может осуществлять регуляцию количества белка на посттранскрипционном уровне.



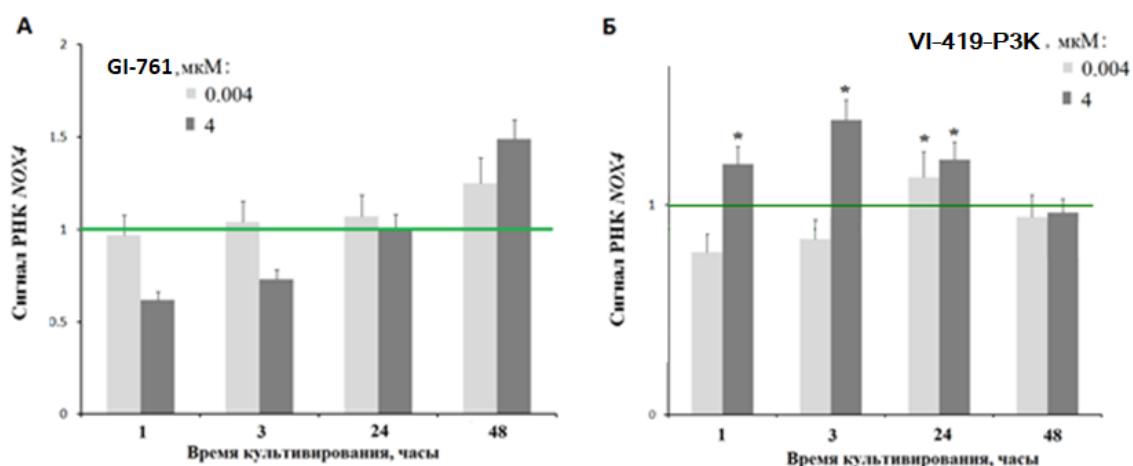


Рисунок 53. Изменение уровня экспрессии РНК гена *NOX4* при действии фуллерена GI-761 (А) и VI-419-РЗК (Б) в концентрации 4 нМ и 4 мкМ в течение 1, 3, 24 и 48 ч. Контроль – среднее значение сигнала для всех опытов, зеленая линия. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, выяснили, что в зависимости от присоединенных замещающих групп разные производные фуллерена С60 оказывают разное воздействие на регуляцию синтеза АФК в клетках (ФЛЭЧ). Это соответствует литературным данным: до сих пор не существует единой гипотезы о связи между химическим строением производных фуллерена С60 и силой его антиоксидантных свойств. [132]

Показана концентрационно-временная зависимость ответа ФЛЭЧ на добавление фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК к среде культивирования ФЛЭЧ. Обнаружили наличие «раннего» (1-3 ч) и «позднего» (24 – 48 ч) ответа ФЛЭЧ на действие фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК. Через 1 час после добавления в среду культивирования ФЛЭЧ фуллеренов GI-761 (4 нМ - 4мкМ) и VI-419-РЗК (4 нМ - 20мкМ) наблюдается падение физиологического уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках, что указывает на способность фуллеренов GI-761 и VI-419-РЗК эффективно связывать АФК, и на возможность их использования в качестве антиоксидантов (исключение составляет концентрация 4  $\mu\text{M}$  соединения VI-419-РЗК). Однако, «поздний» ответ клеток на фуллерены GI-761 и VI-419-РЗК различается – наиболее пролонгированное (до 24 ч) антиоксидантное действие оказывает фуллерен VI-419-РЗК, а фуллерен GI-761 через 24 ч вызывает вторичный синтез АФК.

Предположили, что в регуляции уровня АФК в клетках производными фуллерена участвует система антиоксидантного ответа. Поздний ответ исследуемых производных

фуллерена включает и прооксидантный и антиоксидантный ответ, уровень АФК при этом является результирующей составляющей активации разнонаправленных процессов в клетках.

### 3.3.2. Исследование влияния производных фуллерена ОКR-111 и VI-434K2 на синтез активных форм кислорода и на экспрессию (на уровне РНК и белка) генов, отвечающих за развитие окислительного стресса (семейства NOX) в культивируемых ФЛЭЧ

Химическая структура всех исследуемых соединений фуллерена позволяет предположить, что они могут взаимодействовать с активными формами кислорода, которые образуются в результате клеточных процессов. Большинство исследуемых соединений также вызывает «ранний» ответ клеток, характеризующийся снижением уровня АФК и «поздний» ответ, когда наблюдается вторичное усиление синтеза АФК.



Рисунок 54. Константы скорости синтеза DCF в клетках ФЛЭЧ, инкубированных с производными 112 и 111 в концентрациях 1,4 нМ и 80 нМ, нормированные к контролю, при временах 1 ч (синий), 3 ч (красный), 24 ч (зеленый).

На рисунке 54 представлены данные исследования скорости синтеза АФК в клетках ФЛЭЧ под действием производных 111, 112, 434. Столбцы представляют собой



константы скорости реакций образования свободных радикалов, нормированные к контролю.

Выявлено, что соединение 827 в концентрации 195 мкМ и 432 нМ понижает количество АФК в клетке в течение 1 ч инкубации, а через 3 - 24 ч уровень синтеза АФК возрастает на 20 – 35% по сравнению с контролем.

Соединение 112 в концентрации 0,62 мкМ снижает уровень синтеза АФК через 1 час, а в концентрации 2,5 мкМ 112 не вызывает изменения уровня АФК. Через 3- 24 ч соединение 112 в концентрациях 0,62 мкМ и 2,5 мкМ вызывает увеличение уровня свободных радикалов на 25 - 40%. Производное 111 в обеих концентрациях вызывает незначительное повышение АФК в клетке через час после начала инкубации, затем уровень АФК возрастает на 30-40%, через 24 ч при добавлении соединения 112 в концентрации 2,5 мкМ наблюдается тенденция к снижению уровня синтеза АФК.

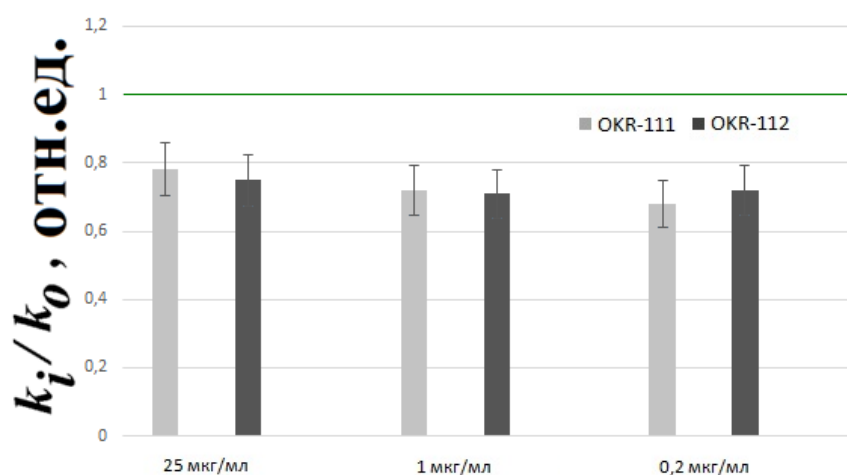


Рисунок 55. Гистограммы, отражающие зависимость уровня АФК в клетках от концентрации ОКР-111 и ОКР-112 в клетках. Время инкубации 30 мин. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля, зеленая линия ( $p < 0.05$ ).

Кроме того, исследовали уровень АФК в клетках при действии фуллеренов ОКР-111 и ОКР-112 через 30 - 50 мин. Эти соединения в концентрации от 0.12 мкМ до 15,5 мкМ эффективно снижают уровень АФК в клетках при их добавлении к среде культивирования в течение 30 мин во всех исследуемых концентрациях (рис. 55). Таким образом, и для соединений 111 и 112 обнаружено, что существует временной интервал (30 – 50 мин), в течение которого эти соединения эффективно связывают АФК в клетках.

Производное фуллерена 434 в концентрации 1,8 мкг/мл вызывает повышение АФК - незначительное через 1 ч после добавления к среде, более высокое через 3 и 24 ч (рис. 54, 56). Повышение концентрации фуллерена VI-434K2 до 30 мкг/мл приводит к стойкому снижению уровня АФК в клетках (рис. 56. А), что, по-видимому, свидетельствует о том, что в более низкой концентрации возможности фуллерена связывать синтезируемые клетками АФК.

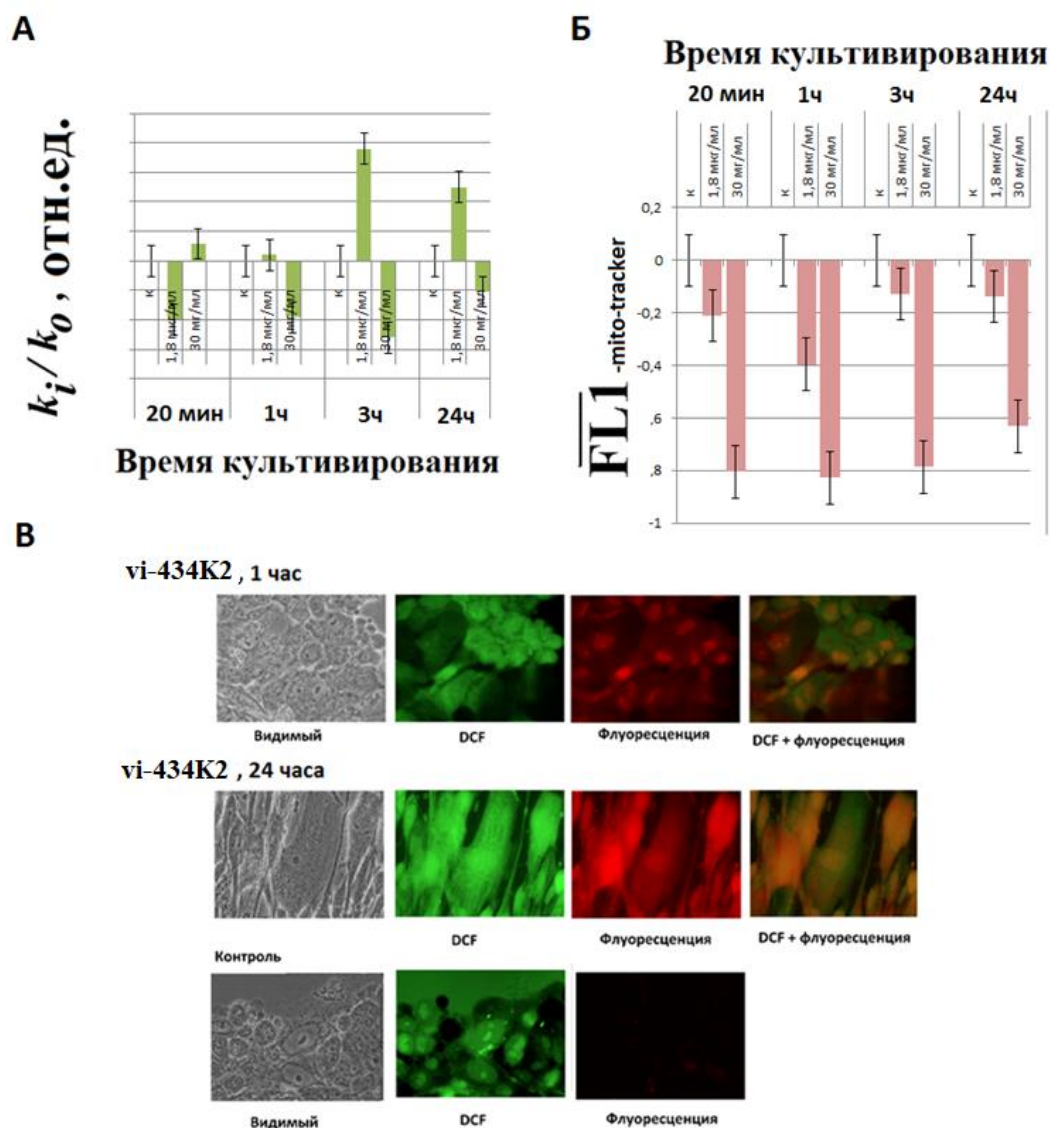


Рисунок 56. Флуоресценция красителя DCF, отражающая уровень АФК, наблюдаемая при добавлении фуллерена vi-434K2 к ФЛЭЧ (через 20 мин и через 24 ч после добавления к среде культивирования). Увеличение X40.

Исследован уровень экспрессии *NOX4*. Через 1 час после добавления к клеткам соединений ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 2,5 мкМ уровень экспрессии гена *NOX4*

возрастает в 1,68 и 1,8 раз, а в концентрации 0,62 мкМ уровень экспрессии гена остается неизменным по сравнению с контролем (рис. 57). Уровень экспрессии белка NOX4 через час после начала воздействия соединения ОКР-111 в концентрации 2,5 мкМ становится ниже контрольных значений, а через 24 ч – повышается на 40% (рис. 57, 58). Для уровня экспрессии белка NOX4 в клетках при действии соединения ОКР-112 наблюдается тенденция к повышению уже через 1 час (рисунок 56).

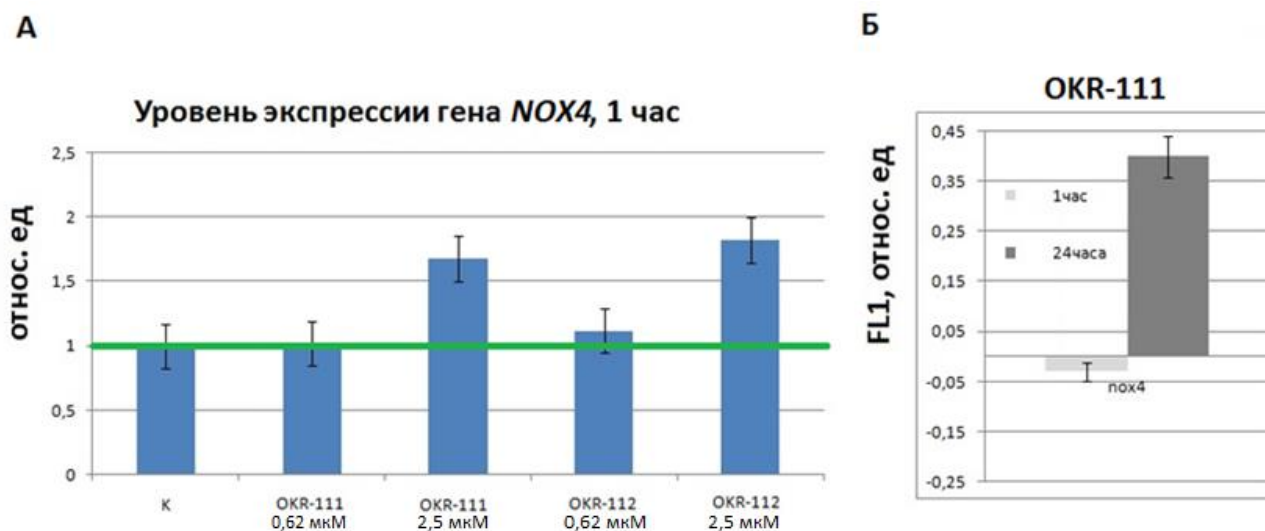


Рисунок 57. Уровень NOX4 в клетках, обработанных производными ОКР-111 и ОКР-112. А - Уровень экспрессии гена *NOX4* в клетках (ФЛЭЧ) при действии ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 0,62 мкМ и 2,5 мкМ. Количество РНК *NOX4* - среднее значение экспрессии гена *NOX4* при воздействии фуллерена (три эксперимента) по отношению к экспрессии гена *NOX4* в контроле – интактных ФЛЭЧ (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген ТВР. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0.005$ , непараметрический U-тест. Б - Гистограммы распределения медиан значений сигналов FL1- *NOX4* в клетках, обработанных ОКР-111 в концентрации 2,5 мкМ через 24 ч.

Производное фуллерена VI-434K2 также повышало уровень экспрессии гена *NOX4* в клетках ФЛЭЧ в 2 – 2,5 раза.

Помимо NADPH-оксидаз источником АФК в цитоплазме клеток являются митохондрии. Усиление окислительных процессов в митохондриях может способствовать увеличению уровня АФК, диффузии АФК в цитоплазму и их детектированию с помощью DCF вблизи митохондрий. Предположение об участии митохондрий в активации синтеза АФК проверили, окрасив клетки, обработанные производным фуллерена VI-434K2 красителем митохондрий - Mito-trackerRed580

(TMRM red). Этот краситель окрашивает только живые, функционирующие митохондрии. После добавления в среду культивирования ФЛЭЧ VI-434К2 в концентрациях 1,8 мкг/мл и 30 мкг/мл уровень сигнала TMRM снижался (рис. 56 Б), что свидетельствует о малом участии митохондрий в активации синтеза АФК, и подтверждает тот факт, что основным источником АФК при действии на клетки фуллеренов является NOX4.

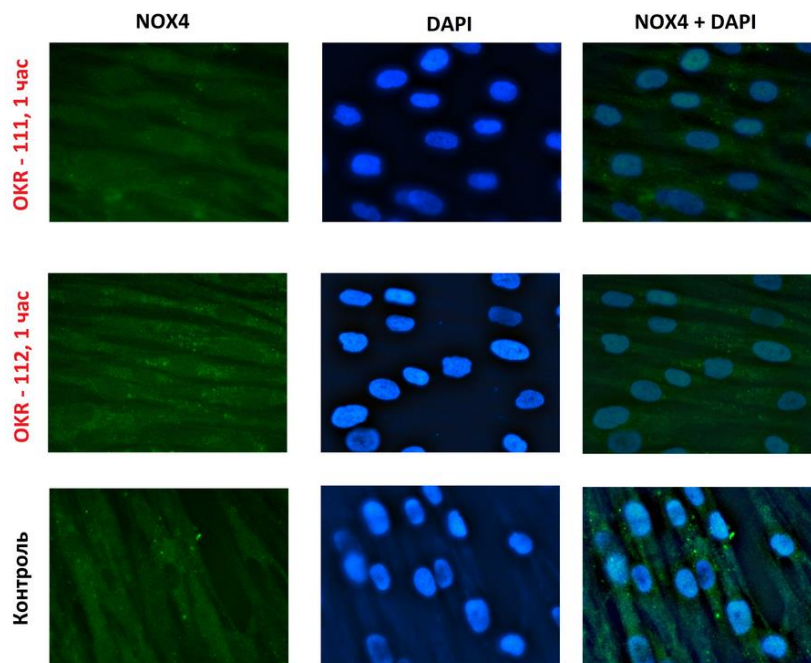


Рисунок 58. Уровень экспрессии NOX4 после воздействия производных фуллерена OKR-111 и OKR-112 в концентрации 2,5 мкМ на ФЛЭЧ (1 час). Флуоресцентная микроскопия, х40, слева направо: клетки обрабатывали антителами к NOX4, окраска ядер DAPI, совмещенная фотография.

Выявить четкую зависимость антиоксидантных свойств производных фуллерена от их химической структуры на данный момент не представляется возможным. Литературные данные касательно этого вопроса не вносят ясности, и авторы обзоров приходят к аналогичному выводу. Разное действие производных фуллерена может иметь химический (заместители нарушают или, наоборот, стабилизируют  $\pi$ -систему, приводя к более эффективной нейтрализации АФК) или биологический (заместители облегчают или затрудняют связывание соединения с биологическими структурами-мишенями) характер. [132]

### 3.3.3. Механизм развития ответа эмбриональных фибробластов легких человека на добавление водорастворимых производных фуллерена C60 к среде культивирования клеток.

Влияние производных фуллерена на клетки подробно изучено при действии производного F-828 на клетки ФЛЭЧ.

При более детальном исследовании обнаружили, что количество АФК сначала снижается, а затем возрастает в первый час после начала инкубации (ранний ответ), затем снижается и через три ч достигает минимума, а после вновь возрастает через 24-48 ч после добавления производного к среде культивирования (поздний ответ).

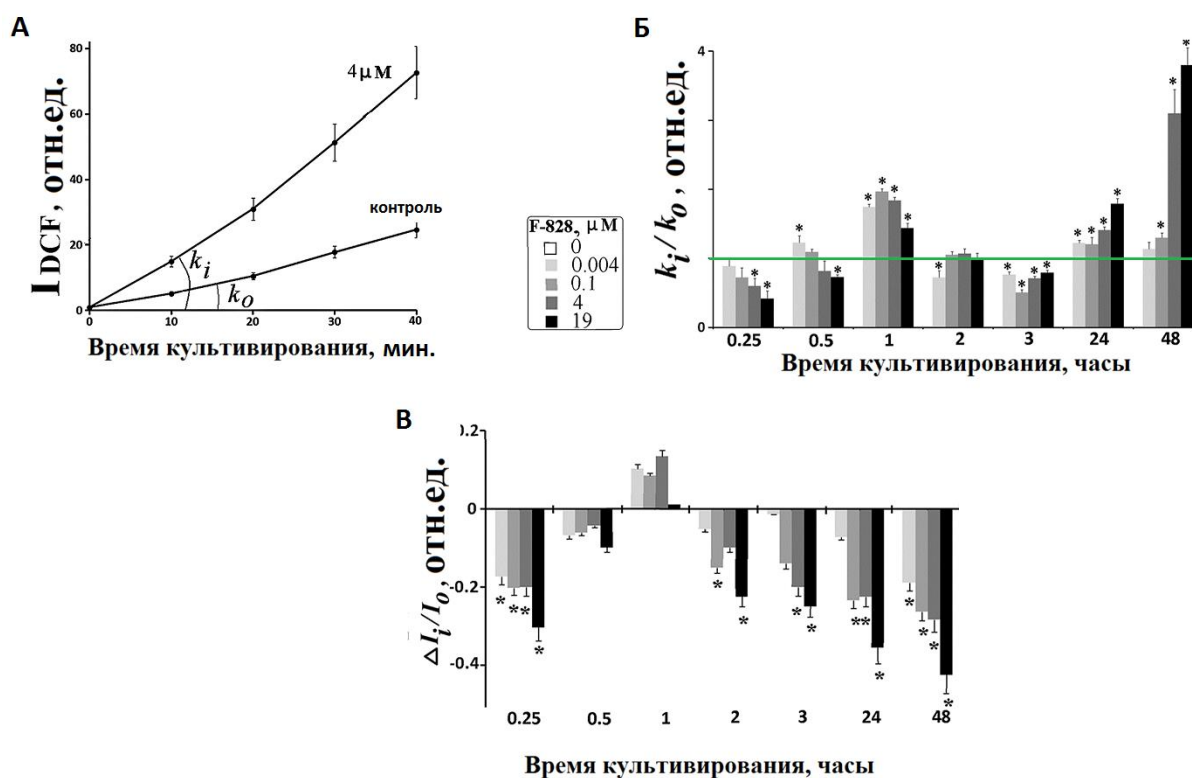


Рисунок 59. А - график зависимости интенсивности флуоресценции DCF от времени культивирования – сравнение контрольных клеток и клеток, инкубированных в течение 1 ч с 4 мкМ фуллерена F-828; Б- Уровень АФК в ФЛЭЧ. Зависимость индекса  $k_i / k_0$  (константа скорости образования DCF в  $i$ -том образце по отношению к константе скорости образования DCF в контроле) от концентрации F-828 и времени экспозиции; В - Уровни внеклеточных АФК. Зависимость индекса  $\Delta I_i / I_0$  (интенсивность флуоресценции DCF в  $i$ -том образце по отношению к интенсивности флуоресценции DCF в контроле) от концентрации F-828 и времени воздействия, I- интенсивность флуоресценции I-DCF в культуральной среде.

Уровень АФК оценивали с использованием  $H_2DCFH-DA$ . Для первичного исследования влияния производного F-828 на клетки ФЛЭЧ использован метод флуоресцентного анализа на планшетном ридере, который позволяет дать оценку общему уровню АФК в клетках. Для анализа к среде культивирования клеток сначала добавлялся фуллерен в различных концентрациях (0.004, 0.1, 4 и 19 мкМ), а затем, за 10-15 мин до измерения добавляли краситель  $H_2DCFH-DA$ . Построена зависимость интенсивности сигнала DCF от времени инкубации с исследуемым производным (рис. 59 А) и определена константа скорости реакции образования DCF (k) в клетках (рис. 3.31 Б). Также измерено изменение относительного уровня АФК в среде культивирования клеток (рис. 59 В).

Уже через 15 мин после добавления F-828 в среду (концентрации 0,004, 0,1, 4 или 19 мкМ) в ФЛЭЧ наблюдалось снижение уровня АФК (рисунок 59 Б). Значение уменьшения уровня АФК пропорционально концентрации исследуемого соединения. Через час зарегистрировали 2-кратное увеличение скорости синтеза DCF, что предполагает увеличение АФК выше контрольного уровня. Дальнейшее культивирование клеток с F-828 (2 и 3 ч) привело к снижению уровня АФК. Это ранний ответ фибробластов на присутствие в среде культивирования фуллерена F-828. Через 24 и 48 ч (поздний ответ) снова наблюдали увеличение уровня АФК, что наиболее заметно при культивировании клеток с фуллереном F-828 в концентрациях 4 и 19 мкМ. Уровень АФК в среде культивирования уменьшился через 15 мин после добавления F-828, а затем, через час, он увеличился. В ходе дальнейшей культивирования клеток уровень АФК в среде культивирования клеток уменьшался по сравнению с контролем (рис. 59 В). Количественные данные, описывающие сдвиги уровня АФК в клетках ФЛЭЧ при воздействии водорастворимых производных фуллерена, подтверждены с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 60).

В контрольных клетках АФК проявляется на клеточной поверхности, в цитоплазме и, в меньшей степени, внутри ядра. Через 15 мин после добавления производного сигнал АФК с поверхности клетки уменьшается по сравнению с контролем, однако ситуация внутри клетки не меняется (данные для 4 мкМ показаны на рисунке 60). Структуры, задействованные в синтезе АФК в цитоплазме, хорошо видны. Через 1 час после добавления можно наблюдать значительное разгорание флуоресценции DCF внутри клетки, кроме того, активный синтез АФК наблюдается в ядре клетки. Через 3 ч скорость синтеза снижается и количество АФК в клетке уменьшается, что отчетливо видно на



фотографии (рис. 60). Однако 24 и 48 ч спустя интенсивность флуоресценции DCF вновь становится высокой, синтез АФК происходит как в цитоплазме, так и в ядрах части клеток (рис. 60).

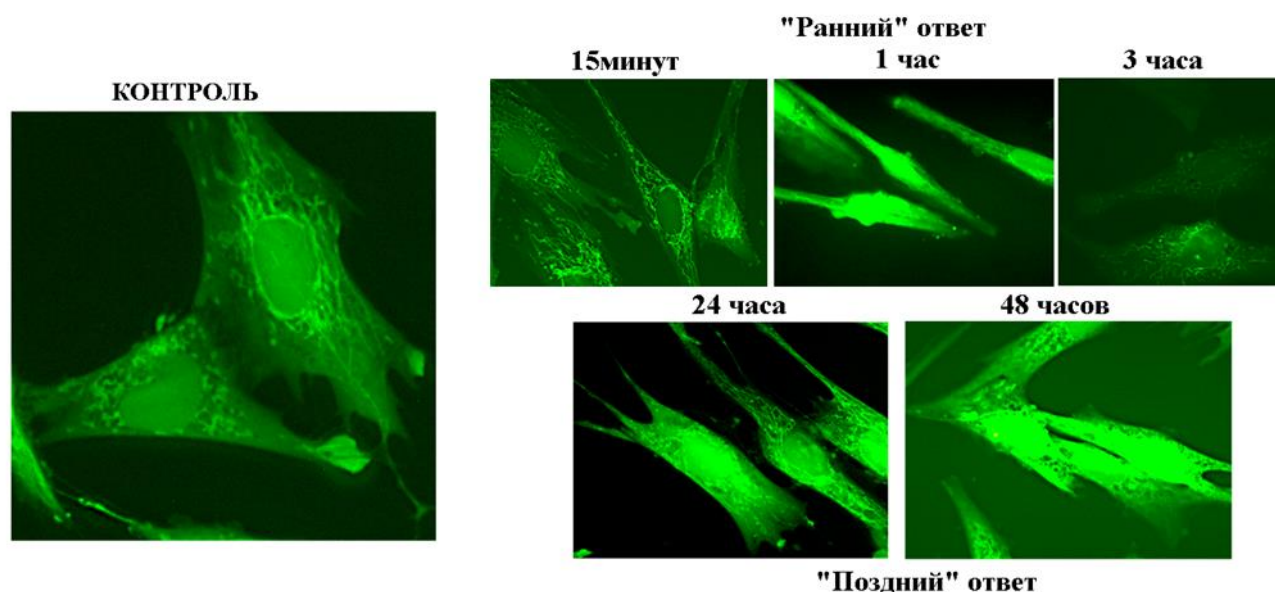


Рисунок 60. Флуоресцентная микроскопия: Локализация АФК внутри ФЛЭЧ, окрашенных DCF. Представлены данные для концентрации F-828 4 мкМ. Значения времени инкубации приведены под фотографиями клеток.

Аналогичную картину наблюдали при культивировании ФЛЭЧ в среде со сниженным содержанием сыворотки (2%), что имитирует культивирование клеток в условиях гипоксии, и при добавлении окисленной внеклеточной ДНК, которая является стимулятором развития окислительного стресса в клетках.

Таким образом, обнаружили «ранний» (от 15 мин до 3 ч) и «поздний» (24, 48 ч) ответы ФЛЭЧ на воздействие F-828. наблюдали снижение константы скорости синтеза DCF в клетках через 15-30 мин культивирования ФЛЭЧ в присутствии F-828, а затем повышение константы скорости синтеза DCF через 1 час с последующим уменьшением через 3 ч. «Ранний» ответ не связан с проникновением F-828 в цитоплазму, поскольку F-828 за 3 ч еще не фиксируется в клетках (рис. 61). «Поздний» ответ включает вторичный рост уровня АФК в ответ на длительное воздействие F-828 и его накопление в цитоплазме клеток (рис. 61).

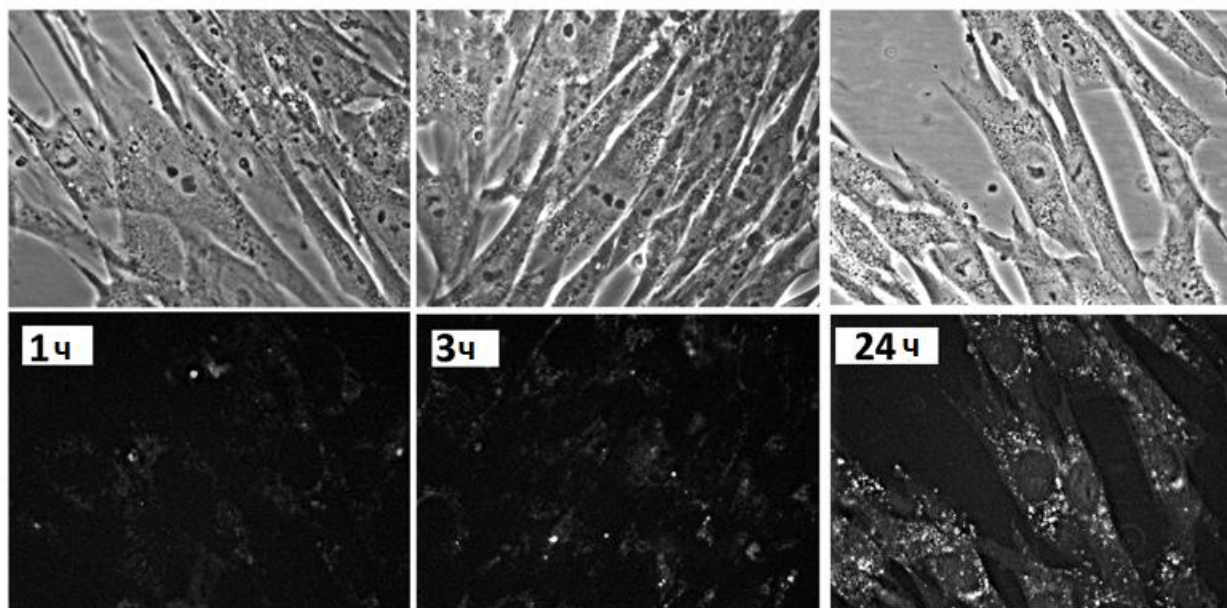


Рисунок 61. Флуоресценция F-828 в клетках ФЛЭЧ через 3 и 24 ч культивирования фуллерена F-828 в клетках, наблюдаемая при облучении обработанных фуллереном ФЛЭЧ светом с длиной волны 350 нм. Увеличение X40.

С помощью флуоресцентной микроскопии показано, что в течение 24 ч и 48 ч воздействия F-828 на ФЛЭЧ появляется популяция клеток (приблизительно 5% от общего пула), которые содержат большое количество F-828 в цитоплазме (рис. 62, розовый цвет). Фуллерены поглощают АФК в своем окружении, как показано на рисунке 62, где фуллерены отмечены розовым, АФК - зеленым и отчетливо видно отсутствие свободных радикалов в окрестности частиц фуллерена. В тех клеточных структурах, где эти фуллереновые зерна отсутствуют, синтез АФК высок.

Чтобы определить механизм развития ответа ФЛЭЧ на F-828, провели поиск источника АФК, который активируется при воздействии производного фуллерена на клетки. Напомним, что обычно источником АФК в клетках являются ферменты семейства NOX [134]. NOX4, наиболее представленный в фибробластах фермент, является постоянно активным белком, регуляция производимых им АФК происходит главным образом на уровне транскрипции [137]. Предположили, что добавление производных фуллеренов к клеткам ФЛЭЧ регулирует экспрессию NOX4.



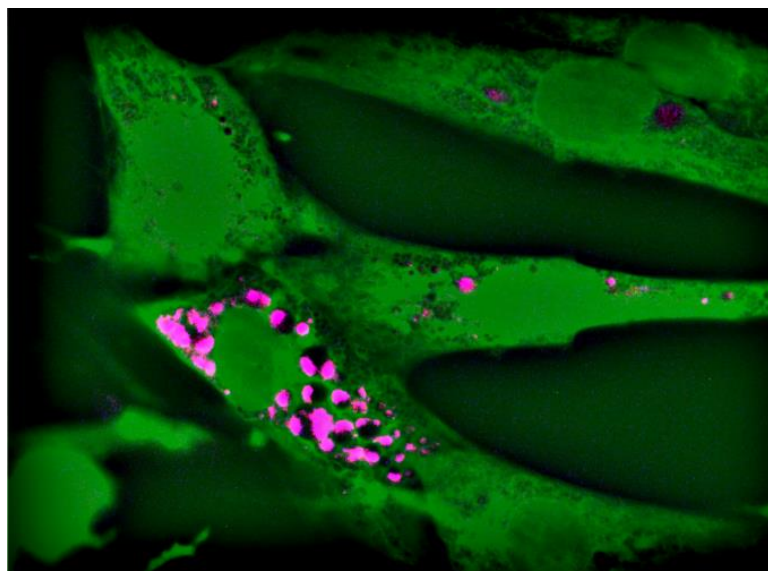


Рисунок 62. Локализация F-828 (розовый) и АФК (зеленый) внутри клеток. Флуоресцентная микроскопия. Приводятся данные для концентрации F-828 4 мкМ. Время экспозиции - 48 ч.

Для подтверждения нашего предположения исследовали уровень экспрессии мРНК фермента *NOX4* при добавлении исследуемого вещества в зависимости от времени. Через 15 мин после добавления F-828 к среде культивирования уровень мРНК *NOX4* в клетках начинает возрастать и достигает максимума через 1 час после начала инкубации. К 3 ч после добавления уровень мРНК *NOX4* снижается, а затем через 24 ч вновь повышается (рис. 63).

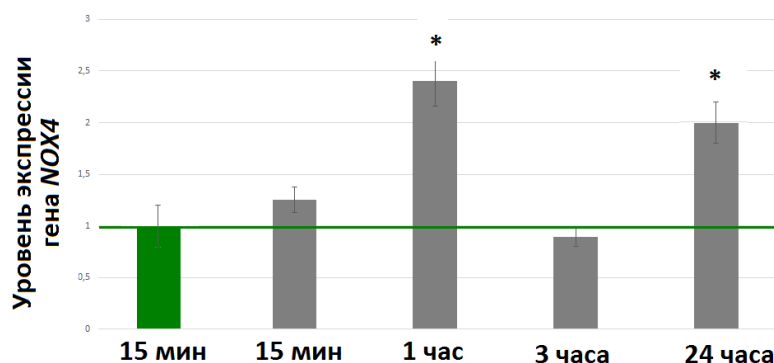


Рисунок 63. Уровень экспрессии гена *NOX4* в ФЛЭЧ при культивировании с фуллереном F-828 в концентрации 4 мМ, время инкубации указано на рисунке.

Эти данные подтверждены также с помощью метода флуоресцентной микроскопии с применением FITC-меченных антител к белку *NOX4* (рис. 64) и с помощью проточной цитометрии (рис. 65).

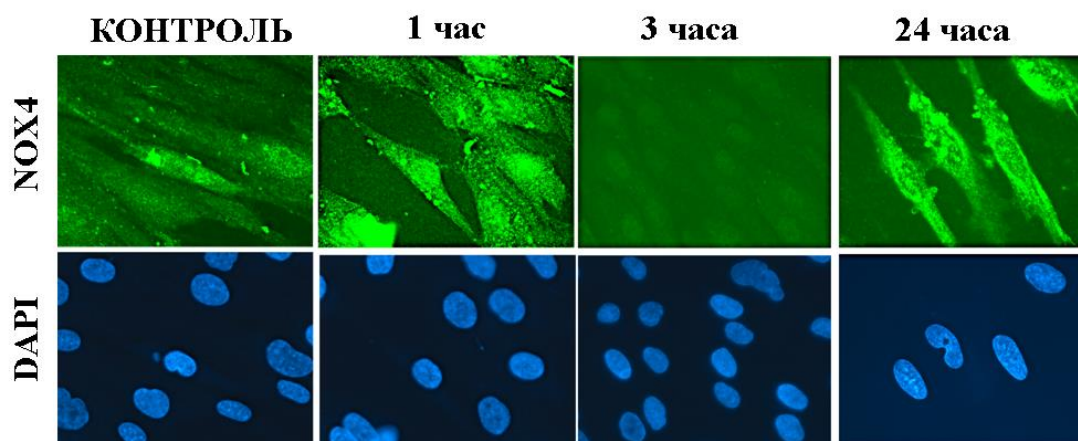


Рисунок 64. Флуоресцентная микроскопия: локализация NOX4 в фиксированных клетках, окрашенных DAPI и антителами к NOX4. Приведены данные для концентрации фуллеренов в 19 мкМ. На рисунке показаны значения времени инкубации.

Показано, что уже через 1 час после добавления производного фуллерена к среде культивирования уровень белка NOX4 возрастает как в цитоплазме, так и в ядре. Через 3 ч интенсивность флуоресценции снижается, что свидетельствует об уменьшении количества белка NOX4. Через 24 ч после начала эксперимента уровень NOX4 вновь возрастает при концентрациях исследуемого вещества 0.1, 4 и 19 мкМ, самая низкая концентрация не вызывала повторного повышения уровня фермента NOX4.

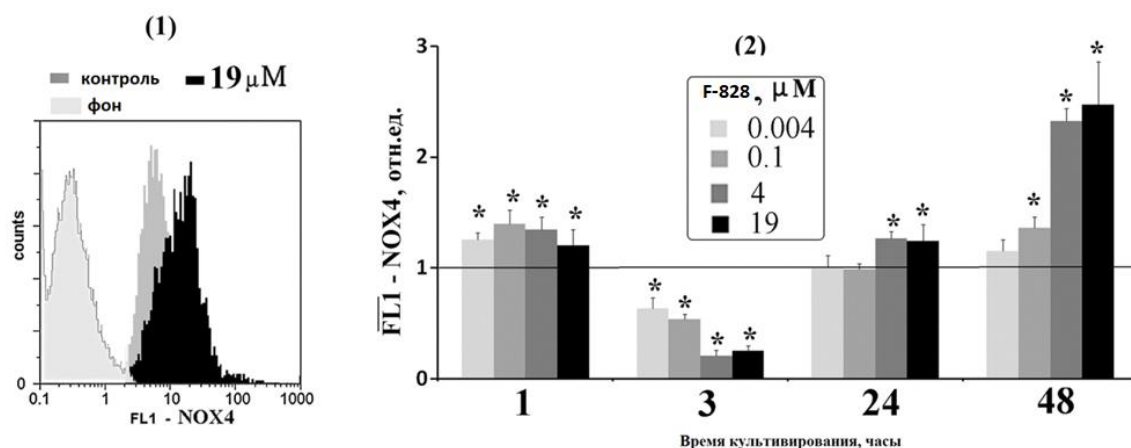


Рисунок 65. Проточная цитометрия: распределение клеток по FL1-NOX4 (1) и зависимость средней интенсивности сигнала FL1-NOX4 (2) от концентрации F-828 и времени воздействия на ФЛЭЧ.

Обнаружена сильная корреляция между средним содержанием белка NOX4 в клетках, обработанных F-828 в различных концентрациях и уровнем АФК (рис. 66).

Таким образом, можно предположить, что одной из причин сдвига уровня АФК под действием F-828 является изменение уровня экспрессии белка NOX4.

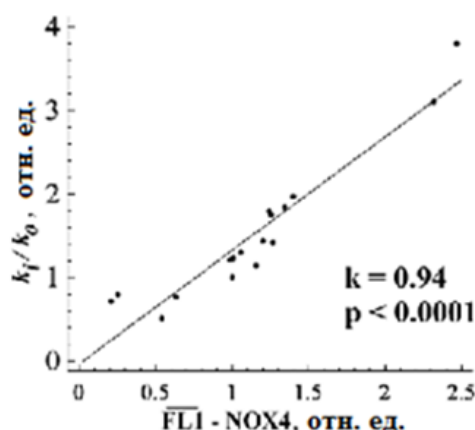


Рисунок 66. Зависимость уровня АФК (относительных констант скорости синтеза DCF в клетках – индекса  $k_i / k_0$ ) от содержания белка NOX4.

Чтобы доказать то, что уровень АФК возрастает благодаря повышенной экспрессии фермента NOX4, использован ингибитор NOX4 - плюмбагин. Плюмбагин относится к классу нафтохинонов, он способен подавлять ферментативную активность NOX4 в разных типах клеток [138]. С уменьшением активности NOX4, вызванной 1 мкМ плюмагина, наблюдалось снижение уровня синтеза АФК в клетках. Показали, что в присутствии плюмбагина фуллерен не вызывал повышение уровня АФК (рис. 67).

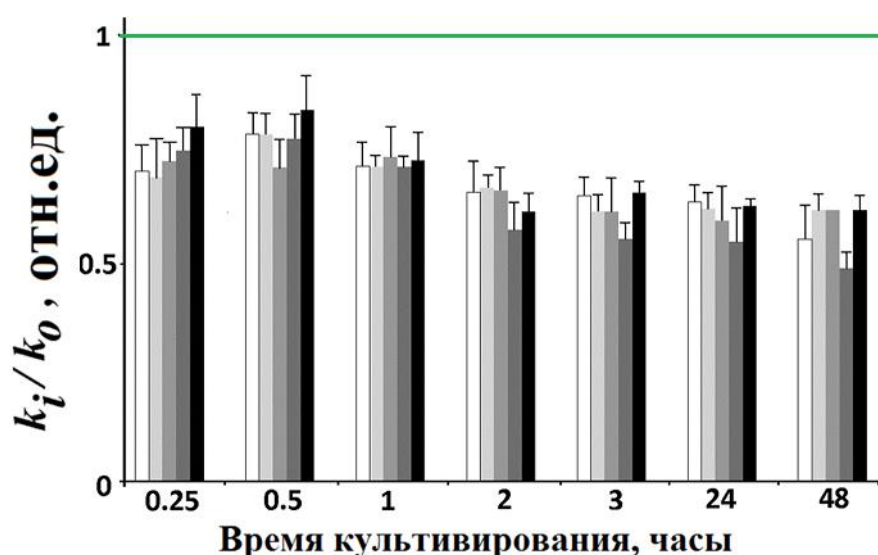


Рисунок 67. Уровень АФК после действия производного F-828 в присутствии 1 мкМ плюмагина. Зависимость индекса  $k_i / k_0$  от концентрации F-828 и времени экспозиции.

С учетом полученных данных предложен следующий механизм действия соединения F-828 на клетки ФЛЭЧ (рис. 68). Через 15 мин после добавления исследуемого производного F-828 к среде культивирования ФЛЭЧ резко снижается уровень АФК на поверхности клеток за счет антиоксидантного действия каркаса фуллерена. Чрезмерно пониженный уровень АФК приводит к активации транскрипции гена *NOX4* и уже через 1 ч после добавления происходит усиление синтеза АФК ферментом *NOX4*. Через 3 ч уровень *NOX4* и АФК значительно снижается. Через 24 ч исследуемое соединение проникает в цитоплазму ФЛЭЧ и начинает накапливаться там, связываясь с внутриклеточными АФК и нейтрализуя их. В цитоплазме начинает наблюдаться недостаток АФК. В ответ на это экспрессия гена *NOX4* повторно увеличивается и начинается активный синтез новых АФК, приводя ко вторичному окислительному стрессу. Механизм повышения уровня АФК белком *NOX4* доказан с помощью ингибитора - плюмбагина.

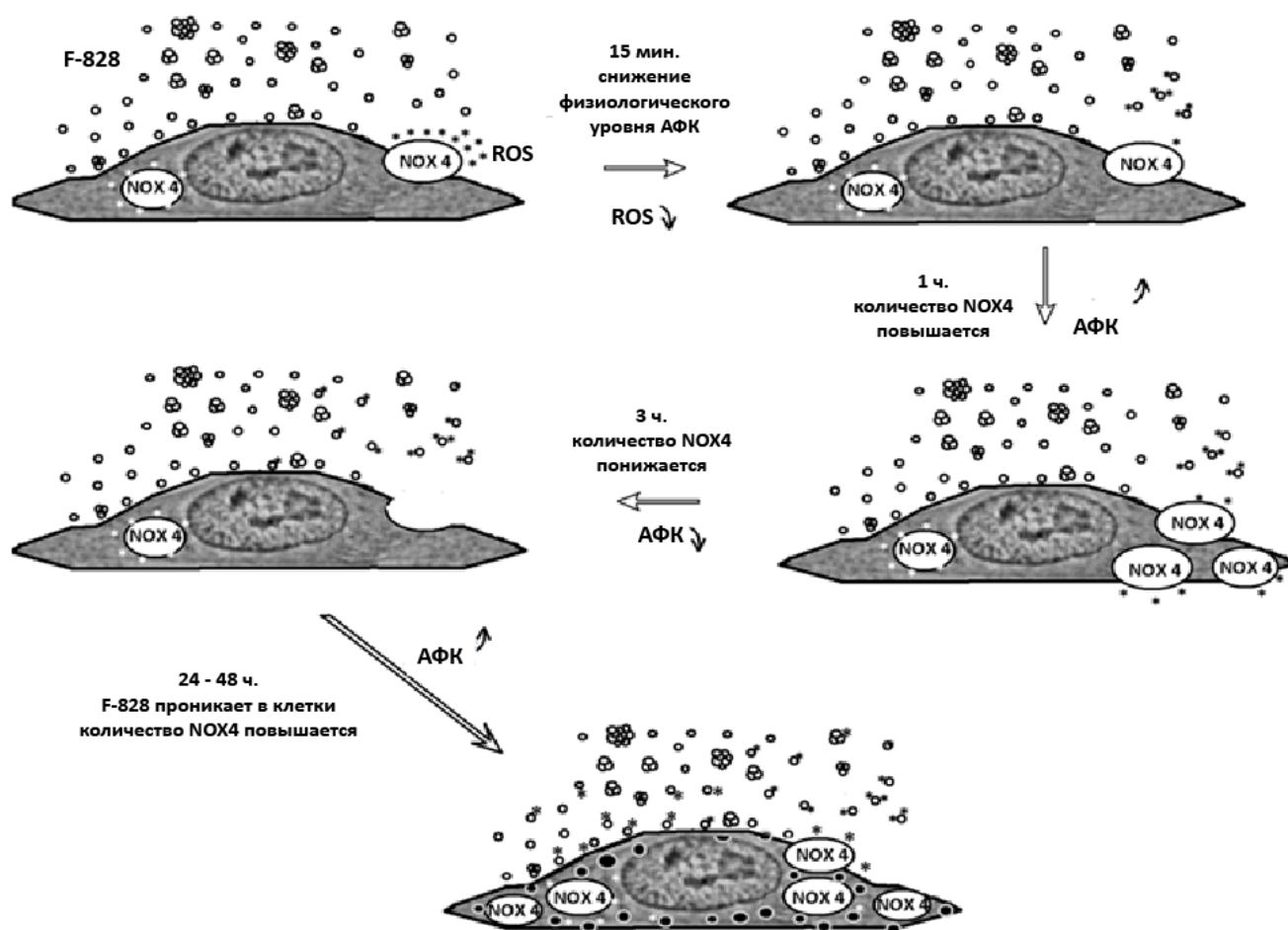


Рисунок 68. Механизм регуляции уровня АФК в клетках ФЛЭЧ при действии фуллерена F-828.

### 3.4. Влияние фуллеренов на экспрессию (на уровне РНК и белка) генов, отвечающих за развитие антиокислительного ответа в культивируемых фибробластах легкого эмбриона человека

NRF2 (erythroid-derived factor 2) – один из главных транскрипционных факторов, который обуславливает антиокислительный ответ клеток на действие внутренних и внешних АФК. Фактор NRF2 контролирует конститутивную индуцибельную экспрессию ряда генов, которые в промоторе содержат ARE (antioxidant response elements). Регуляция происходит, как на уровне увеличения количества фактора, так и на уровне его локализации в клеточных структурах. Чтобы фактор регулировал экспрессию генов антиокислительного ответа, он должен быть локализован в ядре клеток. Известно, что NRF2 регулирует продукцию АФК митохондриями и NADPH-оксидазами. Увеличение экспрессии белка NOX4 и уровня АФК позволяет предположить, что активность фактора NRF2 в присутствии фуллеренов также может быть изменена. Для определения количества фактора NRF2 в клетках применили метод проточной цитометрии. Использовали коммерческие антитела к белку NRF2 и вторичные антитела, конъюгированные с FITC. Пример анализа количества белка NRF2 в фиксированных ФЛЭЧ приводится на рисунке 3.41.

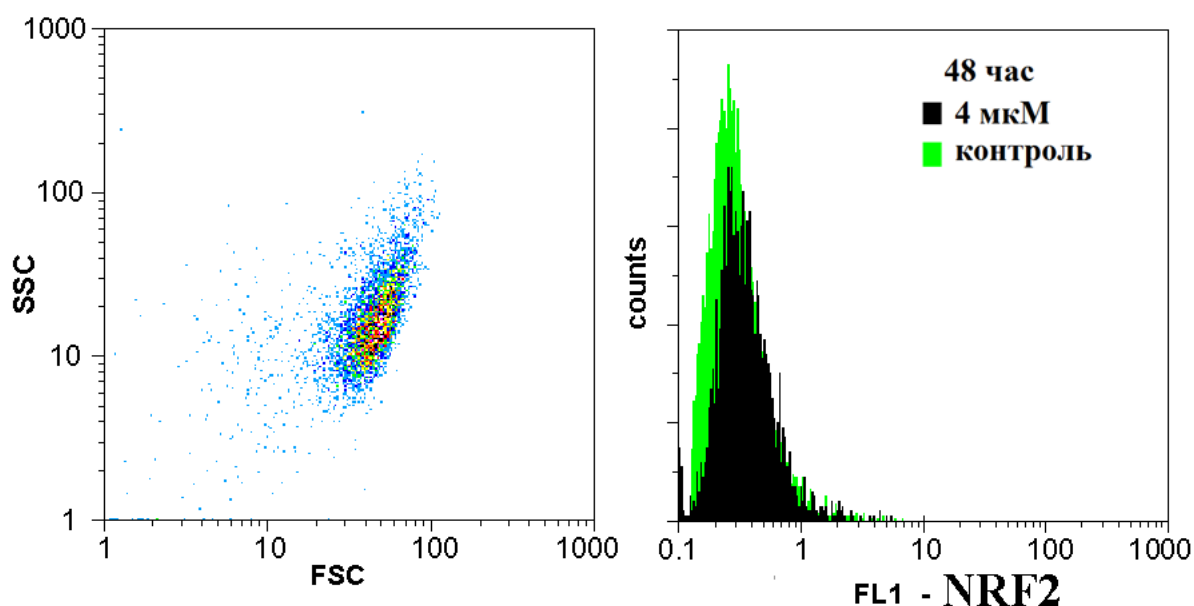


Рисунок 69. Определение количества белка NRF2 в клетках ФЛЭЧ с использованием проточной цитометрии. На графике слева приведены параметры, отражающие гомогенность культуры. Гистограммы отражают распределение клеток по содержанию белка в клетках.

Для характеристики содержания белка NRF2 в клетках использовали средние значения показателя FL1- NRF2 на одну клетку. На рисунке 70 приведены результаты экспериментов.

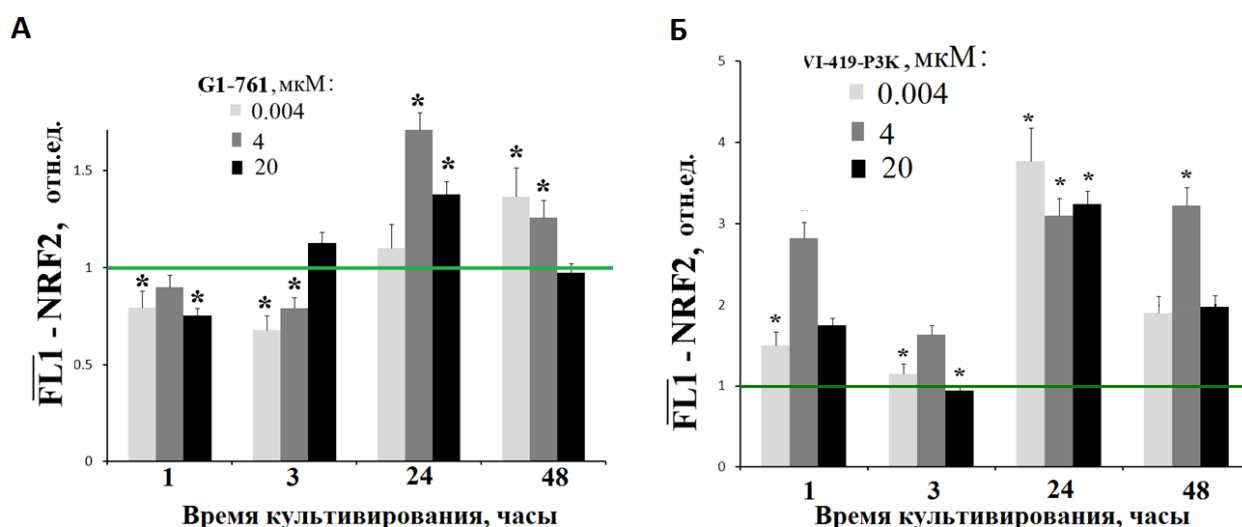


Рисунок 70. Изменение количества белка NRF2 в клетках ФЛЭЧ при действии фуллеренов: G1-761 (А) и VI-419-РЗК (Б) – в концентрациях 0.004, 4 и 20 мкМ в течение 1, 3, 24 и 48 ч. По оси Y приводится среднее значение интенсивности флуоресценции одной клетки культуры, обработанной антителами к белку NRF2. Учтены фоновые значения флуоресценции, обусловленные неспецифичной сорбцией флуорохромированных антител на клетках. Контроль – среднее значение сигнала для всех опытов. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля, зеленая линия ( $p < 0.05$ ).

В течение 1-3 ч при действии фуллерена G1-761 (4 нМ, 4, 20 мкМ) наблюдается снижение или отсутствие возрастания уровня экспрессии белка NRF2 в клетках, и только через 24-48 ч наблюдается незначительное (в 1,2 – 1,7 раз) повышение уровня экспрессии NRF2. Фуллерен VI-419-РЗК в отличие от фуллерена G1-761 вызывает активацию фактора NRF2.

Через 1 ч после действия фуллерена VI-419-РЗК в концентрации 4 нМ, 4, 20 мкМ наблюдается возрастание уровня экспрессии белка NRF2 в 1,5; 2,8 и 1,8 раз, соответственно (рис. 70). Через 3 ч культивирования в присутствии 4 нМ фуллерена количество фактора NRF2 снижается, при культивировании 24 и 48 ч в присутствии всех концентраций фуллерена VI-419-РЗК уровня экспрессии белка NRF2 в клетках ФЛЭЧ возрастает в 2 – 3,8 раз (рис. 70).

На рисунке 71 приводятся данные об изменении количества РНК фактора NRF2 при действии фуллеренов. При действии фуллерена G1-761 во всех исследованных



концентрациях в течение 1- 48 ч не наблюдается повышения уровня экспрессии гена *NRF2* (рис. 71). Эти данные не объясняют результатов, полученных методом проточной цитометрии, о повышении уровня белка *NRF2* через 24-48 ч (рис. 71), эти данные свидетельствуют о том, что в присутствии фуллерена регуляция экспрессии транскрипционного фактора *NRF2* может происходить и на уровне транскрипции и на посттранскрипционном уровне. Вероятнее всего, фуллерен может способствовать высвобождению *NRF2* из комплекса с его ингибитором KEAP1 [139], в результате чего свободный *NRF2* лучше узнается антителами. Активированный свободный *NRF2* транслоцируется в ядро клеток и активирует гены – мишени антиокислительных ферментов [71].

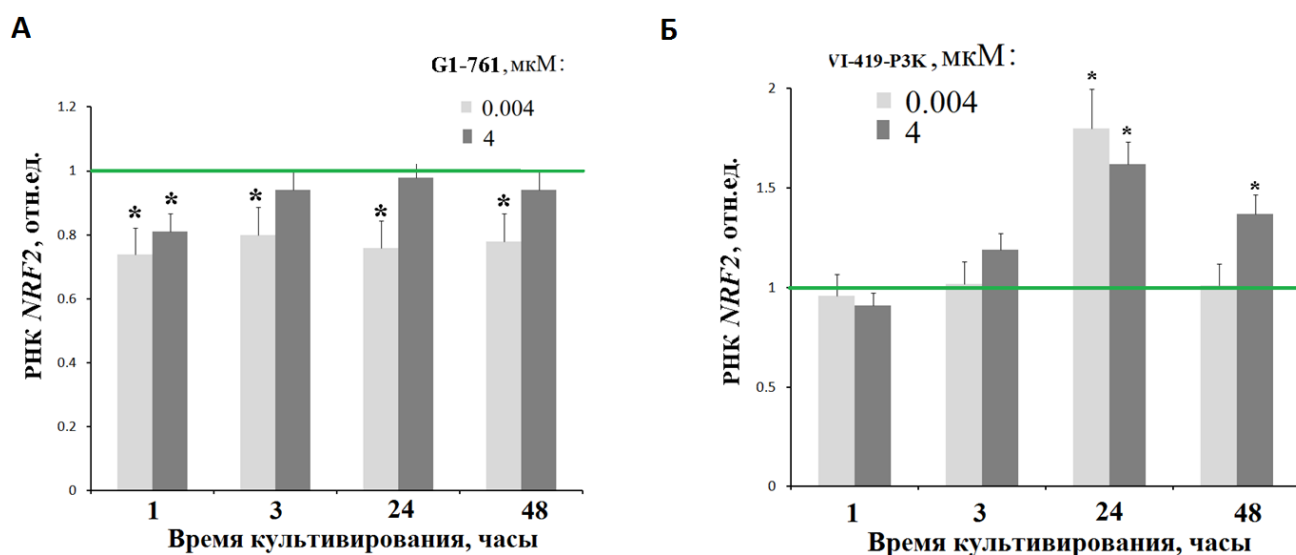


Рисунок 71. Изменение уровня экспрессии РНК гена *NRF2* при действии фуллеренов: G1-761 (А) и VI-419-РЗК (Б) в концентрации 4 нМ и 4 мкМ в течение 1, 3, 24 и 48 ч. Контроль – среднее значение сигнала для всех опытов, зеленая линия. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

В отличие от фуллерена G1-761 фуллерен VI-419-РЗК вызывает активацию экспрессии гена *NRF2* через 24 и 48 ч, что коррелирует с повышением уровня белка фактора *NRF2*. Подъем уровня белка *NRF2* через 1 ч после добавления фуллерена VI-419-РЗК также, вероятнее всего, связан с высвобождением *NRF2* из комплекса с его ингибитором KEAP1.

Поскольку определяющим в активности фактора *NRF2* является место его локализации в клеточном ядре, клетки, обработанные фуллеренами, исследованы методом флуоресцентной микроскопии. При всех используемых концентрациях

фуллерена через 3 ч культивирования клеток в присутствии фуллерена G1-761 не обнаружено транслокации фактора NRF2 в ядра клеток. Напротив, при концентрации 4 мкМ наблюдается обратный процесс – фактор мигрирует из ядер тех клеток, где он присутствовал в ядре, в цитоплазму. Через 24 ч культивирования клеток в присутствии фуллерена G1-761 возрастает уровень экспрессии фактора NRF2 в цитоплазме клеток, однако, также не наблюдается его транслокации в ядро. Таким образом, фуллерен G1-761 вызывает блокирование активности фактора NRF2, несмотря на увеличение в некоторых случаях уровня экспрессии этого фактора.

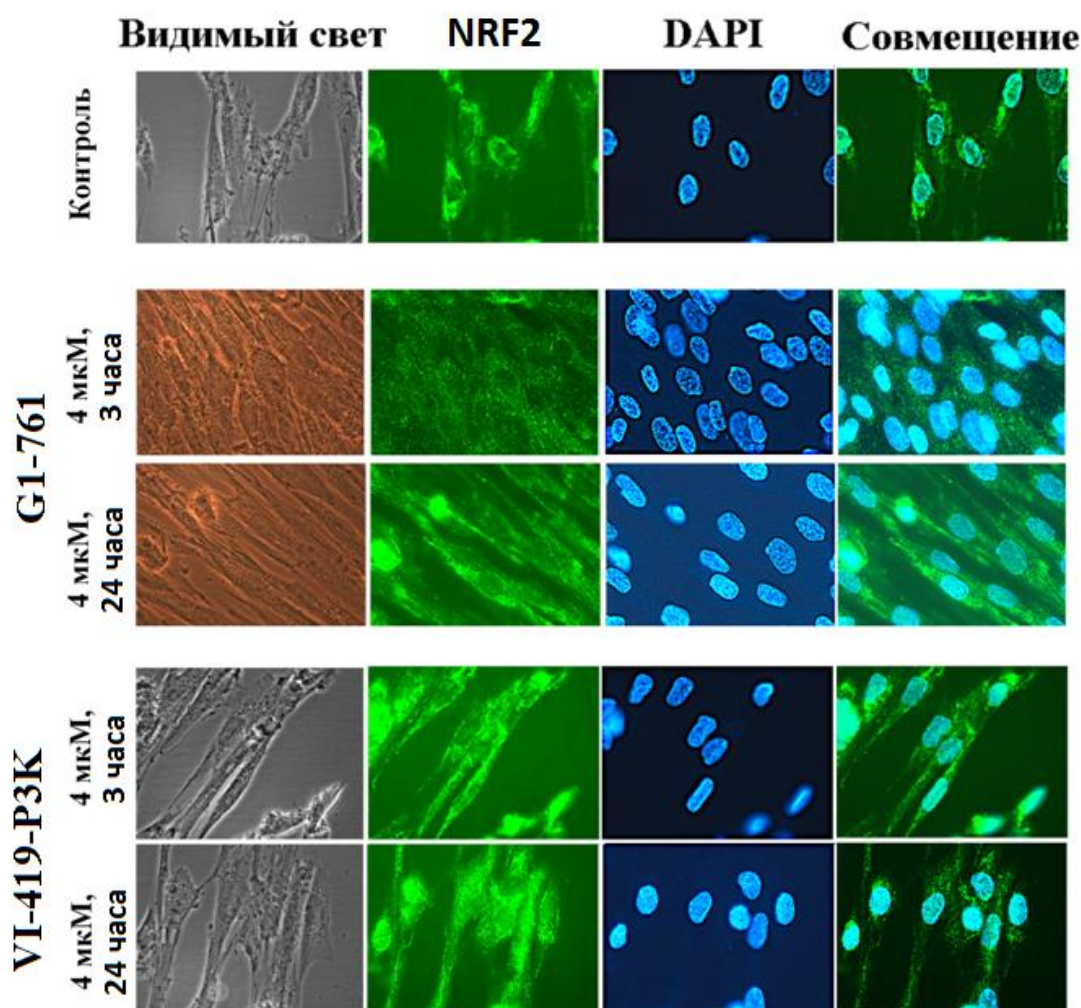


Рисунок 72. Фотографии клеток ФЛЭЧ, обработанных фуллеренами: G1-761 и VI-419-РЗК в концентрации 4 мкМ в течение 3 и 24 ч. Для визуализации ядер клеток, клетки подкрашивали раствором ДНК-связывающегося красителя DAPI.

При всех исследуемых концентрациях фуллерена VI-419-РЗК через 3 ч культивирования клеток в присутствии фуллерена возрастает уровень экспрессии фактора NRF2 в цитоплазме клеток, но не обнаружено транслокации фактора NRF2 в ядра



клеток (рис. 72, для концентрации 4 мкМ). Через 24 ч уровень экспрессии NRF2 возрастает как в цитоплазме, так и в ядре клеток. Таким образом, фуллерен VI-419-РЗК вызывает активацию фактора NRF2 как на уровне гена, так и на уровне белка, активирует процесс перемещения транскрипционного фактора NRF2 в ядра клеток. Вероятнее всего, активацией NRF2 – опосредованного антиоксидантного ответа и обусловлено пролонгированное антиоксидантное действие VI-419-РЗК.

### **3.4.1. Влияние фуллеренов на экспрессию фермента супероксиддисмутаза-1 (SOD1)**

В антиокислительном ответе клеток принимает участие фермент SOD1, который катализирует трансформацию супероксиданиона в менее активную перекись водорода. Экспрессия этого белка регулируется в основном на транскрипционном уровне, поэтому были определены количества РНК белка в клетках, обработанных в присутствии 4 нМ и 4 мкМ фуллеренов G1-761 (рис. 73, А) и VI-419-РЗК (рис. 73, Б) в течение 1, 3, 24 и 48 ч. Данные приводятся на рисунке 73.

Через 1 час после действия исследуемых фуллеренов в клетках уровень РНК фермента SOD1 не изменяется или несколько снижается, но уже через 3 ч происходит увеличение экспрессии гена *SOD1* в 2 – 2,5 раза, а через 24 ч значительно увеличивается экспрессия гена *SOD1* – при действии фуллерена G1-761 в 2,5 – 3,5 раза (рис. 73, А), при действии фуллерена VI-419-РЗК – в 5,5 – 6 раз (рис. 73, Б). Уровень экспрессии гена SOD1 снижается через 48 ч культивирования в присутствии фуллеренов.

Таким образом, фермент SOD1 принимает участие в антиокислительном ответе клеток ФЛЭЧ на действие фуллерена G1-761, и еще в большей степени - фуллерена VI-419-РЗК.

На рисунках 74 и 75 суммированы все данные по уровню АФК и изученным белкам, принимающим участие в антиокислительном ответе ФЛЭЧ на действие фуллерена G1-761 и VI-419-РЗК, соответственно. Приведены две концентрации фуллерена G1-761 – 4 нМ и 4 мкМ и 3 времени воздействия: ранний ответ (1 и 3 ч) и поздний ответ (24 ч). Через 1 час после добавления в среду 4 нМ или 4 мкМ G1-761 наблюдается падение физиологического уровня АФК. При этом блокирована активность фермента NOX4, отвечающего за синтез АФК, блокирована активность антиокислительного транскрипционного фактора NRF2 и блокирована активность гена и белка SOD1, отвечающего за трансформацию супероксиданиона в перекись водорода.

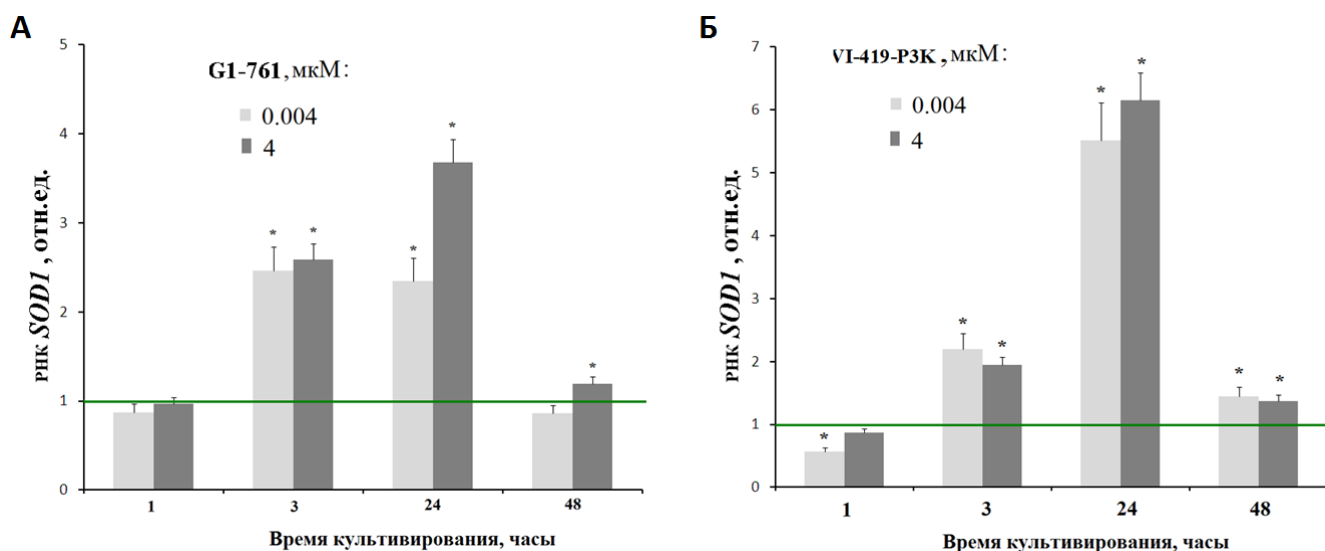


Рисунок 73. Изменение уровня экспрессии РНК гена SOD1 при действии фуллеренов G1-761 (А) и VI-419-P3K (Б) в концентрации 4 нМ и 4 мкМ в течение 1, 3, 24 и 48 ч. Контроль – среднее значение сигнала для всех опытов, зеленая линия. (\*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

Через 3 ч уровень АФК в клетках в присутствии 4нМ фуллерена G1-761 дополнительно снижается, при этом активность гена *NOX4* возрастает до контрольных значений. Вместе с тем происходит значительное увеличение активности гена SOD1. Уровень АФК в клетках, которые инкубировали в присутствии 4 мкМ фуллерена, значительно возрастает, при этом увеличивается количество фермента NOX4 и повышена активность гена SOD1.

Через 24 ч культивирования в присутствии 4 нМ фуллерена G1-761 уровень АФК в клетках повышается на фоне увеличения количества белка NOX4. Дополнительно возрастает активность гена SOD1. В случае культивирования ФЛЭЧ в присутствии 4 мкМ фуллерена G1-761 уровень АФК по-прежнему увеличен, не смотря на снижение уровня экспрессии белка NOX4 и повышенную активность гена SOD1.

На рисунке 75 приведены две концентрации фуллерена VI-419-P3K – 4 нМ и 4 мкМ и 3 времени воздействия: ранний ответ (1 и 3 ч) и поздний ответ (24 ч). Через 1 час после добавления в среду 4 нМ VI-419-P3K наблюдается падение физиологического уровня АФК. При этом блокирована активность фермента NOX4, отвечающего за синтез АФК, увеличена активность антиокислительного транскрипционного фактора NRF2, но блокирована активность гена белка SOD1, отвечающего за трансформацию супероксиданиона в перекись водорода. Если концентрация фуллерена повышена в 1000 раз, то наблюдается повышение выше контрольного уровня АФК на фоне возрастания

активности белка NOX4, и повышение уровня экспрессии антиокислительного транскрипционного фактора NRF2.

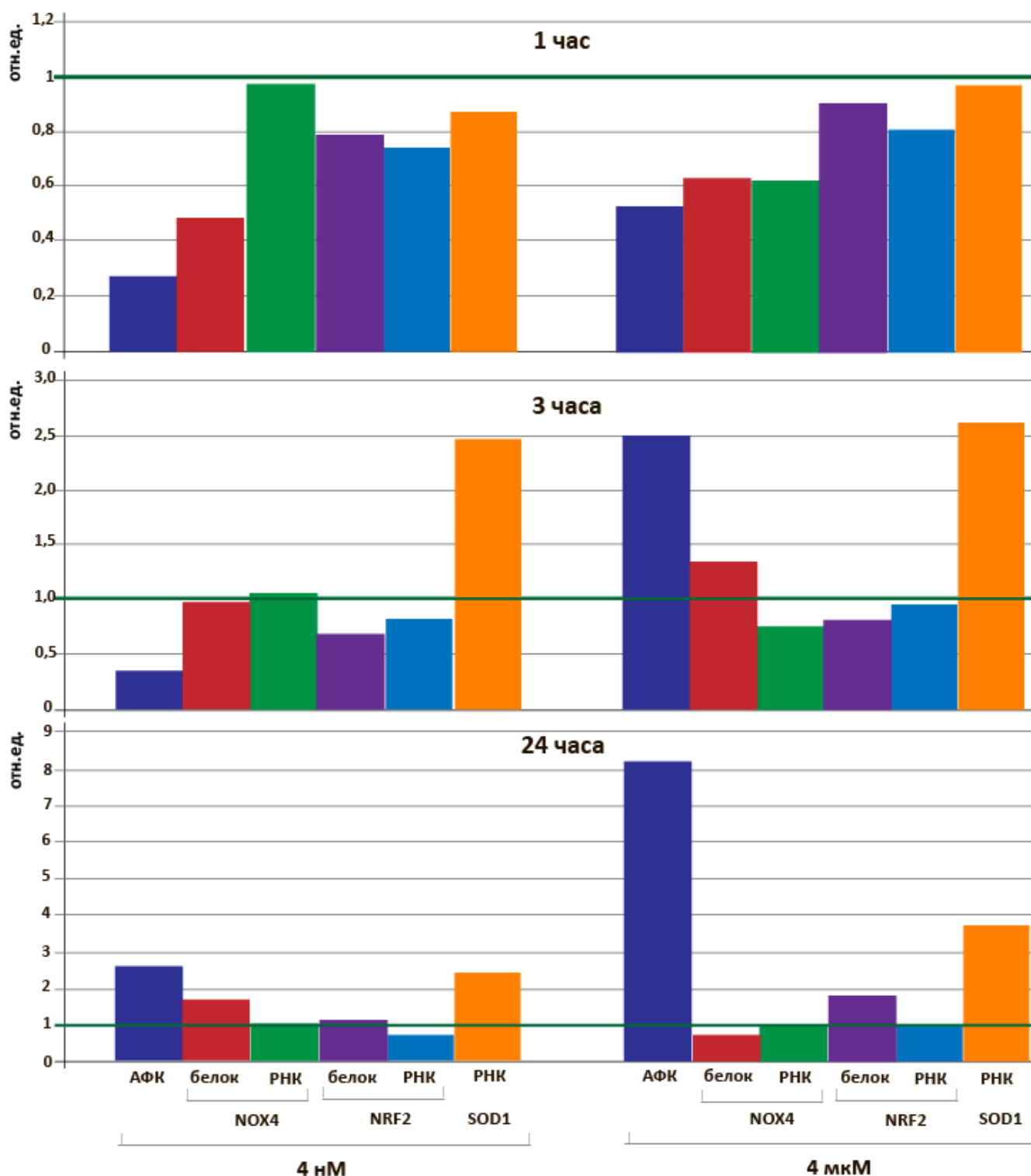


Рисунок 74. Суммирование данных, описывающих действие фуллерена G1-761 на уровень АФК в клетках ФЛЭЧ. Темно-синим обозначен уровень АФК, красным – уровень белка NOX4, зеленым – уровень мРНК NOX4, фиолетовым – уровень белка NRF2, голубым – уровень мРНК NRF2, рыжим – уровень мРНК SOD1.

Через 3 ч уровень АФК в клетках в присутствии 4нМ дополнительно снижается, при этом активность гена *NOX4* по-прежнему снижена. Вместе с тем происходит увеличение активности гена *SOD1*, экспрессия транскрипционного фактора *NRF2* также повышается. Уровень АФК в клетках, которые инкубировали в присутствии 4 мкМ фуллерена, по-прежнему высокий, при этом снижается количество фермента *NOX4* и повышена активность транскрипционного фактора *NRF2* и гена *SOD1*.

Через 24 ч культивирования в присутствии 4 нМ фуллерена уровень АФК несколько повышается на фоне увеличения количества белка *NOX4*, но находится в пределах контрольных значений. Дополнительно возрастает активность транскрипционного фактора *NRF2* и гена *SOD1*. В случае культивирования ФЛЭЧ в присутствии 4 мкМ фуллерена VI-419-РЗК уровень АФК значительно снижен, не смотря на повышенный уровень экспрессии белка *NOX4*. Повышена активность транскрипционного фактора *NRF2* и гена *SOD1*.

Таким образом, в регуляции уровня АФК в клетках при действии фуллеренов участвует транскрипционный фактор *NRF2*, активация которого приводит к снижению уровня АФК в клетках и пролонгированию антиоксидантного действия фуллерена. Производное фуллерена VI-419-РЗК вызывает активацию *NRF2* и на уровне гена, и на уровне белка, а также его транслокацию в ядро клеток, в результате чего фуллерен VI-419-РЗК может выступать в качестве антиоксиданта длительного действия. Производное фуллерена G1-761 не активирует повышения экспрессии гена и белка *NRF2*, не наблюдается его перемещения в клеточное ядро. Это приводит к вторичному ответу клеток на добавление фуллерена G1-761, характеризующегося повышением экспрессии *NOX4*, приводящего к синтезу АФК, несмотря на активацию экспрессии гена *SOD1*. Поэтому фуллерен G1-761 может выступать только в качестве антиоксиданта короткого действия. Пролонгировать антиоксидантное действие фуллерена можно или ингибированием *NOX4*, или активацией *NRF2*.

Исследовали, активируется ли экспрессия *NRF2* для всей группы изучаемых фуллеренов, развивающих вторичный ответ, связанный с синтезом АФК в клетках. Показали, что при действии соединений ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 1 и 4 мкг/мл и соединения vi-434K2 в концентрации до 300 мкг/мл не обнаруживаются изменений в уровне экспрессии *NRF2* ни на уровне гена, ни на уровне белка. Транскрипционный

фактор NRF2 не транслоцировался в ядро клеток при действии соединений OKR-111, OKR-112 и vi-434K2.

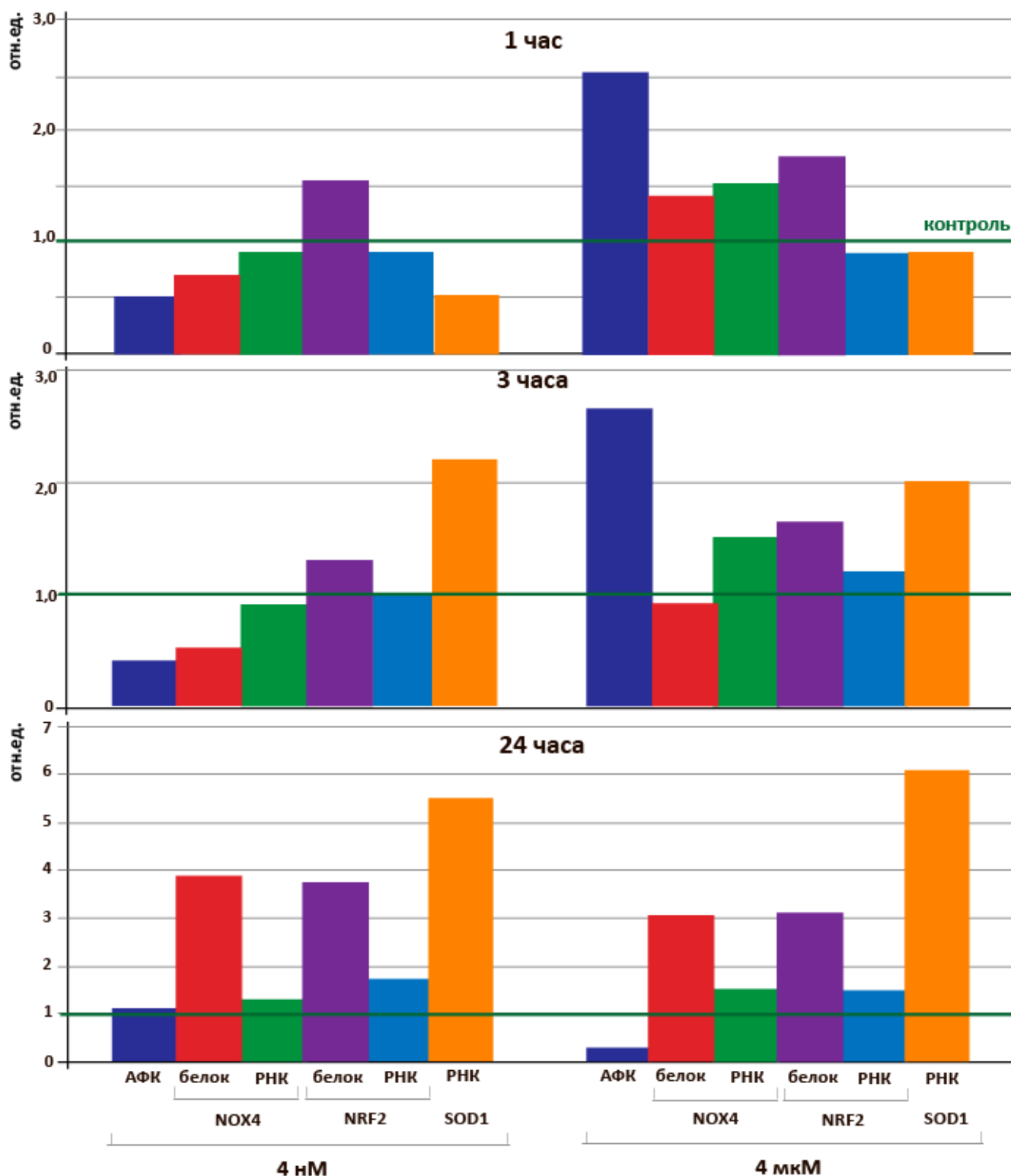


Рисунок 75. Суммирование данных, описывающих действие фуллера VI-419-P3K на уровень АФК в клетках ФЛЭЧ. Темно-синим обозначен уровень АФК, красным – уровень белка NOX4, зеленым – уровень мРНК NOX4, фиолетовым – уровень белка NRF2, голубым – уровень мРНК NRF2, рыжим – уровень мРНК SOD1.

Провели эксперимент на клетках ФЛЭЧ с добавлением в среду культивирования клеток фуллерена F-828, наиболее исследованного фуллерена из группы фуллеренов, в присутствии которого в клетках развивается вторичный окислительный стресс. Клетки перевели на бессывороточную среду культивирования. В ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде, NRF2 экспрессируется на том же уровне, что и в клетках, культивируемых в присутствии 2% сыворотки. Однако, в ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде, фактор не активен и локализован исключительно в цитоплазме клеток. В присутствии сыворотки NRF2 локализован в ядре, что указывает на его активность [140].

Уровень экспрессии фактора NRF2 определяли методом проточной цитофлуориметрии с применением антител к NRF2 (рис. 76). При культивировании ФЛЭЧ в бессывороточной среде с добавлением фуллерена наблюдали значительное снижение уровня белка NRF2 в клетках. Максимальное уменьшение количества белка NRF2 наблюдали при концентрации фуллерена 0.5  $\mu$ M (рис. 76 (3)). При этой концентрации только 5 % клеток сохранили относительно высокий уровень экспрессии NRF2 (рис. 76 А (1), область R). Анализ методом флуоресцентной микроскопии показал, что NRF2 по-прежнему локализован исключительно в цитоплазме клеток, т.е. не активен. Значительное снижение количества белка NRF2 в ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде, в присутствии фуллерена может являться следствием значительного снижения количества белка NOX4. Ранее показано, что уменьшение количества NOX4 в клетках сопровождается и снижением количества транскрипционного фактора NRF2 [141].

Мы проанализировали также количество РНК *NRF2* в ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде (рис. 76 В). Добавление в среду фуллерена приводило к увеличению количества РНК *NRF2* в 1,2 - 1,8 раза при всех исследуемых концентрациях F-828 за исключением 0.5  $\mu$ M. Вероятно, регуляция экспрессии гена *NRF2*, также, как и гена *NOX4*, в клетках в бессывороточной среде, обработанных фуллереном, осуществляется на посттранскрипционном уровне. Известно, что NRF2 негативно регулируется KEAP1 (Kelch-like ECH associated protein 1). Количество РНК белка KEAP1 возрастало на 20% только при низких концентрациях F-828.

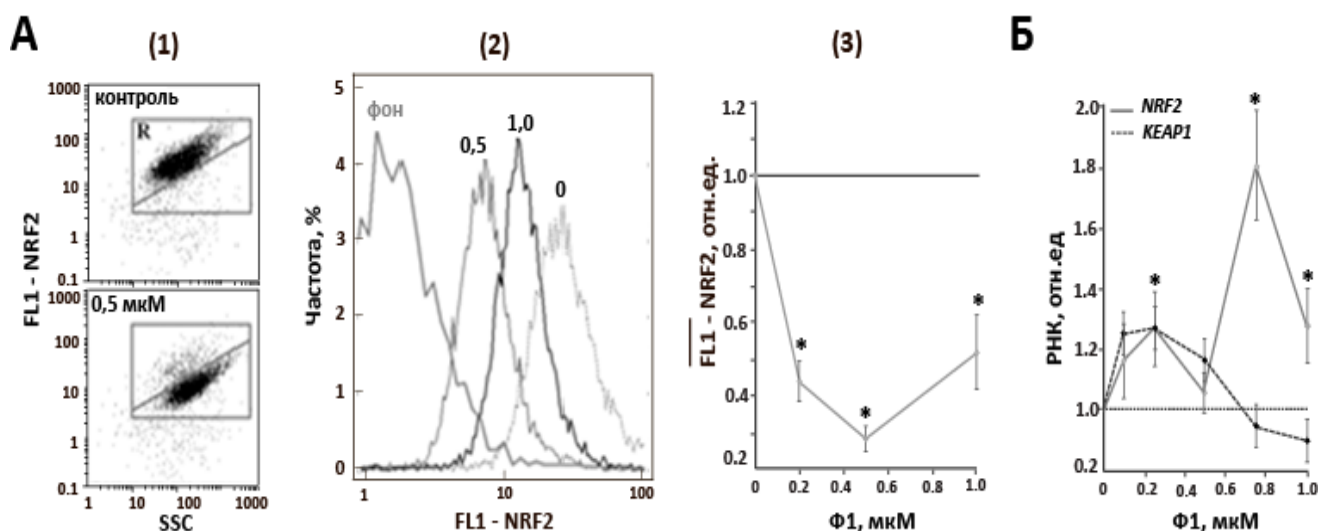


Рисунок 76. F-828 снижает количество фактора NRF2 в ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде. А - (проточная цитофлуориметрия): (1) - FL1-NRF2 против SSC. Область R обогащена фракцией ФЛЭЧ с повышенными значениями FL1-NRF2. (2) – Распределение клеток, обработанных F-828 по уровню сигнала FL1- NRF2. (3) Зависимость медиан значений сигнала FL1- NRF2 от концентрации фуллерена. Концентрации F-828 указаны на графиках. Б - (ПЦР в реальном времени): Изменение уровня мРНК, кодирующей *NRF2* и *KEAP1* в ФЛЭЧ. Концентрации фуллерена показаны на рисунке. Значения представлены как среднее от 3-х экспериментов. \* - отличия достоверны,  $p < 0,005$ , по критерию Манна-Уитни.

Таким образом, транскрипционный фактор NRF2 не активен в ФЛЭЧ, культивируемых в присутствии фуллерена F-828 в бессывороточной среде, что характерно для всей группы фуллеренов, в присутствии которых развивается вторичный окислительный стресс.

### 3.5. Влияние производных фуллеренов на образование разрывов ДНК клеток ФЛЭЧ и процессы репарации разрывов ДНК

Синтез активных формы кислорода может вызывать повреждение ДНК ядер клеток, образование одно- и двуцепочечных разрывов ДНК. Исследование количества одно- и двуцепочечных разрывов ДНК в ФЛЭЧ проводили с использованием метода комет по стандартному протоколу. Метод комет (single cell gel electrophoresis) основан на регистрации различной электрофоретической подвижности ДНК и фрагментов ДНК лизированных клеток в агарозном геле. ДНК, содержащие разрывы, утрачивают свою сверхспирализацию и могут свободно перемещаться к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы (пример комет при нарастании

степени поврежденности ДНК, показан на рис. 77, А). Определяли показатель - момент хвоста ДНК-кометы, являющийся произведением процента ДНК в хвосте кометы и длины хвоста кометы.

### 3.5.1. Влияние производного фуллерена GI-761 на образование разрывов ДНК клеток ФЛЭЧ

Поскольку большинство исследованных соединений вызывает развитие вторичного ответа в ФЛЭЧ, исследовали уровень образования разрывов ДНК в клетках на примере соединения GI-761.

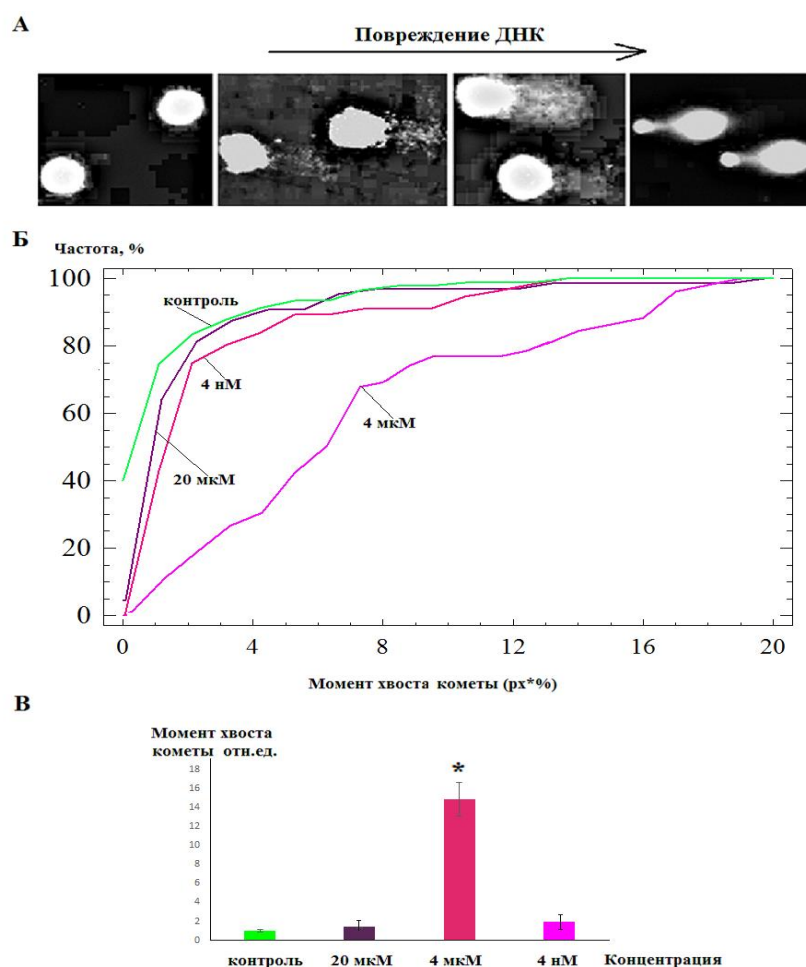


Рисунок 77. Анализ разрывов ДНК в клетках (ФЛЭЧ), инкубированных с фуллереном GI-761 1 час в концентрации 20 мкМ - 4 нМ методом комет в щелочных условиях. А - Фотография основных типов комет при нарастании степени поврежденности ДНК. Б - Кумулятивные гистограммы для параметра комет - момента хвоста кометы через 1 ч после добавления фуллерена GI-761 в концентрации 20 мкМ - 4 нМ (концентрации обозначены на рисунке) к среде культивирования клеток. В - Гистограммы относительной частоты распределения момента хвоста кометы комет в клетках.



Достоверность различий с контролем в полученных распределениях проанализирована с помощью статистики Колмогорова-Смирнова ( $\alpha < 0,0001$ ). \* - отличия достоверны,  $p < 0,005$ , по критерию Манна-Уитни.

Через час после добавления фуллерена GI-761 в концентрации 4 мкМ к среде культивирования ФЛЭЧ возрастает в 14 раз количество разрывов в клетках, определяемых методом комет, по сравнению с контролем (рис. 77, Б, В). Добавление фуллерена в концентрации 20 мкМ и 4 нМ к клеткам статистически значимо не влияет на количество разрывов в эмбриональных фибробластах (рис. 77, Б, В).

Через 24 ч после добавления фуллерена GI-761 в концентрации 4 мкМ к среде культивирования ФЛЭЧ количество двуцепочечных разрывов в клетках возрастает в 4,6 раз, по сравнению с контролем (рис. 78, 79). Добавление фуллерена в концентрации 20 мкМ к клеткам статистически значимо не влияет на количество разрывов в эмбриональных фибробластах при данном времени (рис. 78, 79). Клетки с большим количеством разрывов, вызываемой большей концентрацией фуллеренов, к данному времени погибают.

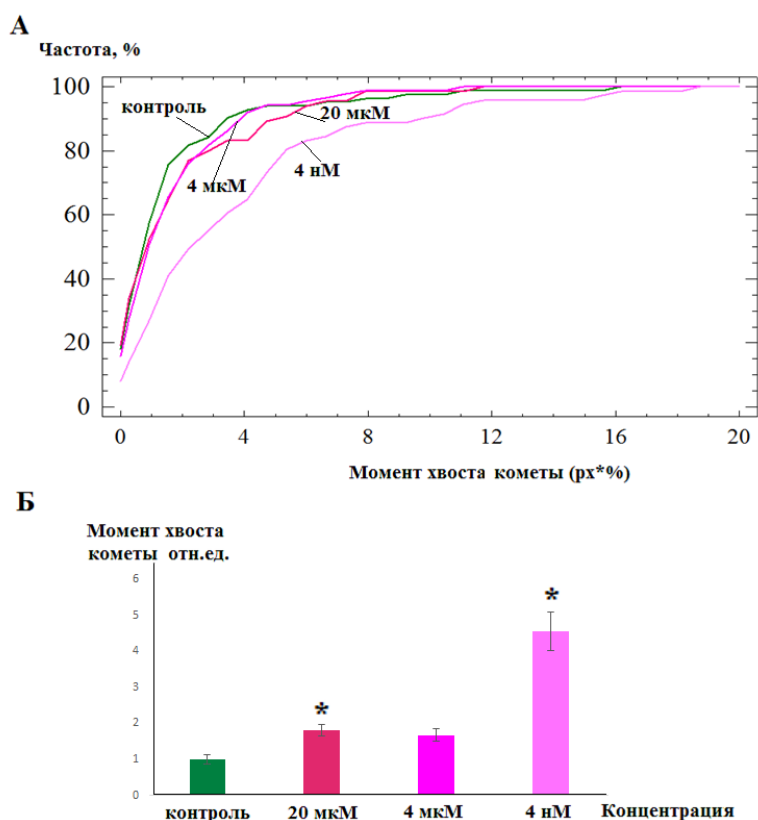


Рисунок 78. Анализ разрывов ДНК в клетках (ФЛЭЧ), инкубированных с фуллереном GI-761 24 ч в концентрации 20 мкМ - 4 нМ методом комет в щелочных условиях. А - Кумулятивные гистограммы для параметра комет - момента хвоста кометы через 24 ч

после добавления фуллерена GI-761 24 ч в концентрации 20 мкМ - 4 нМ (концентрации обозначены на рисунке) к среде культивирования клеток. Б–Гистограммы относительной частоты распределения момента хвоста комет в клетках. Достоверность различий с контролем в полученных распределениях проанализирована с помощью статистики Колмогорова-Смирнова ( $\alpha < 0,0001$ ). \* - отличия достоверны,  $p < 0,005$ , по критерию Манна-Уитни.

На рисунке 79 показаны кривые изменения количества двуцепочечных разрывов в клетках во времени. Фуллерен в концентрации 4 мкМ уже через 1 ч вызывает увеличение количества двуцепочечных разрывов в клетках, что должно коррелировать с ранним синтезом активных форм кислорода в клетке.

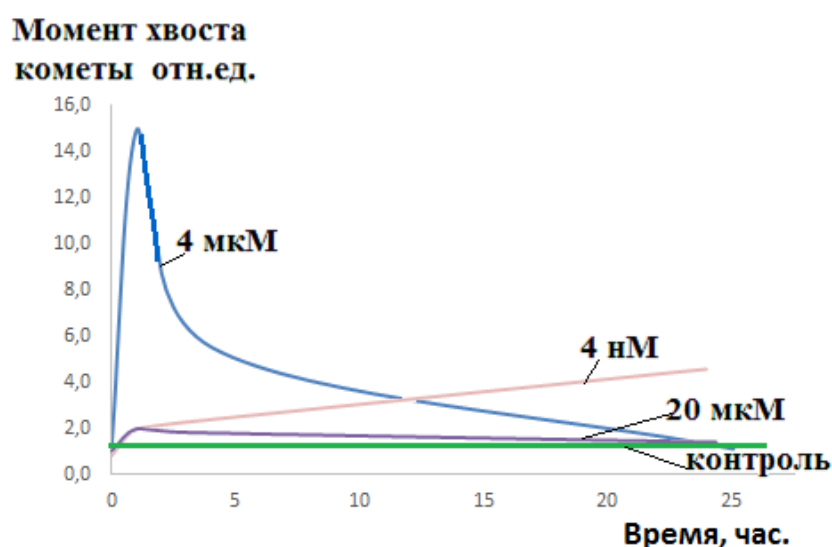


Рисунок 79. Анализ разрывов ДНК в клетках (ФЛЭЧ), инкубированных с фуллереном GI-761 в концентрации 20 мкМ - 4 нМ во времени методом комет в щелочных условиях. GI-761 в концентрации 20 мкМ, вероятно, связывает АФК активнее, чем в более низкой концентрации, что препятствует образованию разрывов ДНК.

Один из методов выявления двуцепочечных разрывов ДНК (DSBs) основан на том, что у весьма консервативного белка-гистона, участвующего в упаковке хроматина ДНК (H2AX) фосфорилируется остаток серина 139 на участке разрыва ДНК с участием киназы ATM, ATR и ДНК-ПК [122]. Реакция быстро распространяется, вовлекая в процесс от сотен до тысяч молекул H2AX, которые могут достигать нескольких мегабаз хроматина ДНК, фланкирующих сайт DSB. Связанные с мечеными антителами фосфорилированные гистоны  $\gamma$ H2AX визуализируются в клеточном ядре; их накопление в больших количествах указывает на начало развития апоптоза в клеточной популяции.

На рисунке 80А дана фотография фиксированных HELFs, окрашенных конъюгатом антител к  $\gamma$ H2AX с FITC. Анализ показал наличие трех типов клеток: клетки, не содержащие метки (3, рис. 80А), клетки с небольшим количеством  $\gamma$ H2AX (2) и клетки с большим количеством сливающихся пятен (1). Методом проточной цитофлуориметрии (при сравнении медиан распределений) подтверждены данные, полученные с помощью анализа методом комет. При добавлении к среде культивирования ФЛЭЧ фуллерена GI-761 в концентрации 4 мкМ количество двуцепочечных разрывов возрастает через 1 ч (рис. 80Б) и снижается через 3 ч. При добавлении к клеткам фуллерена GI-761 в концентрации 4 нМ число двуцепочечных разрывов возрастает только через 24 ч. Фуллерен GI-761 в концентрации 20 мкМ не оказывал повреждающего воздействия на ДНК клеток в течение первых суток после добавления к ФЛЭЧ.

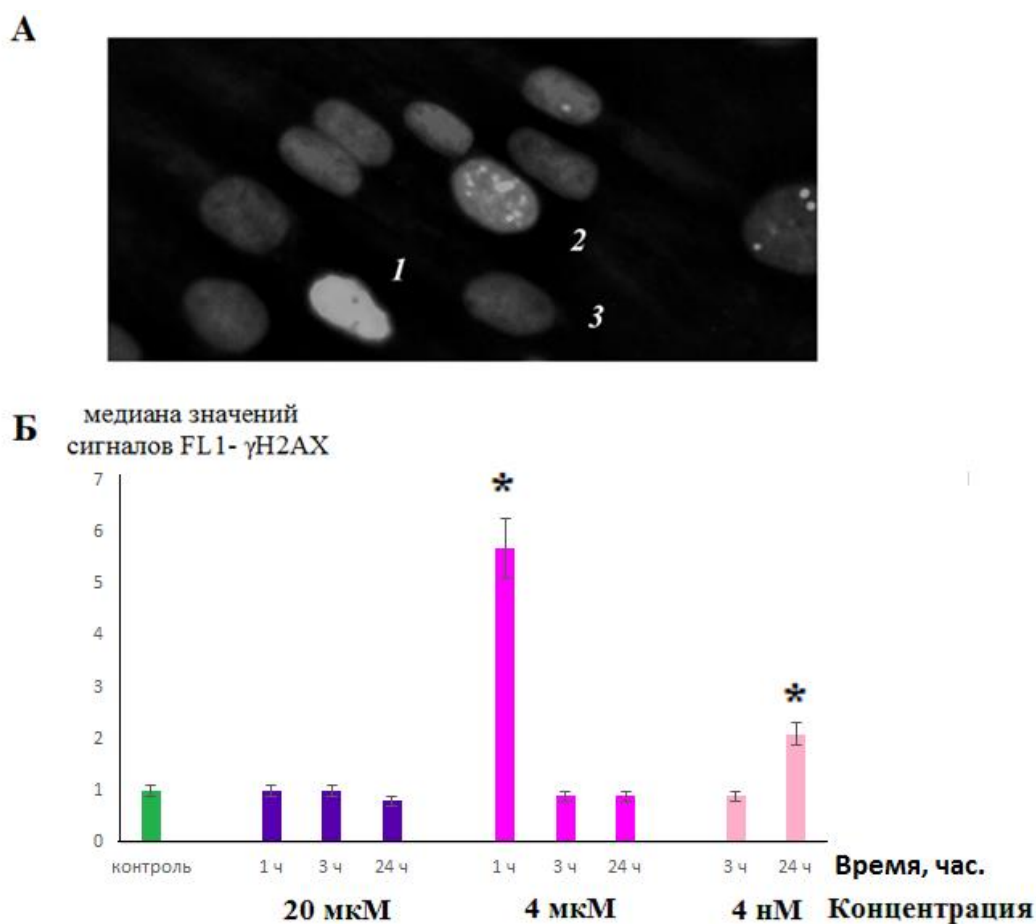


Рисунок 80. Фуллерен GI-761 изменяет уровень фосфорилированной формы гистона в ФЛЭЧ. А (флуоресцентная микроскопия, x40): Клетки обрабатывали антителами к  $\gamma$ H2AX и PI. Обнаруженные виды ядер обозначаются цифрами: 1 - ядра с большим количеством разрывов дцДНК, 2 - ядра с несколькими разрывами дцДНК, 3 - ядра без гамма-фокусов. Б. Гистограммы распределения медиан значений сигналов FL1-  $\gamma$ H2AX в

клетках, обработанных фуллереном GI-761 в разных концентрациях во времени. (\*) – (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0.005$ , непараметрический U-тест.

Фуллерен GI-761 в концентрации 20 мкМ, вероятно, связывает активные формы кислорода активнее, чем в более низкой концентрации, что препятствует образованию разрывов ДНК. Для более низких концентраций фуллерена GI-761 показана концентрационно-временная зависимость ответа ФЛЭЧ на добавление фуллерена GI-761 – более высокие концентрации вызывают более ранний ответ в клетках. Так, 4 мкМ фуллерена GI-761 вызывают повышение количества двуцепочечных разрывов в период «раннего» ответа, в то время как фуллерен в концентрации 4 нМ стимулирует образование разрывов ДНК во время «позднего» ответа. При этом происходит быстрое снижение количества разрывов ДНК. Возможно, в клетках активируются процессы репарации ДНК, однако, необходимо исследовать активацию репарационных систем в присутствии фуллерена, чтобы понять механизм развития антиоксидантных свойств.

### **3.5.2. Активация систем репарации ДНК ядер клеток при действии водорастворимого производного GI-761**

Снижение количества двуцепочечных разрывов может быть обусловлено активацией систем репарации в ФЛЭЧ. Гены BRCA1 и BRCA2 активируются при репарации ДНК в клетках. BRCA1 - это ядерный белок, который принимает участие в регуляции клеточного цикла и репарации двуцепочечных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. И, действительно, наблюдали активацию генов белков репарации BRCA1 и BRCA1, участвующих в репарации ДНК, в 2 – 3 раза на протяжении 1 – 24 ч действия фуллерена в концентрации 20 мкМ. Через 3 ч после добавления фуллерена в концентрации 4 мкМ увеличивалась в 2,5 раз экспрессия генов BRCA1 и BRCA1 и оставалась увеличенной в 2 раза через 24 ч. Через 24 ч после добавления фуллерена к ФЛЭЧ в концентрации 4 нМ возрастала экспрессия генов BRCA1 и BRCA1 в 1,5 раз. Все эти данные свидетельствуют об эффективном ответе клеток на двуцепочечные разрывы – активацией репарации ДНК, что и приводит к уменьшению уровня повреждений ДНК. Активация систем репарации ДНК обычно сопровождается остановкой клеточного цикла.

При иницировании клеточного цикла активируется синтез белка циклина D1, который кодируется геном CCND1 [142]. Циклин D1 запускает фазу G1 клеточного цикла,

играет ключевую роль в регуляции перехода клеток из фазы клеточного цикла G1 в фазу S через образование активного комплекса с циклин-зависимыми киназами, CDK4 и CDK6 [120]. Циклины синтезируются в течение клеточного цикла, уровень экспрессии белка циклина D1 регулируется на стадии транскрипции, поэтому уровень экспрессии гена CCND1 играет ключевую роль в прогрессии клеточного цикла [120]. К регулирующим элементам клеточного цикла принадлежат ингибиторы циклин-зависимых киназ (CDKI - cyclin-dependent kinase inhibitors). Белок p21 относится к семейству WAF/Kip CDKI, и кодируется геном CDKN1A. Экспрессия этого гена контролируется белком p53, повышение экспрессии гена CDKN1A может приводить к G1-аресту [126]. наблюдали снижение уровня экспрессии гена CCND1 в 2 - 3 раза и повышение экспрессии гена CDKN1A в 1,5 – 2 раза при действия фуллерена в концентрации 20 мкМ в течение 1- 24 ч. Фуллерен в концентрации 4 мкМ – снижает уровень экспрессии гена CCND1 в 2 – 2,5 раза и повышает уровень экспрессии гена CDKN1A в 1,5 – 2 раза в течение 3 – 24 ч, а при действии фуллерена в концентрации 4 нМ аналогичные изменения уровня экспрессии генов наблюдаются только через 24 ч.

### **3.5.3. Влияние производных фуллерена ОКR-111 и ОКR-112 на окисление и образование разрывов ДНК клеток ФЛЭЧ.**

Аналогичные результаты получены при исследовании уровня окислительных повреждений ДНК ядер фибробластов при действии на них соединений ОКR-111 и ОКR-112 в концентрации 4 мкг/мл – через 3 ч уровень 8-окси-2'-дезоксигуанозина (маркера окисления) возрастает, что ассоциировано с повышением уровня АФК; через 24 ч уровень 8-оксигуанозина падает ниже контрольных значений (рисунок 81). Уровень 8-оксигуанозина определен методом проточной цитофлуориметрии с помощью антител к 8-оксигуанозину. Исследовали влияние соединений ОКR-111 и ОКR-112 на образование разрывов ДНК клеток (ФЛЭЧ) методом электрофореза одиночных ядер (метод комет). Через 3 ч после добавления соединения ОКR-112 в концентрации 4 мкг/мл к среде культивирования ФЛЭЧ количество разрывов в клетках, определяемых методом комет, возрастает незначительно – в 1,8 раз по сравнению с контролем. Добавление фуллерена ОКR-111 в концентрации 4 мкг/мл к клеткам статистически значимо не влияет на количество разрывов в эмбриональных фибробластах. Через 24 ч количество разрывов

ДНК при действии фуллерена соединений ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 4 мкг/мл не отличается от контрольных значений.

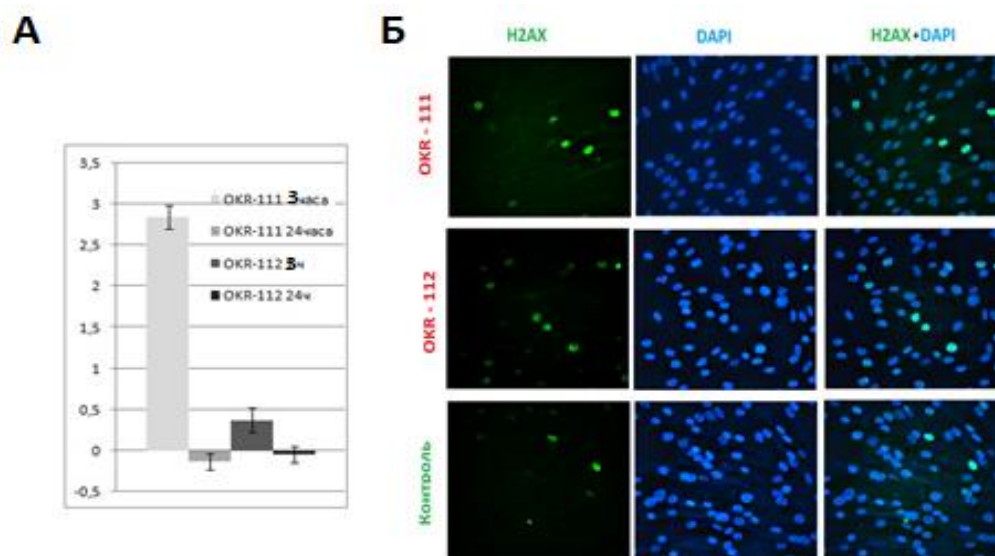


Рисунок 81. А – Гистограммы распределения клеток по уровню маркера окисления – 8-оксигуанозину (8ohodG) через 1 и 24 ч после добавления к клеткам ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 4 мкг/мл. Б - Производные фуллерена ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 4 мкг/мл через 30 мин. изменяют уровень фосфорилированной формы гистона в ФЛЭЧ. Флуоресцентная микроскопия, х40, слева направо: клетки обрабатывали антителами к  $\gamma$ H2AX, окраска ядер DAPI, совмещенная фотография.

На рисунке 81, приводится фотография фиксированных HELFs, окрашенных конъюгатом антител к  $\gamma$ H2AX с FITC. Анализ показал незначительное увеличение числа клеток, содержащих метки через 3 ч после добавления соединений ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 4 мкг/мл к среде культивирования ФЛЭЧ. Через 24 ч число меток в клетках после внесения соединений ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 4 мкг/мл снижалось ниже контрольных значений. Методом проточной цитофлуориметрии (при сравнении медиан распределений) подтверждены данные, полученные с помощью анализа гамма-фокусов.

Таким образом, соединения ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 4 мкг/мл вызывают незначительное повышение количества двуцепочечных разрывов и окислительных повреждений ДНК в ФЛЭЧ в период «раннего» ответа (ОКР-111 – в меньшей степени, чем ОКР-112), что ассоциировано с повышенным синтезом АФК. При этом в период «позднего» ответа происходит быстрое снижение количества разрывов ДНК и уровня окислительных модификаций ДНК по 8-оксигуанозину ниже контрольных значений.

### **3.5.4. Влияние производных фуллерена ОКР-111 и ОКР-112 на репарацию ДНК ядер клеток ФЛЭЧ**

Снижение количества разрывов ДНК при действии ОКР-111 и ОКР-112 также связано с активацией генов белков BRCA1 и BRCA2, участвующих в репарации ДНК в клетках. Через 24 ч после добавления соединений ОКР-111 и ОКР-112 в концентрации 4 мкг/мл и 4 нМ к среде культивирования ФЛЭЧ уровень экспрессии гена BRCA1 возрастает в 1,5 – 2 раза, а уровень экспрессии гена BRCA2 возрастает в 2 - 3 раза, при этом уровень экспрессии белка BRCA1 возрастает в 1,5 раза, что свидетельствует об активации процессов репарации разрывов ДНК, вызванных исследуемыми производными фуллерена

### **3.5.5. Отсутствие разрывов в ДНК ядер ФЛЭЧ при действии производными фуллерена vi-434K2 и VI-419-P3K**

Соединения vi-434K2 в концентрации до 300 мкг/мл, так же, как и соединение VI-419-P3K во всех исследованных концентрациях не оказывали влияния на количество двуцепочечных разрывов и окислительных повреждений ДНК в ФЛЭЧ.

### **3.5.6. Исследование разрывов в ДНК ядер клеток ФЛЭЧ с депривацией сыворотки при культивировании с F-828**

В эксперименте с депривацией сыворотки в культуральной среде исследовали влияние соединения F-828 на число двуцепочечных разрывов в ФЛЭЧ. В отсутствии сыворотки или при ее пониженном содержании клетки более выражено реагируют на внешние воздействия [143]. На рисунке 82А приводится фотография фиксированных ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде, окрашенных конъюгатом антител к  $\gamma$ H2AX с FITC.

Аналогично, для фуллерена F-828 анализ показал наличие трех типов клеток: клетки, не содержащие метки (3, рис. 82А), клетки с небольшим количеством  $\gamma$ H2AX (2, рис. 82А) и клетки с большим количеством пятен, которые сливаются (1, рис. 82А). Метод проточной цитофлуориметрии (рис. 82Б) также позволил выявить три фракции клеток на графике FL1( $\gamma$ H2AX) – SSC. Фракция R1 (12 % всей популяции) – клетки с большим количеством  $\gamma$ H2AX, R2 (39%) – клетки с более низким содержанием  $\gamma$ H2AX и R3 -

клетки, не содержащие  $\gamma$ H2AX (51%). Таким образом, почти половина ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде, экспрессирует детектируемые количества  $\gamma$ H2AX.

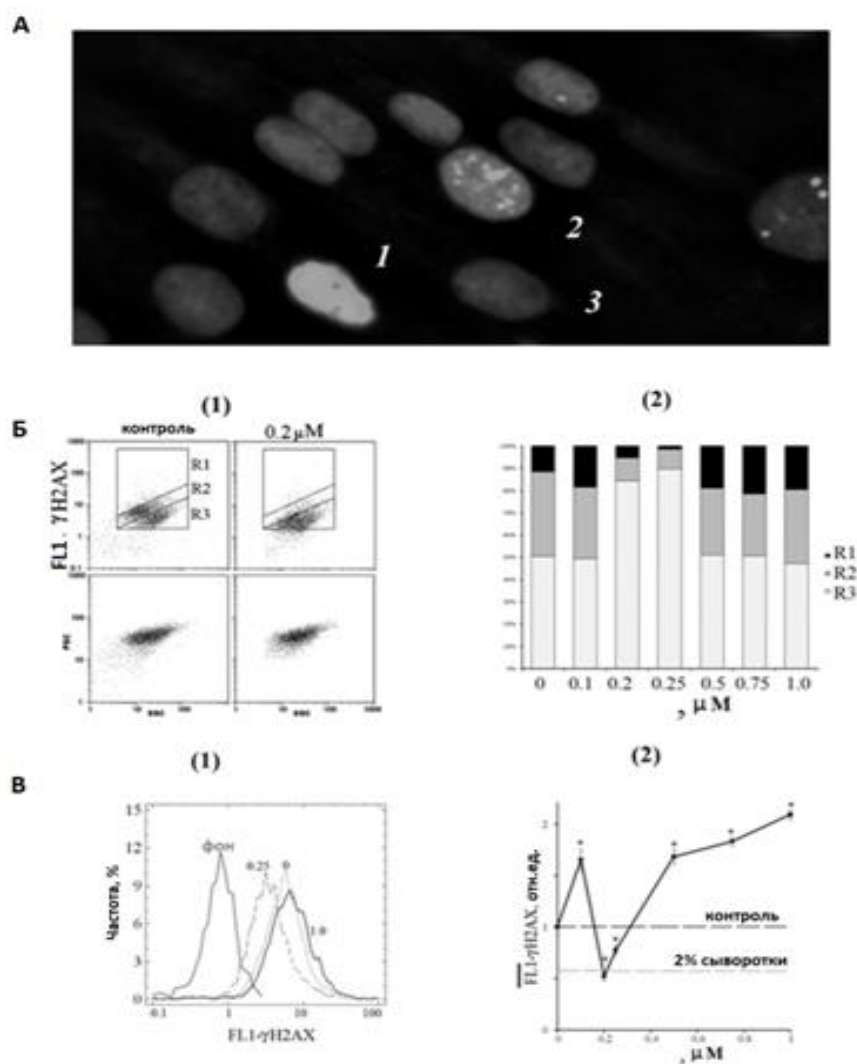


Рисунок 82. F-828 изменяет уровень фосфорилированной формы гистона в ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде. А (флуоресцентная микроскопия,  $\times 40$ ): Клетки обрабатывали антителами к  $\gamma$ H2AX и P1. Обнаруженные виды ядер обозначаются цифрами: 1 - ядра с большим количеством разрывов дцДНК, 2 - ядра с несколькими разрывами дцДНК, 3 - ядра без гамма-фокусов. Б (проточная цитофлуориметрия): (1) - FL1- $\gamma$ H2AX (верхний ряд) и FSC (нижний ряд) против SSC. Области R1, R2 и R3 обогащены фракцией ФЛЭЧ с различным содержанием  $\gamma$ H2AX. (2) - Изменение содержания в популяции трех фракций клеток в зависимости от концентрации F-828. В - (проточная цитофлуориметрия): (1) - Распределение клеток, обработанных фуллереном F-828 по сигналу FL1- $\gamma$ H2AX. (2) - Зависимость медиан значений сигналов FL1- $\gamma$ H2AX от концентрации фуллерена.

Фракция R1 содержит клетки с очень высоким содержанием гамма-фокусов. Вероятно, это клетки, в которых индуцирован апоптоз. В присутствии сыворотки



фракция R1 значительно уменьшается (с 12 % до 4%). В присутствии 0,1; 0,5; 0,75 и 1,0  $\mu\text{M}$  фуллерена F-828 наблюдали уже через 1 ч увеличение среднего количества  $\gamma\text{H2AX}$  в клетках в 1,8 - 2,2 раза (рис. 82 В(2)). Но в присутствии 0,2 и 0,25  $\mu\text{M}$  F-828 среднее количество  $\gamma\text{H2AX}$  в клетках уменьшалось в 1,5 - 2,0 раза. Как видно из гистограммы на рис. 24 В(2) значительно снижалось количество клеток фракции R1 и R2.

**Таким образом,** образование разрывов ДНК в ядрах ФЛЭЧ также зависит от концентрации добавляемого в среду фуллерена. В присутствии 0.2 – 0.25  $\mu\text{M}$  фуллерен F-828 сильно снижается количество двуцепочечных разрывов, при добавлении фуллерена в концентрациях 0,1; 0,5; 0,75 и 1,0  $\mu\text{M}$  увеличивается число разрывов ДНК.

### **3.5.7. Исследование репарации ДНК ядер клеток ФЛЭЧ с депривацией сыворотки при культивировании с F-828**

Так же, как и для остальных исследуемых фуллеренов, показано, что после добавления фуллерена F-828 усиливается экспрессия генов BRCA1 и BRCA2, активирующихся при репарации ДНК в клетках. Через 1 ч после добавления фуллерена F-828 в концентрации 0.2 – 0.25  $\mu\text{M}$  к среде культивирования ФЛЭЧ уровень экспрессии гена BRCA1 возрастает в 1,5 – 2 раза. Уровень экспрессии белка BRCA1 через 1 ч после добавления фуллерена F-828 в концентрации 0.2 – 0.25  $\mu\text{M}$  к среде культивирования ФЛЭЧ увеличивается на 60 - 80%, что свидетельствует об активации процессов репарации разрывов ДНК, вызванных исследуемым производным фуллерена.

Наиболее полно влияние фуллерена на культивируемые эмбриональные фибробласты исследовано при добавлении фуллерена F-828 в среду культивирования.

### **3.5.8. Влияние производного фуллерена F-828 в бессывороточной среде на пролиферативную активность ФЛЭЧ**

Показали, что фуллерен F-828 в бессывороточной среде увеличивает количество культивируемых клеток в популяции.

На рисунке 83А приводятся фотографии ФЛЭЧ, которые культивировали трое суток в присутствии 2% сыворотки, в бессывороточной среде Hybris, а также в средах, содержащих 0.5  $\mu\text{M}$  и 2.0  $\mu\text{M}$  F-828. На рис. 83Б приведена зависимость количества клеток в культуре от концентрации F-828 в бессывороточной среде.

Популяция ФЛЭЧ культивировалась в течение трех дней в среде Hybris с 2% сыворотки, число клеток увеличилось приблизительно в  $10,3 \pm 0,8$  раз, в то время как рост

в бессывороточной среде оказался незначительным - в  $3,2 \pm 0,3$  раз. При добавлении фуллерена F-828 (0,2 - 0,5 мкМ) к бессывороточной среде число клеток увеличивается на 50% ( $p < 0,01$ ) - больше, чем у контрольных клеток, в то время как в присутствии больших концентраций соединения F-828 этого эффекта не обнаружено (рис. 83Б). В 1,0 мкМ наблюдается уменьшение количества клеток. В присутствии 2,0 мкМ F-828 клетки практически не делятся (рис. 83 А).

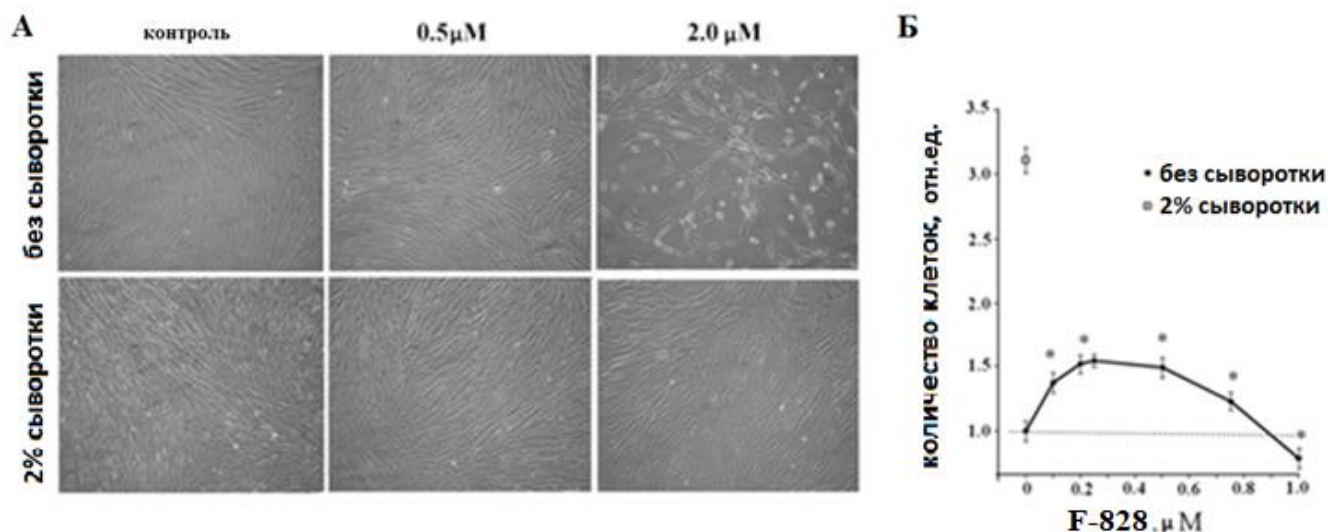


Рисунок 83. Фуллерен F-828 влияет на количество клеток в ФЛЭЧ. А: Фото ФЛЭЧ, обработанных фуллереном F-828 (увеличение 20X). Верхний ряд – бессывороточная среда, нижний ряд – 2% сыворотки. Концентрации фуллерена указаны на рисунке. Контроль – фуллерен не добавляли. Б: зависимость числа клеток в культуре от концентрации фулллерена F-828. Время культивирования -72 ч.

Количество клеток в культуре зависит от активности процесса клеточного деления и от активности процесса клеточной гибели. Проанализировали влияние фуллерена на пролиферативную активность ФЛЭЧ.

Исследовали пролиферативную активность ФЛЭЧ через 48 ч после воздействия фуллерена F-828 на клетки в бессывороточной среде (рис. 84). Клетки окрашивали антителами к маркерам пролиферации Ki-67 и PCNA [144], и исследовали с помощью проточной цитофлуориметрии. Кроме того, подсчет клеток осуществляли после окраски ДНК-специфичным красителем пропидий иодидом (PI). На рисунке 84Б показано распределение клеток с различным содержанием Ki-67. Отсутствие сыворотки приводит к снижению пролиферативной активности клеточной фракции по сравнению со средой, содержащей сыворотку (рис. 84Б (3)). Культивируемые в бессывороточной среде ФЛЭЧ обрабатывались 0,1 - 0,25 мкМ фуллерена F-828, пропорция Ki-67-положительных клеток оказалась увеличена по сравнению с культивируемыми в бессывороточной среде ФЛЭЧ.

В присутствии 0,5 - 1,0 мкм фуллерена F-828, количество клеток, экспрессирующих Ki-67, при культивировании ФЛЭЧ в бессывороточной среде, уменьшилось.

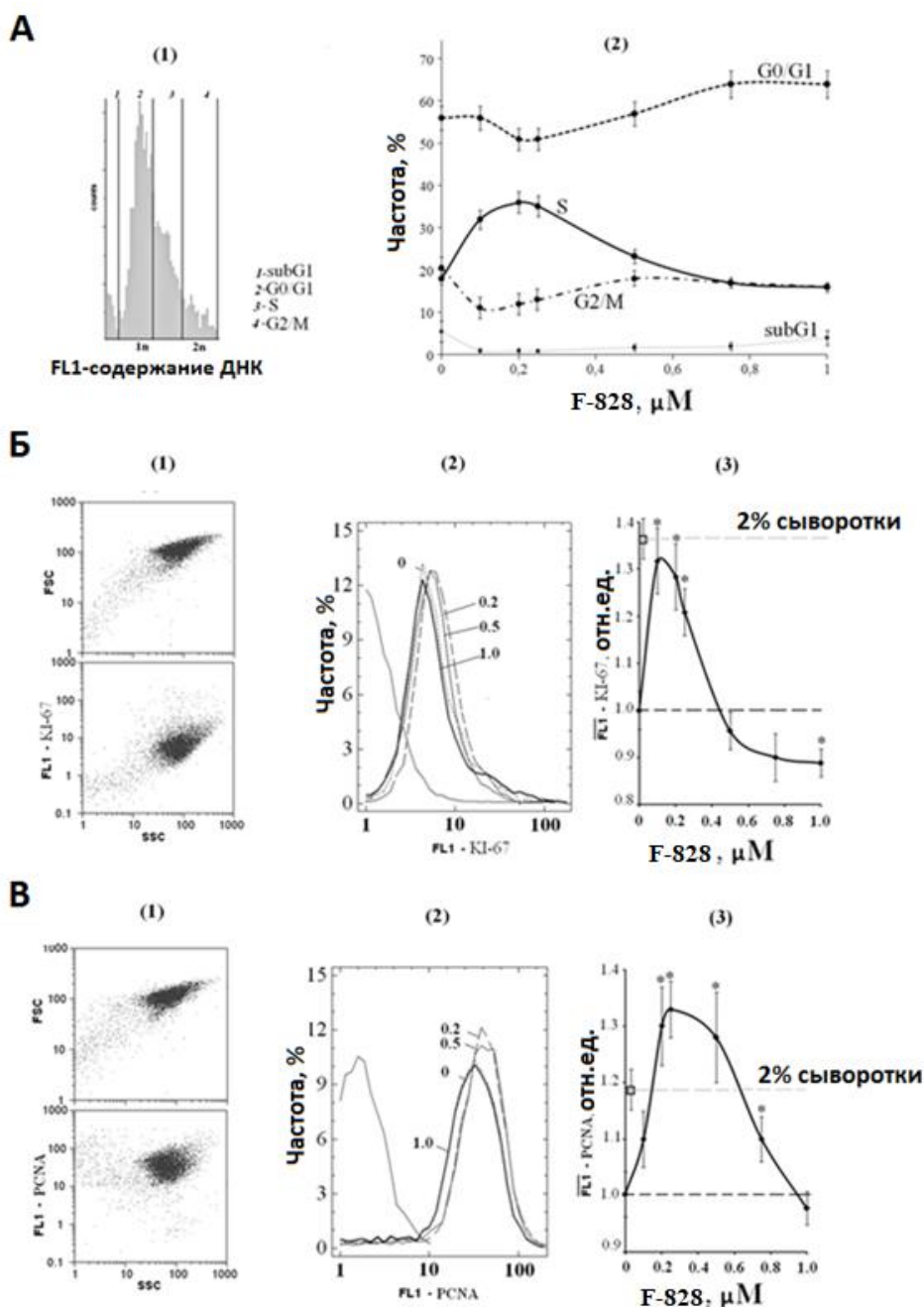


Рисунок 84. F-828 влияет на пролиферативную активность ФЛЭЧ. А - проточная цитофлуориметрия: (1) – распределение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных PI; (2) – изменение содержания в ФЛЭЧ клеток с количеством ДНК, соответствующим G1-, S and G2/M –фазам клеточного цикла в зависимости от концентрации F-828 в среде культивирования. Б - проточная цитофлуориметрия: (1) - FL1-Ki-67 или FSC против SSC для контрольных ФЛЭЧ. (2) – Распределение клеток, обработанных F-828 по сигналу FL1- Ki-67. (3) - Зависимость медиан значений сигнала FL1- Ki-67 от концентрации фуллерена. В - проточная цитофлуориметрия: (1) - FL1-PCNA или FSC против SSC для контрольных ФЛЭЧ. (2) - Распределение клеток,

обработанных F-828 по сигналу FL1- PCNA. (3) - Зависимость медиан значений сигнала FL1- PCNA от концентрации фуллерена.

Аналогичный анализ проведен для PCNA. Если при культивировании клеток добавить сыворотку - 2% FBS, то доля PCNA-положительных пролиферирующих клеток увеличивалась по сравнению с культурой, выращенной в бессывороточной среде. Когда клетки подвергали воздействию 0,1 - 0,75 мкМ фуллерена F-828, пропорция PCNA-положительных клеток оказывалась увеличена по сравнению с ФЛЭЧ, культивирующихся в бессывороточной среде (рис. 84 С). Увеличение концентрации фуллерена F-828 приводит к снижению эффекта. Интересно, что доля PCNA-положительных клеток возрастает, если клетки подвергали воздействию 0,5 и 0,75 мкМ фуллерена F-828 (рис. 84 С).

### **3.5.9. Влияние водорастворимого производного F-828 на клеточный цикл в клетках ФЛЭЧ**

Усиление пролиферативной активности ФЛЭЧ в присутствии малых количеств фуллерена F-828 подтверждается данными по содержанию ДНК в клетках (рис. 84А). 0,1 – 0,25 мкМ концентрации фуллерена F-828 индуцируют увеличение числа клеток в S-фазе ( $p < 0.01$ ). При этом снижается содержание клеток в G0/G1 фазе цикла ( $p < 0.05$ ).

Окрашивание пропидий иодидом содержания ДНК показало, что популяция ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде, имеет большие пропорции G2 / М клеток (23 % против 7% для среды с 2% сыворотки), рис. 84 А(2). После воздействия 0,1 – 0,25 мкМ фуллерена F-828 пропорция G2/М клеток снижается ~ на 50%. Этот факт указывает на снижение в присутствии низких концентраций фуллерена количества клеток в состоянии G2/М ареста, которое вызвано культивированием в условиях стресса. В клетках, обработанных 0,5-1,0 мкМ фуллерена F-828, пропорции G2/М клеток оставались такими же, как в контрольных фибробластах, культивируемых в бессывороточной среде.

При иницировании клеточного цикла фуллерен F-828 активирует синтез белка циклина D1, который кодируется геном *CCND1*. Циклин D1 запускает фазу G1 клеточного цикла, играет ключевую роль в регуляции перехода клеток из фазы клеточного цикла G1 в фазу S.

При воздействии соединения F-828 в концентрации 0,1 - 0,75 мкМ на ФЛЭЧ уровень экспрессии гена *CCND1* возрастает в течение 72 ч (рис. 85), что свидетельствует о прогрессии клеточного цикла и усилении процесса пролиферации клеток.

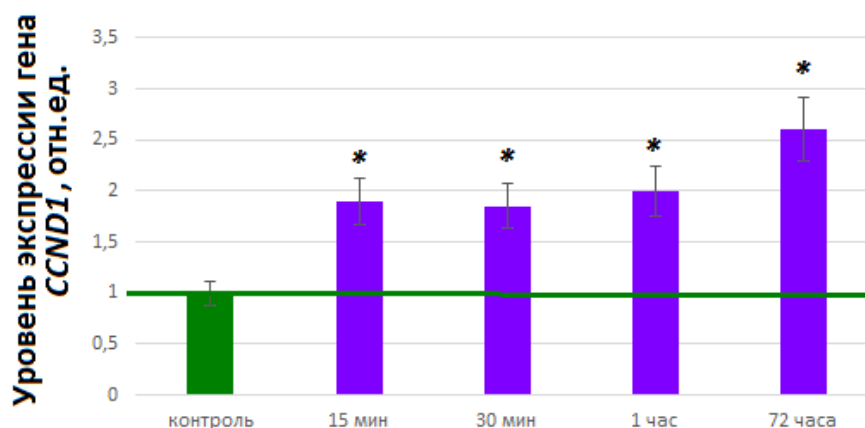


Рисунок 85.А - Уровень экспрессии гена *CCND1* в клетках при действии фуллерена F-828 в концентрации 0,3 мкМ на ФЛЭЧ. Количество РНК *CCND1* - среднее значение (три эксперимента) экспрессии гена *CCND1* в присутствии производного фуллерена F-828 по отношению к экспрессии гена *CCND1* в контроле (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген *TBP*. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0.005$ , непараметрический U-тест.

Таким образом, производное фуллерена F-828 в малых концентрациях (0,1 - 0,5 мкМ) стимулирует прогрессию клеточного цикла, что сопровождается увеличением числа клеток в популяции ФЛЭЧ.

### 3.5.10. Влияние водорастворимого производного F-828 на количество транскрипционного фактора p53 в клетках ФЛЭЧ

p53 является основным фактором транскрипции, который активируется в ответ на повреждение ДНК в условиях окислительного стресса. Арест клеточного цикла и апоптоз клеток в большинстве случаев регулируются с участием p53. В течение 48 ч инкубации клеток с фуллереном F-828 при низких концентрациях фуллерена (0,004 и 0,1 мкМ) наблюдалось увеличение количества РНК для p53 в клетках по сравнению с контрольными клетками. При 4 и 19 мкМ фуллерена F-828 уровень РНК не отличался от контрольных значений.

p53 белок накапливается в заметных количествах примерно в 60% клеток из контрольного пула клеток ФЛЭЧ (рис. 86А (1)). Исследовали зависимость изменения уровня p53 в клетках (рис.86А (2)) от длительности воздействия 0,004, 0,1, 4 и 19 мкМ F-

828. Уровень белка p53 в клетках не изменяется или незначительно снижается через 1, 3 и 24 ч. Через 48 ч культивирования с F-828 в концентрациях 0,1, 4 и 19 мкМ содержание белка p53 в клетках увеличивается на 40-50%. В присутствии 0,004 мкМ F-828 через 48 ч обнаружено снижение уровня p53.

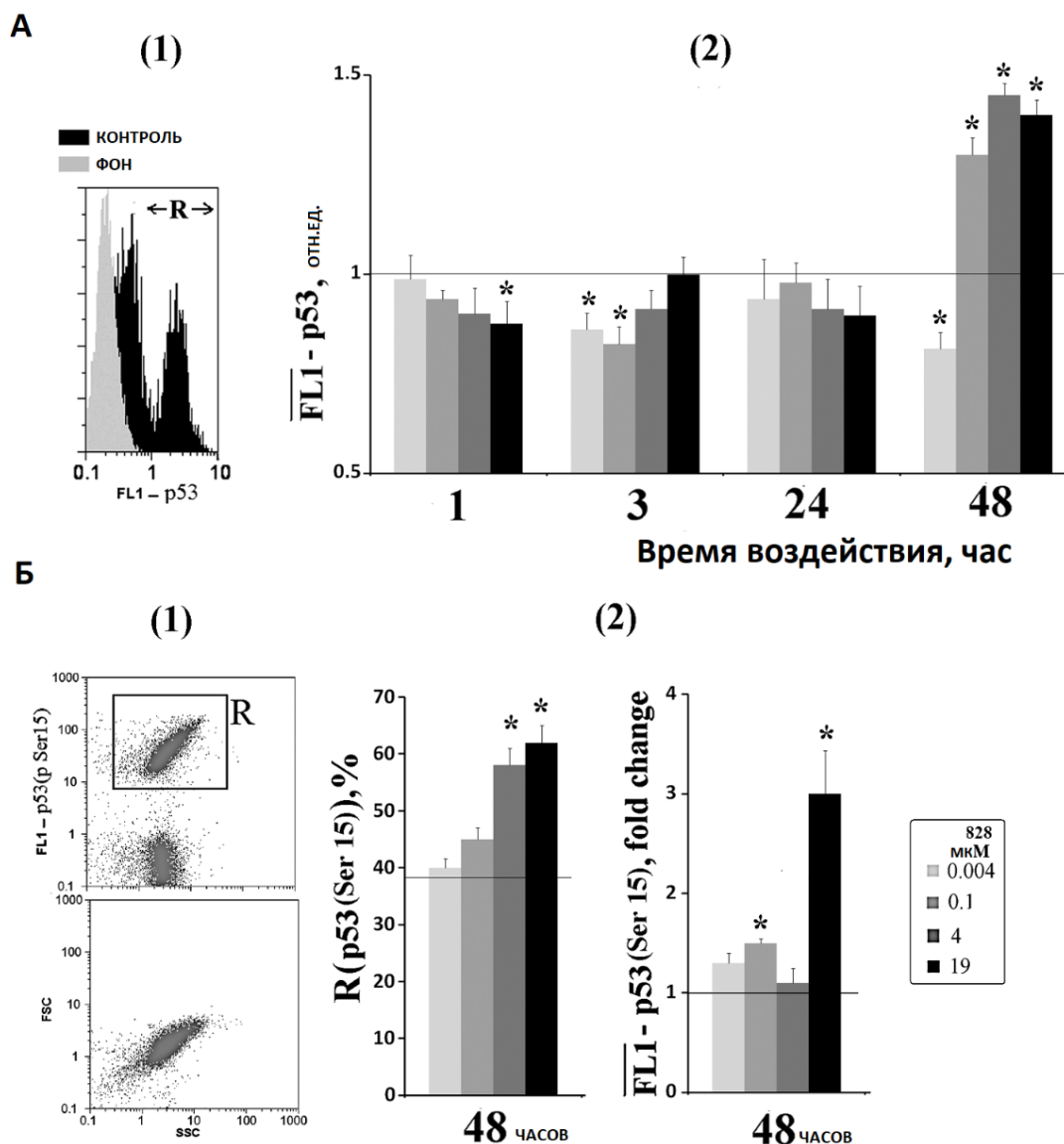


Рисунок 86. Изменения активности p53 в клетках, подверженных воздействию F-828. А (цитометрия): (1) – распределение ФЛЭЧ по p53; (2) - зависимость средней интенсивности сигнала флуоресценции p53 от концентрации F-828 и времени инкубации. Б (1) – зависимость FSC от SSC и fl1 - p53 (pSer15) от SSC; гейт R – клетки, экспрессирующие p53 (pSer15); (2) – отношение клеток, экспрессирующих p53 (pSer15) и средняя интенсивность сигнала флуоресценции p53 (pSer15) (гейт R) от концентрации F-828 и времени культивирования.

Активной формой белка является молекула, фосфорилированная по остатку Ser15 [145]. Пул фибробластов содержит около 40% клеток с p53 (Ser15) (рис. 86Б). После 48 ч

культивирования клеток в присутствии F-828 количество p53 (Ser15) увеличивается при концентрации фуллерена 0,004, 0,1 и 4 мкМ примерно на 10-50% по сравнению с контролем (рис.86Б (2)). При высокой концентрации (19 мкМ) наблюдается трехкратное повышение уровня фосфорилирования. Соотношение клеток, экспрессирующих p53 (ser15) возрастает, достигая 60% от общего числа клеток (рис.86Б (2)). Повышенный уровень p53 может приводить к остановке клеточного цикла или к апоптозу [146], поэтому проанализирована экспрессия про- и антиапоптотических генов.

### 3.5.11. Влияние фуллеренов на экспрессию генов про- и антиапоптотического ответа во ФЛЭЧ и возможное развитие адаптивного ответа.

Исследовали влияние фуллеренов на экспрессию генов про- и антиапоптотического ответа во ФЛЭЧ и возможное развитие адаптивного ответа.

Мы проанализировали изменения экспрессии 5 генов семейств BIRC и BCL, которые принимают участие в антиапоптотическом ответе клетки (рис. 87) и гена BAX, который принимает участие в индукции апоптоза в ФЛЭЧ после добавления фуллерена F-828.

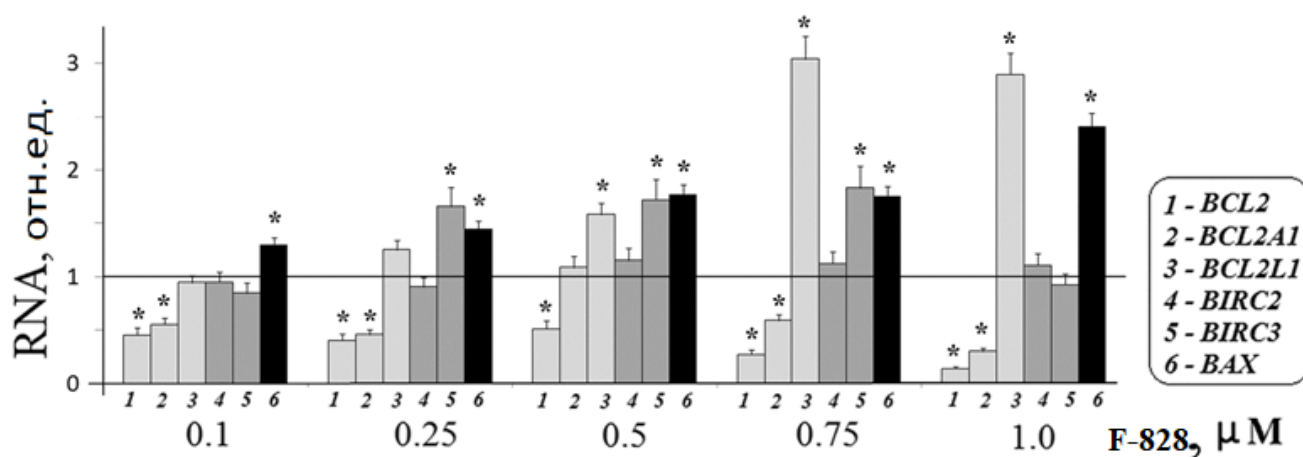


Рисунок 87. Уровень экспрессии про- и антиапоптотических генов в клетках (ФЛЭЧ) при действии F-828 в концентрации указанной на рисунке через 3 ч после добавления фуллерена. Количество РНК генов - среднее значение экспрессии гена при воздействии фуллерена (три эксперимента) по отношению к экспрессии гена в контроле – интактных ФЛЭЧ. В качестве гена внутреннего стандарта использован ген TBP. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0.005$ , непараметрический U-тест.

В присутствии фуллерена F-828 в концентрации 0,25 и 0,5 мкМ количество РНК гена BAX снижалось. При низких концентрациях фуллерена F-828 (0.1 – 0.5 мкМ) в клетках увеличивалась экспрессия антиапоптотических генов. При более высоких концентрациях

фуллерена F-828 (0,75 и 1,0  $\mu\text{M}$ ) количество РНК гена *BAH* увеличивалось, а количество РНК антиапоптотических генов снижалось.

Таким образом, фуллерен F-828 в концентрации 0,1 – 0,5  $\mu\text{M}$  способствует повышению выживаемости клеток, которые культивировали в условиях депривации сыворотки и может активировать адаптивный ответ в клетках, что, однако, требует дополнительных исследований.

### **3.6. Влияние производного фуллерена F-828 на активность транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B на уровне РНК, белка, локализации в клетках и содержания фосфорилированных форм**

При культивировании ФЛЭЧ в среде, содержащей 2% сыворотки, в клетках отмечается относительно низкий уровень экспрессии NF- $\kappa$ B. Фактор неактивен и локализован исключительно в цитоплазме клеток. Предполагают, что в сыворотке содержатся молекулы, способные ингибировать активность NF- $\kappa$ B [147]. В сыворотке крови голодающих клеток, уровень NF- $\kappa$ B (p65) увеличивается в значительной степени наряду с транслокацией NF- $\kappa$ B (p65) в ядро [147]. Депривация сыворотки может активировать NF- $\kappa$ B в клетках. Хорошо известно, что NF- $\kappa$ B (P65) активируется с помощью фосфорилирования, которое играет ключевую роль в регуляции его транскрипционной активности, и связана с ядерной транслокацией [148]. Методом проточной цитофлуориметрии определяли ФЛЭЧ, которые содержат фосфорилированный Ser529 (P65) [140], и показали, что в бессывороточной среде культивирования ФЛЭЧ существенно увеличивается доля клеток, которые содержат фосфорилированный Ser529 в p65, тем самым подтверждая, что в этих клетках NF- $\kappa$ B является транскрипционно активным.

Фуллерен F-828 в концентрации 0,1 – 1,0  $\mu\text{M}$  стимулирует увеличение количества белка p65 в 2-3 раза и увеличение его фосфорилированной формы Ser529 (p65) в 2,5 – 3,5 раза. Максимальный эффект наблюдали в присутствии 0,25  $\mu\text{M}$  F-828 (рис. 88В (3) и Г(3)). Уровень экспрессии гена *NFKB1* также возрастает в присутствии фуллерена F-828, наибольшее возрастание отмечается при добавлении 0,4  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  F-828 к ФЛЭЧ (рис. 88 А).

Увеличение количества белка p65 подтверждается и флуоресцентной микроскопией (рис. 88 Б). Интенсивность флуоресценции ядер ФЛЭЧ, окрашенных



антителами к р65 значительно возросла при культивировании клеток в присутствии фуллерена. При этом белок по-прежнему локализован исключительно в ядрах клеток.

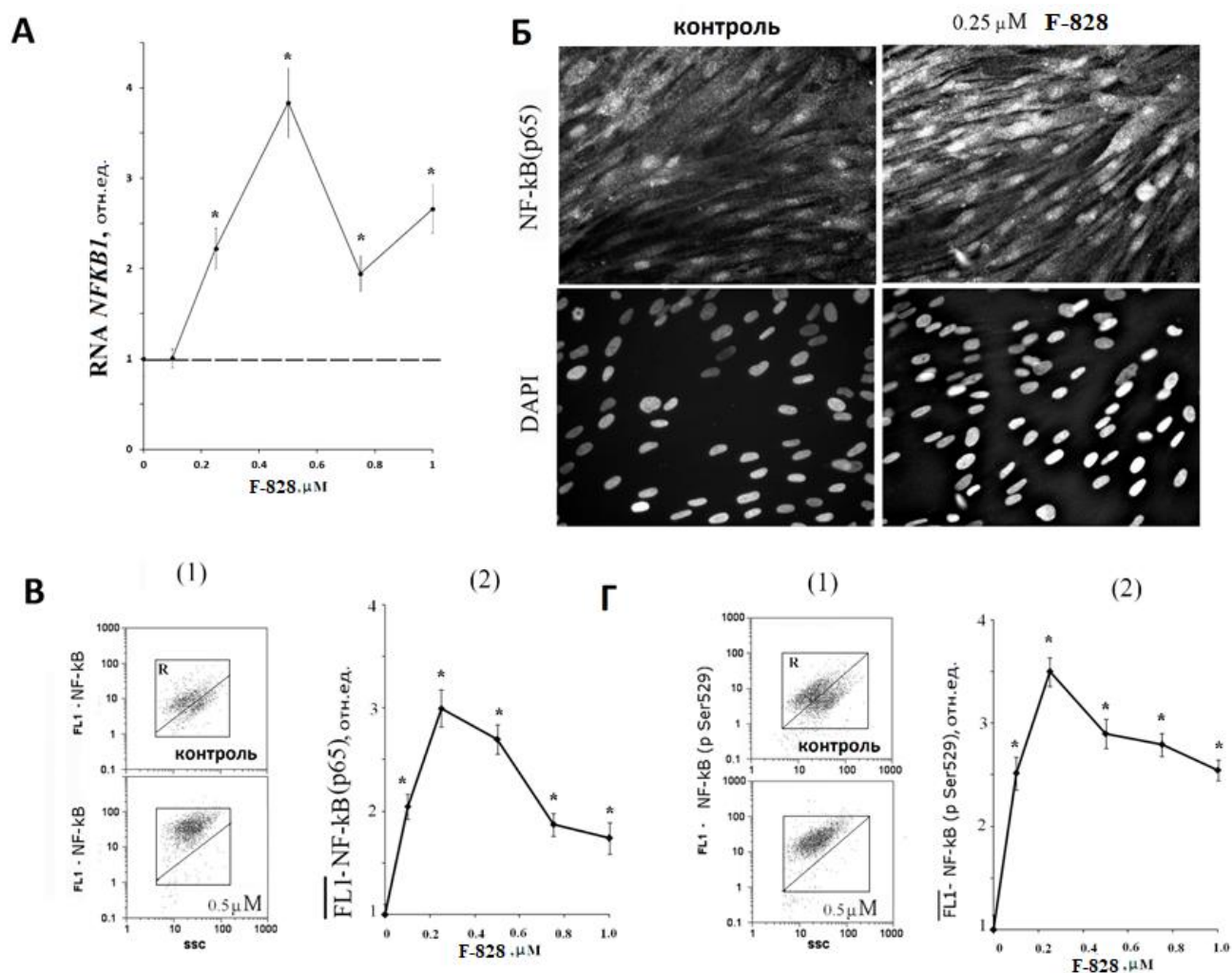


Рисунок 88. Фуллерен F-828 способствует увеличению активности NF-κB. А - ПЦР в реальном времени: Изменения уровня мРНК, кодирующих NFKB1 в ФЛЭЧ. Б - Флуоресцентная микроскопия: фото клеток, окрашенных антителами к p65 (FITC) и DAPI, × 40. В – Проточная цитофлуориметрия: (1) - NF-κB (p65) против SSC. Фракция R содержит ФЛЭЧ с повышенными значениями FL1- NF-κB (p65). (2) - Зависимость средних значений FL1- NF-κB (p65) - сигнала от концентрации фуллерена F-828. Г - Проточная цитофлуориметрия: FL1- NF-κB (pSer529) против SSC. Фракция R содержит ФЛЭЧ с повышенными значениями FL1- NF-κB (pSer529). (2) - Средние значения сигналов FL1- NF-κB (pSer529) в зависимости от концентрации фуллерена F-828.

Об увеличении активности этого транскрипционного фактора в присутствии фуллерена говорит и значительное увеличение уровня экспрессии гена интерлейкина 6,

который контролируется NF-κB. Отметим, что экспрессия интерлейкина 6 возросла только в присутствии 0.25 μM F-828.

### **3.6.1. Исследовано влияние фуллеренов на процессы аутофагии клеток**

Культивирование в среде с пониженным содержанием сыворотки может активировать аутофагию, которая направлена для восстановления метаболического гомеостаза путем деградации макромолекул, чтобы обеспечить клетки дополнительными питательными веществами. Окислительный стресс может способствовать формированию аутофагии. Аутофагия, в свою очередь, может способствовать снижению окислительного повреждения, путем поглощения и деградации окисленных веществ [149]. В условиях стресса, который развивается при культивировании ФЛЭЧ в бессывороточной среде, в клетках значительно активируется процесс аутофагии. Белок беклин является одним из маркеров аутофагии. Для количественной оценки этого белка применили антитела к беклину и метод проточной цитофлуориметрии. Количество беклина в условиях культивирования в бессывороточной среде возрастает в 2 раза по сравнению с его количеством в клетках, которые культивировали в присутствии 2% сыворотки (рис. 89А). При добавлении в среду культивирования фуллерена F-828 в концентрации 0,1 – 1,0 μM количество беклина в клетках снижается соответственно в 1,1 – 2 раза. Аналогичный эффект наблюдали при добавлении фуллерена F-828 в концентрации 0,1 – 1,0 μM к ФЛЭЧ при исследовании уровня другого маркера аутофагии - LC3 (рис. 89 Б). По-видимому, фуллерен F-828 подавляет аутофагию в ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде.

В ряде работ показано, что супрессия аутофагии и в стрессовых условиях сопровождается активацией NRF2-сигнального пути [147], однако в других исследованиях отмечалось, что аутофагия может быть напрямую связана с уровнем экспрессии NRF2 [149].

Как показано, в случае депривации сыворотки в среде культивирования ФЛЭЧ добавление фуллерена F-828 сопровождалось подавлением аутофагии при снижении активности мастера-регулятора антиокислительного ответа NRF2.

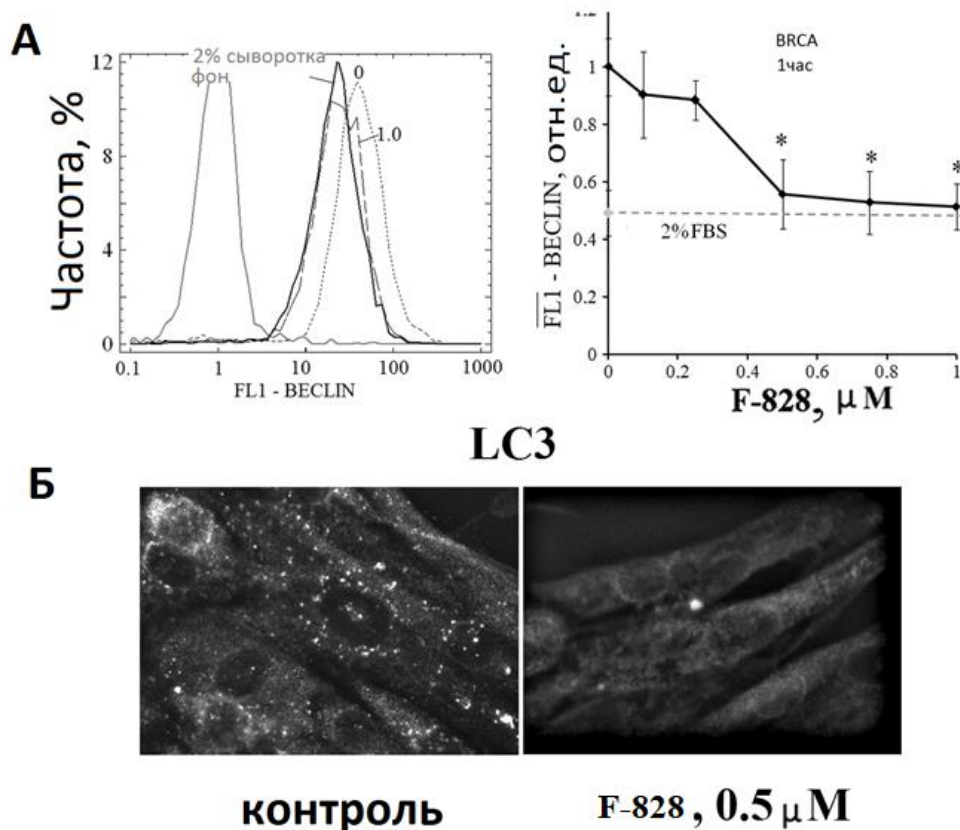


Рисунок 89. Фуллерен F-828 подавляет аутофагию в ФЛЭЧ, культивируемых в бессывороточной среде. А - Проточная цитофлуориметрия: Распределение клеток через 24 ч после добавления фуллерена F-828 к ФЛЭЧ в зависимости от силы сигнала FL1-беклин; Зависимость средних значений сигнала FL1-беклин от концентрации фуллерена F-828. В - Флуоресцентная микроскопия: Изменение уровня LC3-положительных клеток (ФЛЭЧ) через 24 ч после добавления 0,5 мкМ фуллерена F-828.

### 3.6.2. Производное фуллерена F-828 усиливает экспрессию генов сигнального каскада Rho / Rock и Smad в эмбриональных фибробластах легкого человека

Известно, что TGF- $\beta$ 1 (трансформирующий ростовой фактор бета, transforming growth factor  $\beta$ ) индуцирует экспрессию мРНК *NOX4* [150]. Поскольку исследуемое соединение вызывало увеличение уровня *NOX4* в клетках ФЛЭЧ, решено оценить уровень TGF- $\beta$  и ассоциированных с ним сигнальных путей. Уровень экспрессии генов TGF- $\beta$  и *NOX4*, определяемый с помощью метода ПЦР в реальном времени, увеличивается в 2-7 раз и  $\sim 2$  раза в присутствии различных количеств фуллерена в культуральной среде (таблица 2).

Одним из неблагоприятных последствий активации экспрессии TGF- $\beta$  и *NOX4* в ФЛЭЧ водорастворимыми производными фуллеренов, сопровождающейся усилением

синтеза АФК, может быть возможность развития патологического фиброза. Активация сигнального пути TGF- $\beta$  / Smad, индуцированного повышением экспрессии TGF- $\beta$ 1, и связанного с ним Rho / Rock пути передачи сигнала приводит к трансформации фибробластов в миофибробласты [151].

Таблица 2. Уровень экспрессии генов TGF- $\beta$ , RHOA, RHOC, ROCK, SMAD в клетках ФЛЭЧ при действии производным фуллерена F-828 в различных концентрация в течение 48 ч. В таблице приведено среднее значение для экспериментов в трех повторах и стандартное отклонение. По критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

Концентрация F-828 \ Гены	0,004	0,1	4	19
<i>TGFBI</i>	2,1 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,5
<i>RHOA</i>	1,15 $\pm$ 0,15	1,8 $\pm$ 0,15	0,83 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,05
<i>RHOC</i>	3,8 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,4	2,46 $\pm$ 0,15
<i>ROCK</i>	2,9 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,2
<i>SMAD</i>	2,2 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2	12 $\pm$ 1

Повышенная экспрессия этих генов предполагает индукцию фиброза. В таблице 3.1. представлены данные об измененной экспрессии генов *RHOA*, *RHOC*, *ROCK* и *SMAD2* в ФЛЭЧ, обработанных F-828 в течение 48 ч. Усиление экспрессии *RHOC*, *ROCK* и *SMAD2* начинается даже при очень низких концентрациях фуллерена. Однако экспрессия *RHOA* снижается при 4 и 19 мкМ F-828. Также наблюдается нелинейная зависимость уровня мРНК *SMAD2* от концентрации фуллерена в среде. Уровень экспрессии *SMAD2* повышается в присутствии F-828 в концентрациях 0,004, 0,1 и 19 мкМ.

Повышение уровня синтеза АФК в клетках в ответ на связывание АФК носит, вероятно, сложный характер. Клеткам необходимо определенное количества АФК для того, чтобы функционировать. АФК служат сигнальными молекулами и могут регулировать различные биологические и физиологические процессы, в частности, окисляя остатки цистеина в белках, меняя их ферментативную активность [153]. Фуллерены, как очень эффективные антиоксиданты, поглощают слишком большое количество АФК, и в клетках начинает наблюдаться сильный недостаток активных форм кислорода. Чтобы скомпенсировать действие антиоксиданта, клетки начинают эффективнее синтезировать новые АФК. Что может приводить к неблагоприятным отдаленным последствиям – в частности, для фибробластов - к развитию фиброза.

### **3.7. Влияние водорастворимых производных фуллерена на МСК человека**

Мезенхимальные стволовые клетки – это мультипотентные стволовые клетки, которые могут быть выделены из различных тканей. Они обладают способностью дифференцироваться в адипоциты (адипогенная дифференцировка), остеоциты (остеогенная дифференцировка) и остеобласты (миогенная дифференцировка). В связи с этим МСК имеют широкий спектр потенциального воздействия в регенеративной медицине.

Исследовано влияние производных фуллерена на МСК человека, выделенные из жировой ткани больных аденокарциномой молочной железы, полученной из ФГБУ “РОНЦ им. Блохина” РАМН (г. Москва) в течение 60 мин после операции по резекции опухоли.

#### **3.7.1. Влияние водорастворимых производных фуллерена на дифференцировку МСК**

В связи с возможностью дифференцировки в различные типы тканей применение МСК в регенеративной медицине широко. Восстановление мышечной ткани при мышечных заболеваниях или после полученных травм - сложный процесс. Если потеряно значительное количество мышечной ткани, естественного потенциала регенерации скелетных мышц недостаточно, чтобы полностью заполнить дефектный участок [154]. Кроме того, ослабление мышц, потеря мышечной ткани, ухудшение подвижности наблюдаются при миодистрофиях, являющихся генетически гетерогенными заболеваниями, наиболее распространенными из которых являются мышечная дистрофия Дюшенна, мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина и миотоническая дистрофия [154]. Лечения этих заболеваний не существует, современные подходы коррекции - физиотерапия, противосудорожные препараты, иммунодепрессанты и стероиды. Терапевтическим потенциалом для замены поврежденной ткани обладает клеточная терапия, что делает стволовые клетки важным инструментом в регенеративной медицине миодистрофий и посттравматических повреждений. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают способностью к самообновлению и дифференцировке и, таким образом, являются ценным источником для замены больных или поврежденных органов. Легкость выделения, высокая миграционная способность, относительно высокая скорость

экспансии и отсутствие аллогенных реакций после трансплантации делают их привлекательным кандидатом в регенеративной медицине [156, 157].

Миогенная дифференцировка МСК происходит благодаря активации нескольких специфических миогенных факторов транскрипции, включая MYOD, MYF5, миогенин и MRF4. Эти факторы также участвуют в посттравматическом восстановлении мышечной ткани. [157-158] Миогенная дифференцировка регулируется различными биохимическими путями. В том числе, показано, что аутофагия играет важную роль в механизме миогенной дифференцировки МСК [70]. В настоящее время ведется интенсивный поиск препаратов, инициирующих миогенную дифференцировку стволовых клеток.

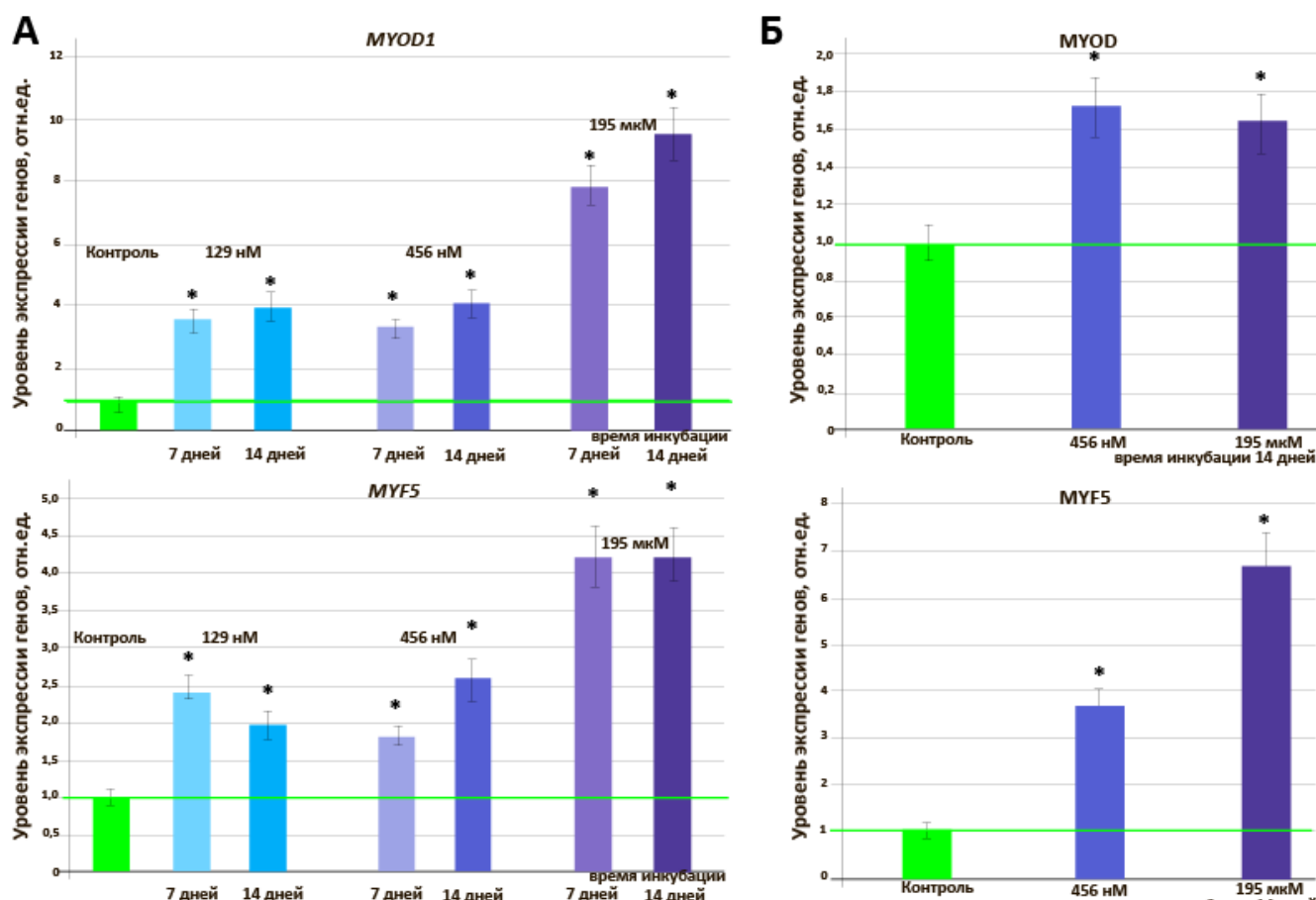
Для исследования влияния водорастворимых производных фуллерена на дифференцировку МСК клетки инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 7 и 14 дней. Оказалось, что производные фуллерена с фосфорсодержащими заместителями вызывают изменение строения клеток при длительном культивировании – клетки изменяли морфологию. Исследовали действие группы фуллеренов с фосфорсодержащими заместителями на дифференцировку МСК во времени и в разных концентрациях. Показали, что исследуемые соединения в разных концентрациях повышают экспрессию маркеров миогенной дифференцировки (*MYOD*, *MYF5*, *MYOG*, *MRF4*), не изменяя при этом экспрессии генов остеогенной и адипогенной дифференцировки. Для более тщательного исследования выбрано производное фуллерена, которое в наибольшей степени изменяло уровень экспрессии генов миогенной дифференцировки – F-827. Экспрессию маркеров дифференцировки изучили на уровне мРНК и белка.

### **3.7.1.1. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MYOD**

Транскрипционный фактор MYOD контролирует экспрессию ранних генов при дифференцировке - молекул адгезии, клеточного матрикса; промежуточных генов факторов транскрипции; и поздних генов, кодирующих белки цитоскелета [96]. MYOD активировать активность транскрипции в ранее «молчащих» локусах, действуя как ген «мастер-переключатель», что способствует превращению клеток разных линий и стадий дифференцировки в клетки скелетных мышц.

Данные, полученные в ходе работы, свидетельствуют о постоянно повышенном уровне мРНК *MYOD1* в процессе дифференцировки, что совпадает с ранее полученными данными [100,101]. Уровень экспрессии гена *MYOD1* через 7 и 14 дней возрастает в 3 – 4 раза при культивировании МСК с фуллереном F-827 в концентрациях 129 нМ и 456 нМ, и в 8 - 9,5 раз при культивировании МСК с F-827 в микромолярной концентрации (195 мкМ), (рис. 90). Таким образом, при дифференцировке МСК ген *MYOD1* активен на протяжении двух недель, что позволяет ему связываться с регуляторными элементами генов, экспрессирующимися на ранних и поздних стадиях дифференцировки [102].

Уровень экспрессии белка MYOD повышается не столь значительно – в 1,7 – 1,8 раз при культивировании МСК в течение 14 дней с фуллереном F-827 в концентрации 456 нМ и 195 мкМ (рис. 90). Не столь значительное повышение концентрации белка MYOD по сравнению с высоким уровнем экспрессии гена *MYOD1* связано, по-видимому, с его быстрой деградацией после синтеза, что согласуется с ранее полученными данными [100]. Деградация MYOD может быть связана с прогрессией клеточного цикла [94] и регулироваться лизином 133, который играет решающую роль в убиквитинации и деградации MYOD.



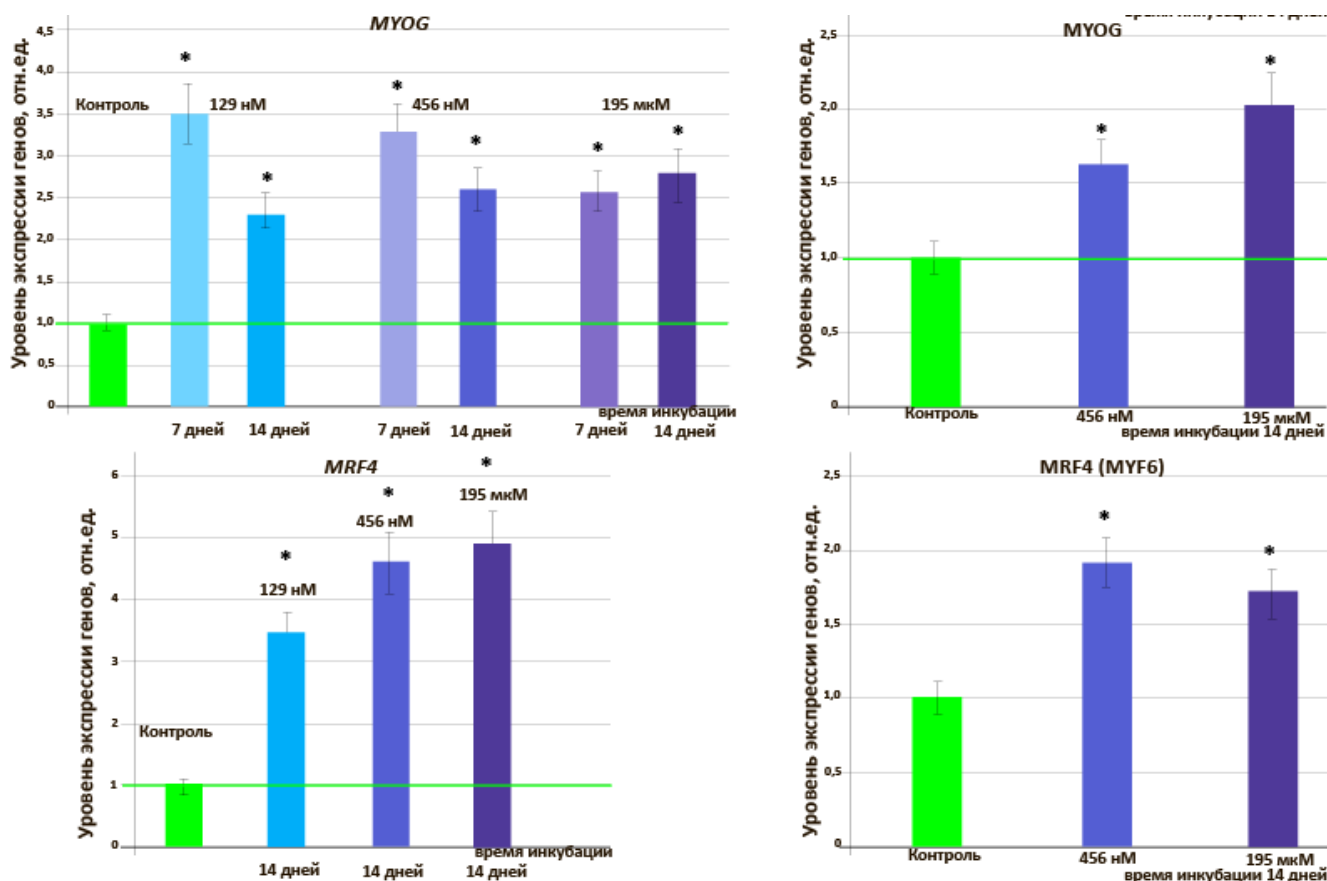


Рисунок 90. А - Уровень экспрессии генов миогенной дифференцировки в МСК при действии F-827, концентрации и время воздействия указаны на рисунке. Количество РНК гена - среднее значение (три эксперимента) экспрессии гена в присутствии фуллерена по отношению к экспрессии этого же гена в контроле (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген TBP. Б. Гистограммы распределения медиан значений сигналов FL1 - белок в клетках, обработанных F-827, концентрации и время воздействия указаны на рисунке. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0.005$ , непараметрический U-тест.

### 3.7.1.2. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MYF5

Уровень экспрессии гена *MYF5*, играющего ключевую роль в миогенезе, через 7 и 14 дней возрастает в 1,8 – 2,6 раза при культивировании МСК с фуллереном F-827 в пико- и наномолярных концентрациях (129 пМ и 456 нМ), и в 4 - 4,5 раз при культивировании МСК с фуллереном F-827 в микромолярной концентрации (195 мкМ), (рис. 90 А). Таким образом, при действии фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ на МСК активность гена остается высокой в течение 14 дней.

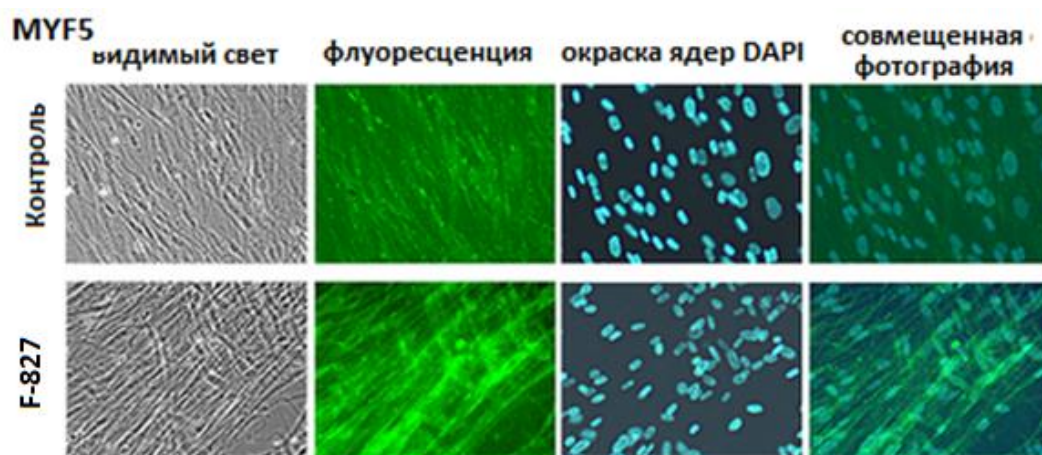
Уровень экспрессии белка MYF5 возрастает в 3,5 – 4 раза и при культивировании МСК в течение 14 дней с фуллереном F-827 в концентрации 456 нМ и в 6,5 – 7 раз при



культивировании МСК с фуллереном F-827 в концентрации и 195 мкМ (рис. 90 Б). Анализ иммуногистохимического окрашивания МСК антителами к MYF5 через 14 суток культивирования в присутствии фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ показал усиление экспрессии белка MYF5 и в ядре, и в цитоплазме клеток (рис. 91).

Ген *MYF5* активируется в ранний период дифференцировки, однако отмечается, что уровень мРНК может сохраняться повышенным во время процесса дифференцировки МСК, уменьшаясь только в поздний период дифференцировки [98,99].

В ряде работ отмечается снижение уровня экспрессии белка MYF5 при прогрессии клеточного цикла в результате протеолитической деградации [97], что связывается с прекращением пролиферативных сигналов. Однако, фуллерен F-827 имеет длительный период выведения из МСК, что способствует постоянной инициации дифференцировки и повышению экспрессии MYF5. Кроме того, показано, что в отличие от процесса миогенной дифференцировки у мышей, где повышенная экспрессия белка MYOD считается отличительной особенностью дифференцировки, MYOD1 оказался обнаружен в ~ 5% стволовых клеток скелетных мышц человека, в то время как MYF5 обнаружен в ~ 90% клеток [98]. Перекрестные взаимодействия между генами также отличаются у человека и мыши - нокдаун MYOD1 в стволовых клетках скелетных мышц человека не влияет на экспрессию MYF5, а отмечается положительное регуляторное взаимодействие, при котором MYF5 прямо или косвенно усиливает экспрессию MYOD1 [101], тогда как в стволовых клетках у мышей нокдаун MYOD1 приводит к увеличению экспрессии белка MYF5 [102].



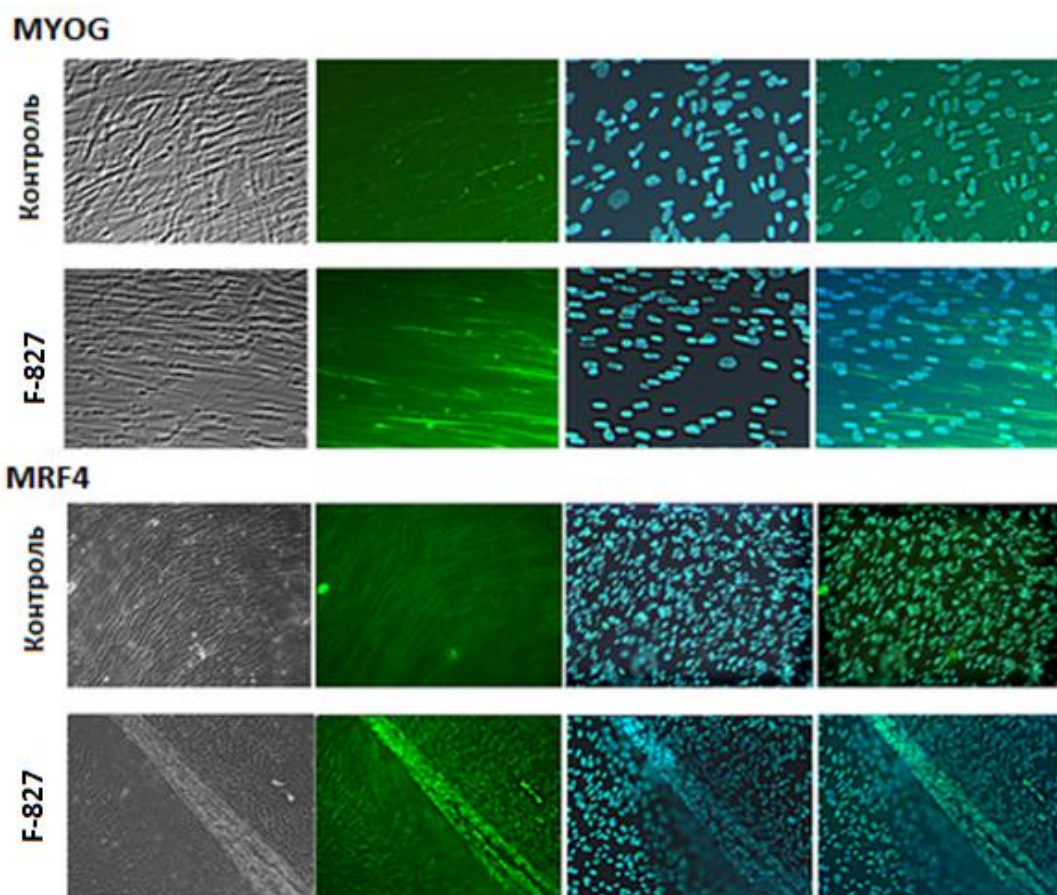


Рисунок 91. Уровень экспрессии и локализация транскрипционных факторов миогенной дифференцировки через 14 суток после воздействия фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ в МСК. Флуоресцентная микроскопия, х40, слева направо: видимый свет, клетки обрабатывали антителами к соответствующим белкам, окраска ядер DAPI, совмещенная фотография.

### 3.7.1.3. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MYOG

Как *in vitro*, так и *in vivo* экспрессия миогенина предшествует терминальной дифференцировке стволовых клеток и контролирует синтез белков, составляющих сократительный аппарат клеток [103]. Уровень экспрессии гена *MYOG* через 7 и 14 дней возрастает в 2,3 – 3,5 раза при культивировании МСК с фуллереном F-827 в концентрациях (129 пМ, 456 нМ, 195 мкМ), (рис. 90 А). Уровень экспрессии белка MYOG возрастает в 1,5 – 2 раза при культивировании МСК в течение 14 дней с фуллереном F-827 в концентрации 456 нМ и 195 мкМ (рис. 90 Б). В ряде работ отмечается что период полувыведения мРНК миогенина длиннее периода полувыведения белка миогенина [104], что, видимо, наблюдается и при действии фуллерена F-827 на МСК. Анализ

иммуногистохимического окрашивания МСК антителами к MYOG через 14 суток культивирования в присутствии фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ показал усиление экспрессии белка MYOG и в ядре, и в цитоплазме клеток (рис. 91). Миогенин играет ключевую роль в миогенезе у мышей, однако, у человека существуют механизмы компенсации, способствующие миогенной дифференцировке стволовых клеток в отсутствие экспрессии миогенина [94].

#### **3.7.1.4. Влияние водорастворимого производного фуллерена F-827 на экспрессию транскрипционного фактора MRF4**

MRF4 является маркером позднего времени мышечной дифференцировки, MRF4 отвечают за терминальную дифференцировку мышечных волокон [157]. Уровень экспрессии гена *MRF4* через 14 дней возрастает в 3,5 раза при культивировании МСК с фуллереном F-827 в концентрации 129 пМ и в 4,6 – 5 раз при культивировании МСК с фуллереном F-827 в концентрациях 456 нМ и 195 мкМ (рис. 90 А). Уровень экспрессии белка MRF4 возрастает в 1,7 - 2 раза при культивировании МСК в течение 14 дней с фуллереном F-827 в концентрации 456 нМ и 195 мкМ (рис. 90 Б).

Анализ иммуногистохимического окрашивания МСК антителами к MRF4 через 14 суток культивирования в присутствии фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ показал усиление экспрессии белка MYF5 в части клеток, формирующих кластеры миотуб (рис. 91), что свидетельствует о формировании мышечной ткани [92].

Таким образом, показано, что фуллерен F-827 в диапазоне концентраций 129 пМ - 195 мкМ является стимулятором миогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека.

#### **3.7.1.5. Фуллерен F-827 снижает или не изменяет уровень экспрессии генов адипогенной и остеогенной дифференцировки**

Поскольку фуллерен F-827 стимулирует гены миогенной дифференцировки, исследовали уровень экспрессии генов адипогенной и остеогенной дифференцировки в МСК в присутствии фуллерена F-827.

Показали, что при культивировании МСК в присутствии фуллерена F-827 в концентрациях 456 нМ и 195 мкМ в течение 14 суток не происходит активации экспрессии транскрипционных факторов и маркерных генов остеогенной дифференцировки BMP2, BMP4, RUNX2, SPP1, OCN ни на уровне РНК (рис. 92), ни на уровне белка (рис. 92Б-Г),

уровень остеокальцина при этом снижается (рис. 92Б). Анализ экспрессии щелочной фосфатазы, маркирующей ранние стадии остеогенной дифференцировки, указывает на сниженный остеогенный потенциал МСК в присутствии фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ (время культивирования 14 суток, рис. 92Г).

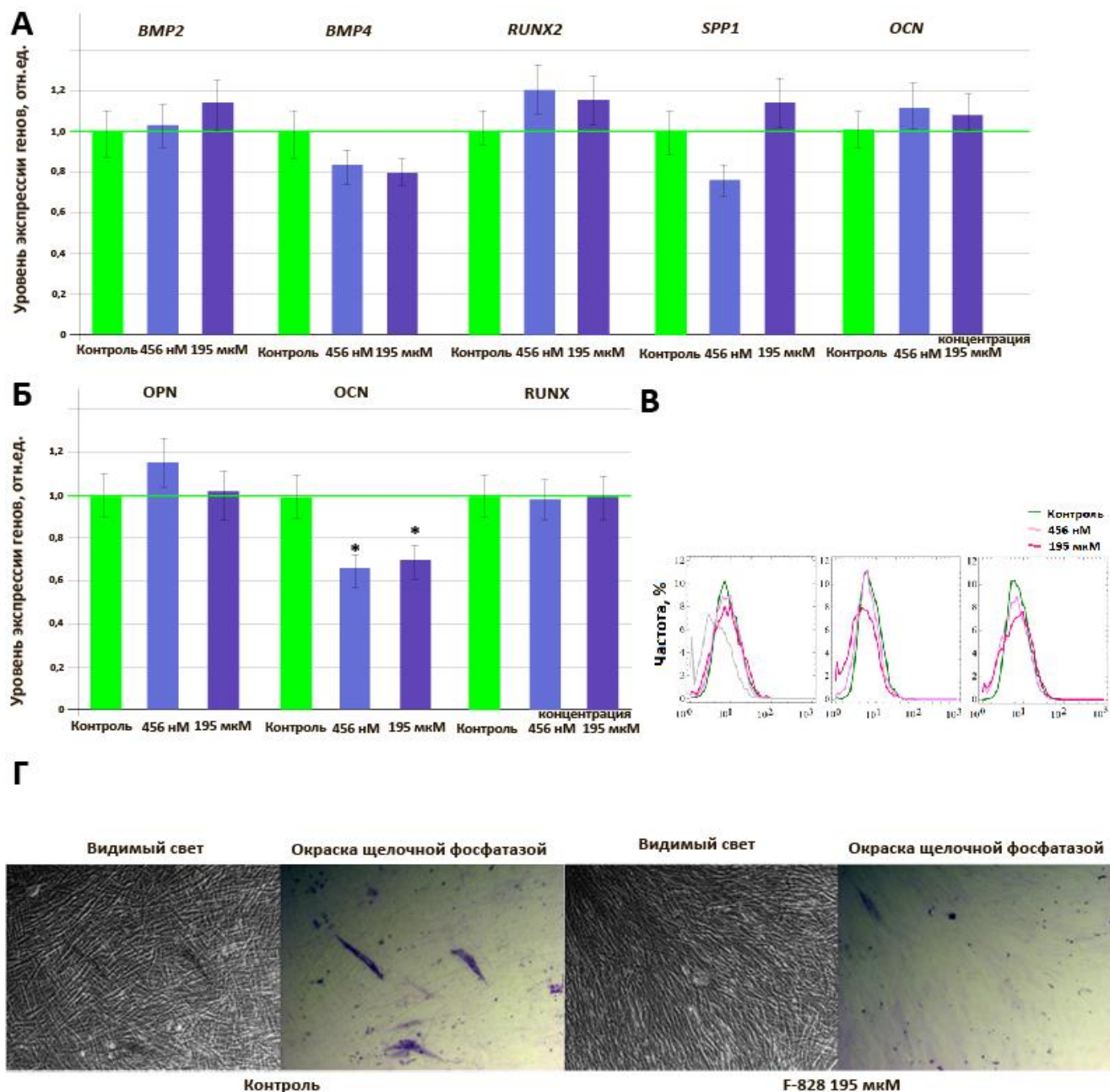
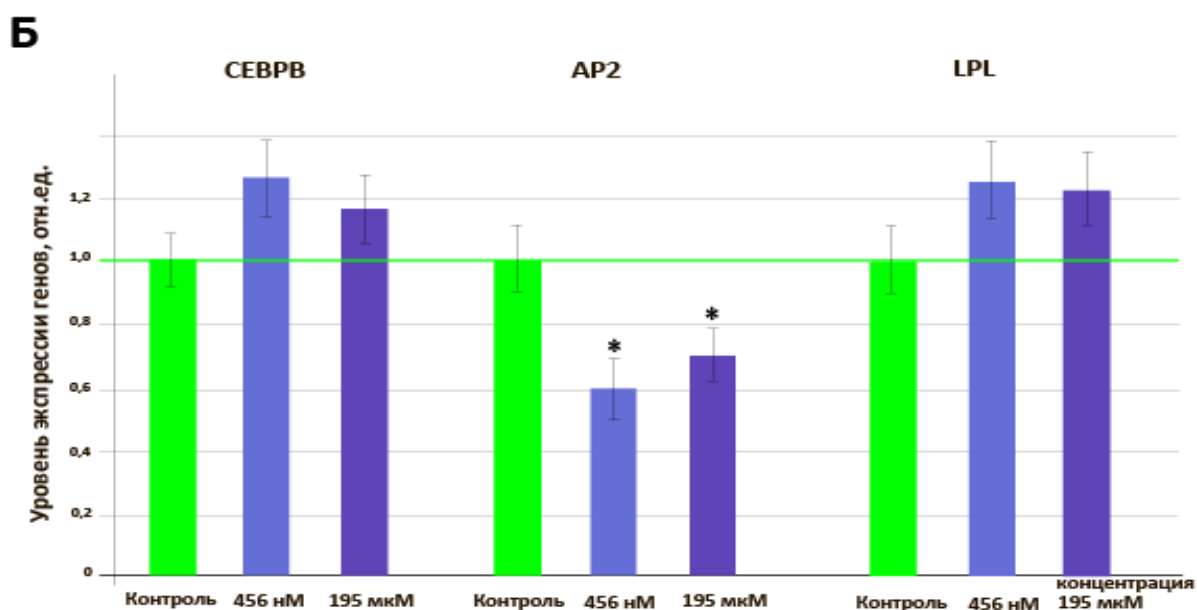
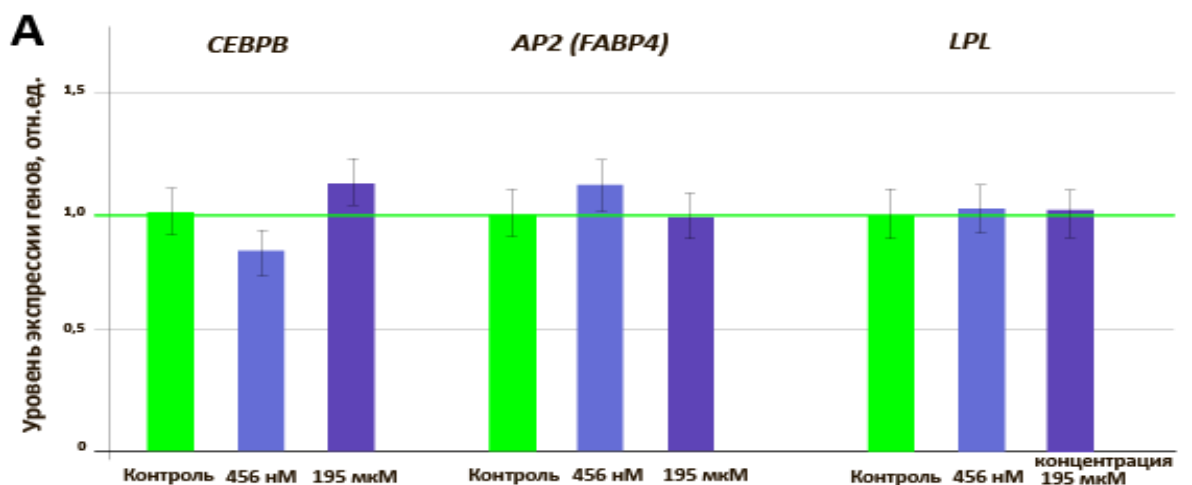


Рисунок 92. А - Уровень экспрессии генов остеогенной дифференцировки в МСК при действии F-827 в концентрации 195 мкМ (14 суток). Количество РНК гена - среднее значение (три эксперимента) экспрессии гена в присутствии фуллерена по отношению к экспрессии этого же гена в контроле (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген ТВР. Б. Гистограммы распределения медиан значений сигналов FL1 – соответствующий белок в клетках, обработанных F-827 в концентрации 195 мкМ (14 суток). (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,



$p < 0.005$ , непараметрический U-тест. В – Распределение клеток по интенсивности сигнала антител. Г - Экспрессия щелочной фосфатазы, маркирующей ранние стадии остеогенной дифференцировки через 14 суток после воздействия фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ в МСК. Флуоресцентная микроскопия,  $\times 40$ , слева направо: видимый свет, клетки обрабатывали щелочной фосфатазой.

Аналогично, при культивировании МСК в присутствии фуллерена F-827 в концентрациях 456 нМ и 195 мкМ в течение 14 суток не происходит и активации экспрессии генов адипогенной дифференцировки CEBPB, LPL, AP2 (FABP4) [88] ни на уровне РНК (рис. 93А), ни на уровне белка (рис. 93 Б-Г), уровень FABP4 при этом снижается (рис. 93Б). Окрашивание МСК с помощью липофильного красителя RedOil, маркирующего внутриклеточные нейтральные липиды также показало сниженный адипогенный потенциал МСК в присутствии фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ (время культивирования 14 суток, рис. 93Г).



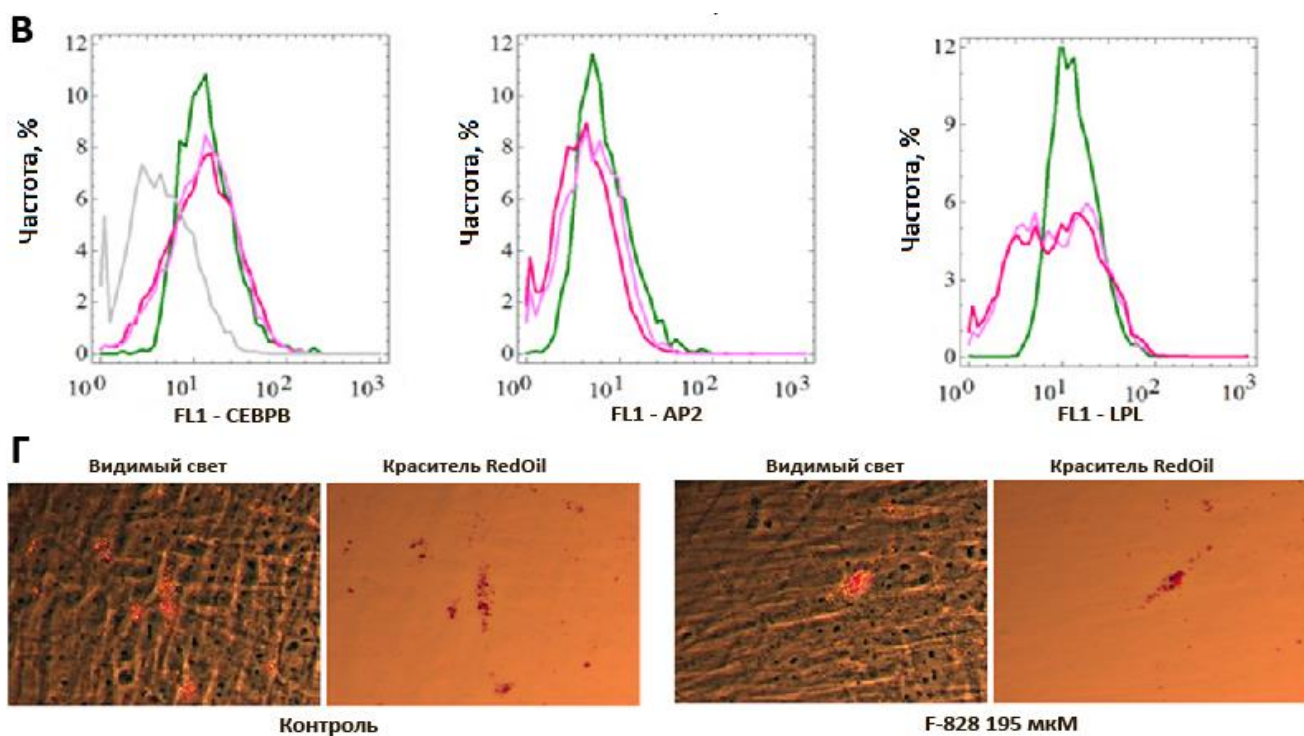


Рисунок 93. Рисунок 5. А - Уровень экспрессии генов адипогенной дифференцировки в МСК при действии F-827 в концентрации 195 мкМ (14 суток). Количество РНК гена - среднее значение (три эксперимента) экспрессии гена в присутствии фуллерена по отношению к экспрессии этого же гена в контроле (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген ТВР. Б. Гистограммы распределения медиан значений сигналов FL1 – соответствующий белок в клетках, обработанных F-827 в концентрации 195 мкМ (14 суток). (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0.005$ , непараметрический U-тест. В – Распределение клеток по интенсивности сигнала антител. Г - Экспрессия красителя RedOil, маркирующего внутриклеточные нейтральные липиды через 14 суток после воздействия фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ в МСК. Флуоресцентная микроскопия,  $\times 40$ , слева направо: видимый свет, RedOil.

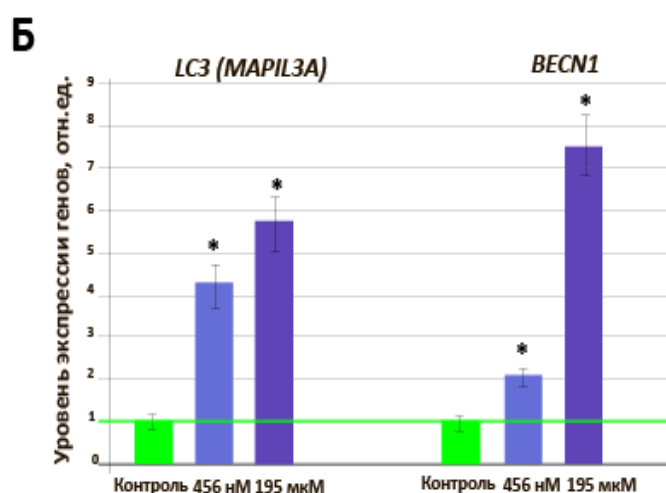
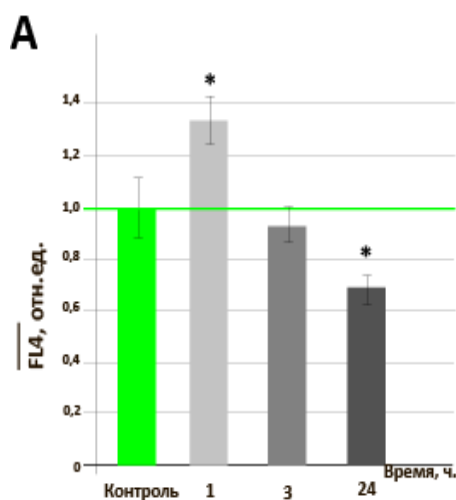
Таким образом, показано, что фуллерен F-827 в диапазоне концентраций 456 нМ - 195 мкМ не изменяет уровень или снижает экспрессию генов факторов, определяющих остеогенную и адипогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток человека.

### 3.7.1.6. Способность фуллерена F-827 ингибировать активные формы кислорода способствует миогенной дифференцировке МСК

Благодаря структурным особенностям фуллерен F-827 может являться акцептором свободных радикалов.  $H_2O_2$  и другие активные формы кислорода имеют большое значение для функционирования клеток. При физиологических условиях АФК регулируют клеточный цикл, активность протеинкиназ и генную экспрессию.

Увеличение синтеза АФК приводит к развитию окислительного стресса в клетках [134]. Показано, что эффективные антиоксиданты способны снижать вызванную окислительным стрессом задержку дифференцировки стволовых клеток в миогенном направлении путем удаления активных форм кислорода [162].

Для изучения возможного влияния фуллерена F-827 на уровень АФК в клетках, использовали реагент  $H_2DCFH-DA$  (2,7 - dichlorofluoresceindiacetate или 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат), он проникает через мембрану клеток и подвергается деацетилированию внутриклеточными эстеразами [163]. В цитозоле нефлуоресцирующий дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH) является чувствительным внутриклеточным маркером окислительного стресса при его окислении до дихлорфлуоресцеина (DCF) различными радикалами АФК, окисление DCFH неспецифично и появление сигнала DCF в клетках отражает общий уровень АФК [164]. Детекцию АФК осуществляли методом проточной цитометрии. При добавлении фуллерена F-827 к МСК в концентрации 195 мкМ через 1 ч уровень АФК в клетках возрастает на 20% - 30%, через 3 ч снижается на 5- 10%, через 24 ч снижается на 30% по сравнению с контролем (рис. 94 А). Снижение уровня АФК в МСК связано, видимо, с проникновением через 24 ч фуллерена F-827 в цитоплазму МСК.



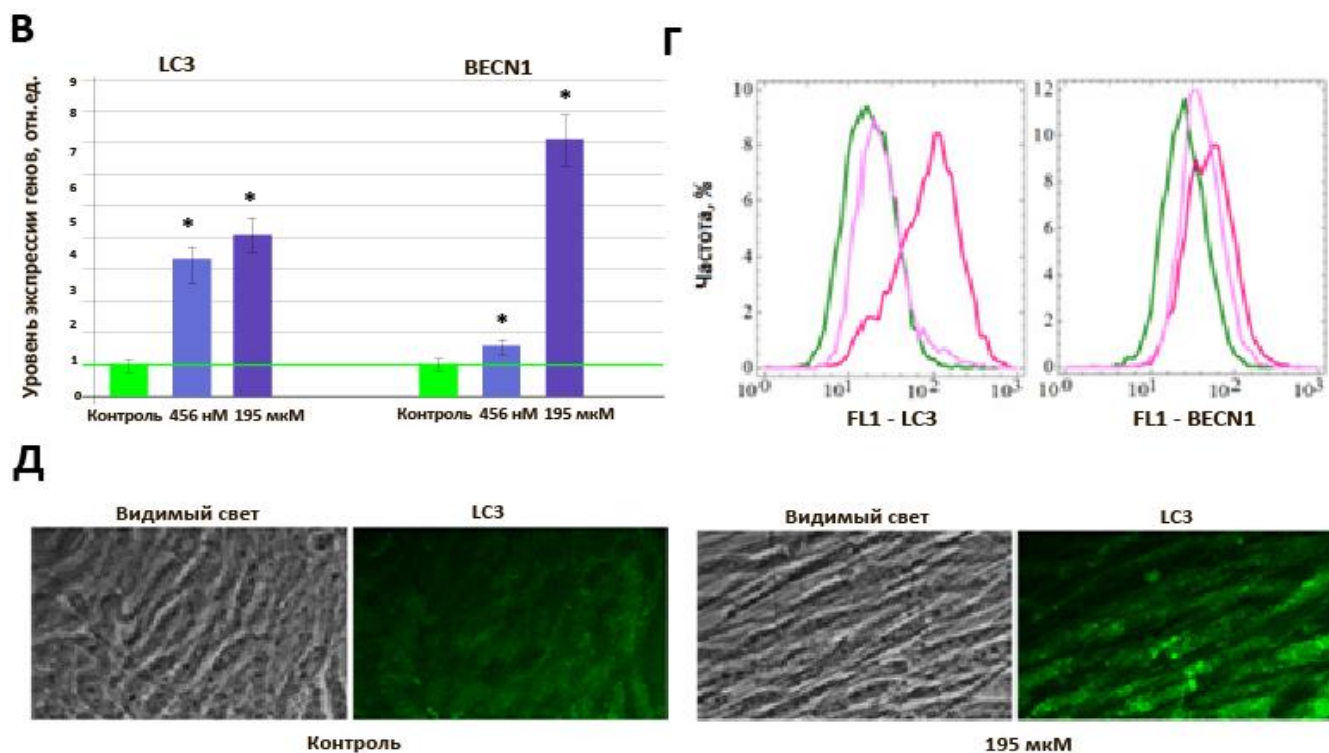


Рисунок 94. А Гистограммы, отражающие зависимость уровня АФК в клетках от времени инкубирования F-827 в концентрации 195 мкМ в клетках. по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля, зеленая линия ( $p < 0.05$ ). Б - Уровень экспрессии генов аутофагии в МСК при действии F-827 в концентрации 195 мкМ (14 суток). Количество РНК гена - среднее значение (три эксперимента) экспрессии гена в присутствии фуллерена по отношению к экспрессии этого же гена в контроле (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген ТВР. В. Гистограммы распределения медиан значений сигналов FL1 – соответствующий белок в клетках, обработанных F-827 в концентрации 195 мкМ (14 суток). (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0.005$ , непараметрический U-тест. Г – Распределение клеток по интенсивности сигнала антител. Д - Уровень экспрессии и локализация LC3 через 14 суток после воздействия фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ в МСК. Флуоресцентная микроскопия, х40, слева направо: видимый свет, флуоресценция LC3.

Вероятно, одним из факторов, способствующих миогенной дифференцировке МСК в присутствии фуллерена F-827, является его способность связывать активные формы кислорода, что препятствует дифференцировке МСК в адипогенном направлении.

### 3.7.1.7. Аутофагия способствует миогенной дифференцировке МСК

Миогенная дифференцировка регулируется разными сигнальными каскадами. Показано, что в регулировке миогенной дифференцировки участвуют факторы роста



TGF- $\beta$  и FGF, транскрипционные факторы STAT2 и STAT3 [165, 166]. Кроме того, одним из регуляторов миогенной дифференцировки является активация процесса аутофагии в МСК. Процесс аутофагии опосредуется генами LC3 и BECN1 [70]. Показали, что при культивировании МСК в присутствии фуллерена F-827 в концентрации 456 нМ в течение 7 суток происходит увеличение экспрессии генов LC3 и BECN1 в 4,2 и 3 раза, соответственно, а в концентрации 195 мкМ – соответственно, в 5,7 и 7,5 раз (рис. 94В, Г). Уровень экспрессии белков LC3 и BECN1 также возрастает в 4,2 и 1,5 раза, соответственно, а в концентрации 195 мкМ – соответственно, в 5 и 8 раз (рис. 94 В, Г). Полученные данные подтвердили с помощью иммуногистохимии – при окрашивании МСК антителами к LC3 возрастает количество LC3 – позитивных клеток и увеличивается уровень флуоресценции антител через 14 суток культивирования в присутствии фуллерена F-827 в концентрации 195 мкМ (рис. 94 Д).

Таким образом, еще одним фактором, способствующим активации миогенной дифференцировки в МСК фуллереном F-827 является стимуляция процесса аутофагии в клетках.

Таким образом, при длительном культивировании МСК (7-14 дней) в присутствии фуллерена F-827 происходит детерминирование клеток в сторону миогенной дифференцировки. Повышается уровень экспрессии генов транскрипционных факторов, определяющих миогенную дифференцировку: *MYOD1*, *MYOG*, *MYF5*, *MRF4* и снижается или не изменяется уровень экспрессии генов факторов, определяющих остеогенную дифференцировку: *BMP2*, *BMP4*, *RUNX2*, *SPP1*, *OCN* и адипогенную дифференцировку: *CEBPB*, *LPL*, *AP2 (FABP4)*. Одним из факторов, способствующих миогенной дифференцировке МСК в присутствии фуллерена F-827, является способность этого производного связывать активные формы кислорода, что препятствует дифференцировке МСК в адипогенном направлении. Еще одним фактором, способствующим активации миогенной дифференцировки в МСК фуллереном F-827, является стимуляция процесса аутофагии в клетках.

### **3.8. Влияние водорастворимых производных фуллерена C60 на раковые клетки линии MCF7.**

MCF7 – это клеточная линия аденокарциномы молочной железы. Это распространенная клеточная модель для изучения воздействия различных соединений на раковые клетки.

Эти клетки получены из коллекции клеточных культур ФГБУ «МГНЦ» РАМН. На поверхности клеток MCF7 присутствовали характерные молекулы эстрогенового рецептора (ER+) [167].

Так как исследуемое производное F-243 хорошо растворимо в воде и обладает собственной флуоресценцией в красной области спектра с максимумом излучения  $\lambda = 620$  нм в водных растворах и в самих клетках, то частицы F-243 можно детектировать внутри клеток без присоединения каких-либо флуоресцентных меток (рис. 95.). Показали, что исследуемое соединение проникает в раковые клетки MCF7 через 3-24 ч после начала инкубации.

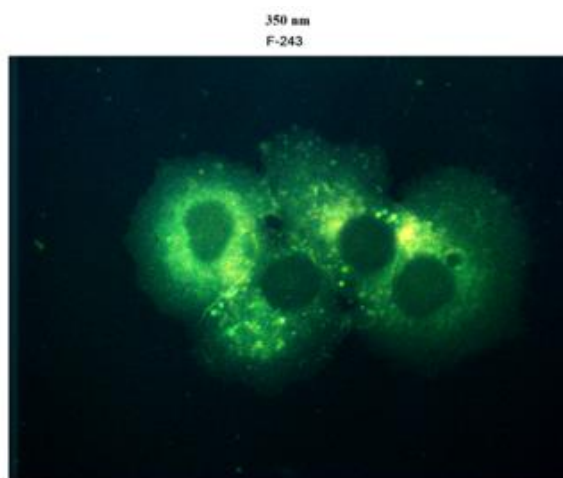


Рисунок 95. Клетки MCF7, инкубированные с фуллереном F-243 в концентрации 15 нМ в течение 24 ч. Флуоресцентная микроскопия.

### **3.8.1. Водорастворимое производное фуллерена C<sub>60</sub> F-243 вызывает увеличение уровня АФК в клетках MCF7, повышая экспрессию NOX4-оксидазы.**

Из всех исследуемых соединений лишь одно – F-243 – оказывало токсическое действие на раковые клетки в более низких, чем для ФЛЭЧ, концентрациях, поэтому оно исследовано наиболее подробно.

Исследован уровень синтеза активных форм кислорода (АФК) в клетках, инкубированных с производным фуллерена F-243. При физиологических условиях АФК регулируют клеточный цикл, экспрессию генов, а также активность протеинкиназ.

Для изучения влияния исследуемого производного на изменение внутриклеточного уровня АФК использовали H<sub>2</sub>DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). Показано, что, несмотря на снижение уровня АФК в первые 15 мин, количество АФК

значительно возрастает через 3 ч после начала инкубации. Похожий эффект уже наблюдался на клетках ФЛЭЧ в случае другого исследуемого производного – F-828. Так как основным ферментом, синтезирующим АФК в клетках являются NADPH-оксидазы, а именно NOX4, экспрессия которой регулируется на уровне транскрипции гена, исследовали экспрессию NOX4 под действием исследуемого производного.

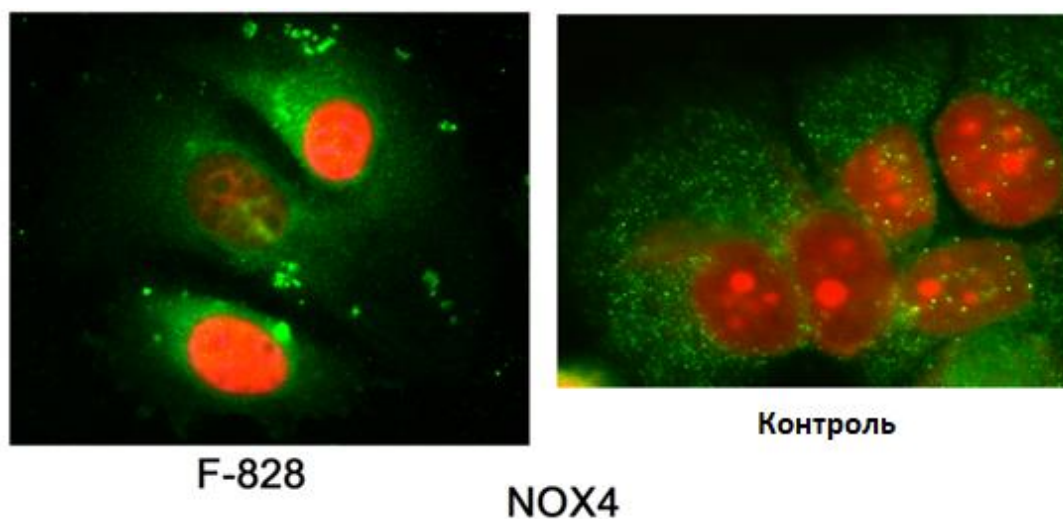


Рисунок 96. Клетки MCF7, инкубированные с исследуемым производным F-243 в концентрации 15 нМ в течение суток, окрашенные FITC-мечеными антителами к NOX4. Флуоресцентная микроскопия, увеличение x40.

Показано, что в клетках линии MCF7 исследуемое соединение F-243 в концентрации 15 нМ вызывает увеличение количества мРНК NOX4-оксидазы на 12% через 3 ч после начала воздействия. Через 24 ч после начала инкубации уровень мРНК NOX4 возрастает на 82%, а через 72 ч - в 3,9 раза. Это подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии. На рисунке 96 представлена фотография клеток, инкубированных с исследуемым производным и контрольных клеток, окрашенных антителами к NOX4. Таким образом, повышение количества АФК связано с повышенной экспрессией гена NOX4, как и предполагалось.

Таким образом, исследованное производное F-243 не только не является эффективным антиоксидантом при добавлении его к среде культивирования клеток MCF7, но и активирует синтез АФК в раковых клетках, что может приводить к окислительному повреждению ДНК раковых клеток, и, как следствие, к их гибели.

### 3.8.2. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают повреждения ДНК клеток MCF7.

Как известно, повышенный уровень АФК в клетке ведет к повреждениям ДНК. Одним из типичных и наиболее распространенных окислительных повреждений ДНК активными формами кислорода является окисление гуанина, входящего в состав дезоксигуанозина, до 8-оксо-2'-дезоксигуанозина [112]. Показали, что уровень маркера окислительных повреждений 8-oxodG в клетках, инкубированных с F-243, возрастает на 10% и 36% по сравнению с контролем через 3 и 24 ч, соответственно. Через трое суток уровень 8-oxodG снижался на 17% по сравнению с контролем.

Накопление окислительных повреждений может приводить к повышению количества двуцепочечных разрывов в ДНК ядер клеток, что представляет наибольшую опасность для жизнедеятельности клетки. Исследовали, ведет ли окислительный стресс, вызванный производным фуллерена F-243, к появлению двуцепочечных разрывов хроматина.

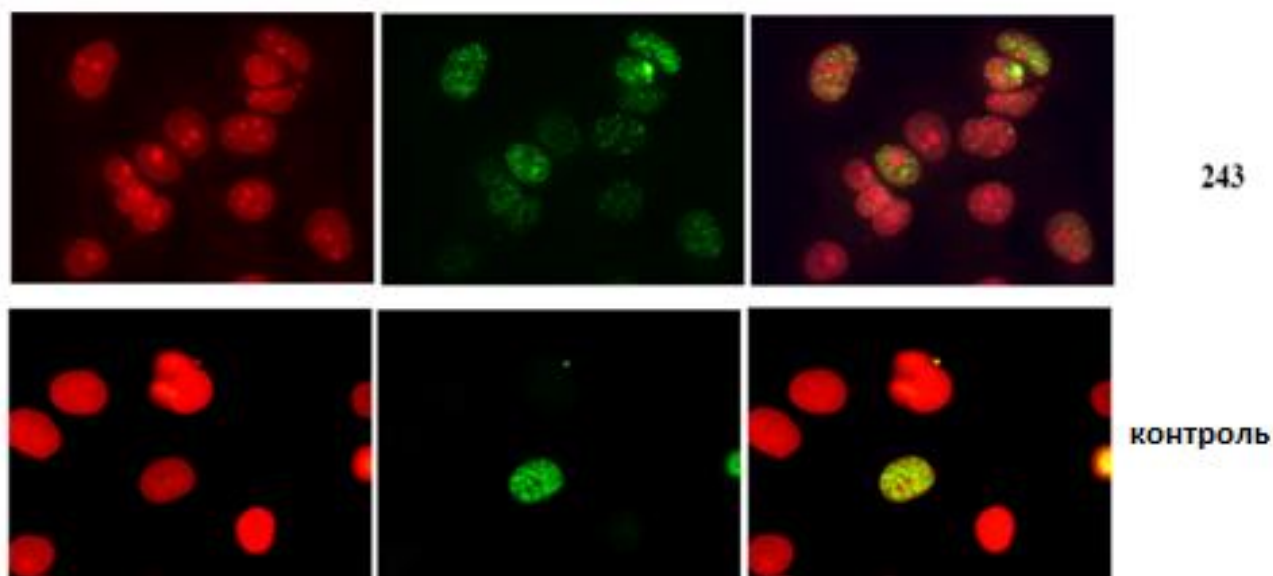


Рисунок 97. Клетки MCF7, инкубированные с исследуемым производным в концентрации 15 нм в течение суток и окрашенные антителами к фосфорилированной форме гистона H2AX. Ниже представлены контрольные клетки, окрашенные теми же антителами к H2AX. Флуоресцентная микроскопия, увеличение x40.

Двуцепочечные разрывы хроматина в MCF7 выявляли с помощью антител к гистону  $\gamma$ H2AX, фосфорилированному по серину-139. В популяции контрольных клеток MCF7 приблизительно 5 % клеток имеют ядра с одним или несколькими

гамма фокусами на ядро. В ядрах примерно 2 % клеток присутствуют множественные гамма-фокусы, распределенные по объему ядра [170]. При действии водорастворимого фуллерена F-243 в популяции MCF7 в 5-7 раз увеличивается количество клеток, содержащих множественные двуцепочечные разрывы (рис. 97).

### **3.8.3. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают остановку клеточного цикла и снижение активности систем репарации в MCF7**

Известно, что повреждения ДНК в клетке могут репарироваться с остановкой клеточного цикла. [171]. Если системы репарации ДНК в клетках не устранят образовавшиеся разрывы ДНК, клетки могут активировать программу запрограммированной клеточной гибели (апоптоз).

BRCA1 - это ядерный белок, который принимает участие в регуляции клеточного цикла и репарации двуцепочечных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации [172, 173]. Через час после добавления производного фуллерена F-243 к среде культивирования клеток возрастает экспрессия гена *BRCA1* в 2,9 раз, однако через 24-72 ч после добавления производного фуллерена F-243 уровень экспрессии гена *BRCA1* снижается ниже контрольных значений.

Уровень мРНК киназы ATM, отвечающей за остановку клеточного цикла, увеличивается в 2,8 раз через 3 – 72 ч. ATR - это киназа с аналогичными ATM функциями, ее количество сначала снижается на 18% через 3 ч после начала инкубации по сравнению с контролем, а затем увеличивается в 3,7 и в 2,2 раз через 24 ч и 72 ч, соответственно.

Мы исследовали влияние соединения F-243 на уровень экспрессии про- и антиапоптотических генов. Показали, что исследуемое соединение повышает количество мРНК про-апоптотического TP53 на 14% и в 4,2 раза через 3 и 24 ч после начала инкубации, соответственно. Через 72 ч после добавления исследуемого вещества к среде количество мРНК TP53 снижается до уровня контроля.

Количество анти-апоптотического белка BCL2 снижается на 6%, 26% и 10% по сравнению с контролем через 3 ч, 24 ч и 72 ч после начала инкубации с F-243, соответственно, что также свидетельствует о повышенном апоптозе.

### 3.8.4. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают снижение мембранного потенциала в митохондриях MCF7

Одним из универсальных признаков апоптоза для эукариотических организмов является нарушение работы митохондрий [174]. Выход проапоптотических белков в цитоплазму может происходить за счет разрыва митохондриальных мембран, а также за счет активации определенных каналов во внешней мембране митохондрий. Эти события сопровождаются изменением проницаемости внутренней мембраны митохондрий для протонов  $H^+$ , что приводит к изменению мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ). Изменение мембранного потенциала митохондрий можно детектировать с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием катионных липофильных красителей (митохондриальных зондов).

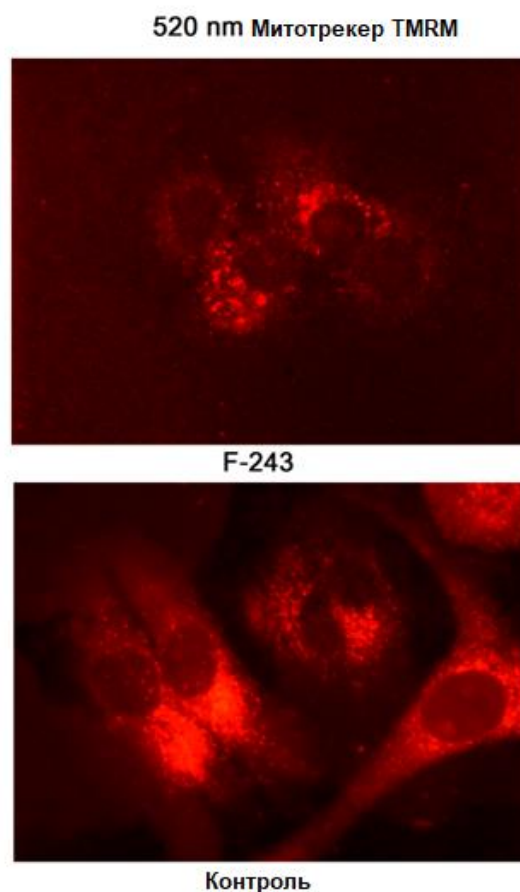


Рисунок 98. Клетки MCF7, инкубированные с исследуемым производным в концентрации 15 нм в течение суток и окрашенные митотрекером TMRM. Ниже представлены контрольные клетки, окрашенные тем же митотрекером. Флуоресцентная микроскопия, увеличение  $\times 100$ .

Для оценки мембранного потенциала митохондрий MCF7 при действии F-243 использовали метиловый (TMRM) краситель MitoTracker (максимум возбуждения 548 нм, максимум испускания 573 нм) в концентрации 200 нМ. Показано, что F-243 в концентрации 15нМ вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий клеток MCF7 (рис. 98), что свидетельствует о токсичности исследуемого соединения в отношении клеток MCF7.

### 3.8.5. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают снижение антиокислительного ответа в MCF7

Повышение гибели клеток MCF7 при действии производного фуллерена может быть связано как со снижением активности репарационных систем в клетках, так и со снижением уровня экспрессии белков – регуляторов антиокислительного ответа. В регуляции антиокислительного ответа клеток принимают участие транскрипционные факторы NRF2 и PPARG2. NRF2-антиокислительный ответ направлен на уничтожение активных форм кислорода, образующихся в клетке под действием внешних факторов, и усиление работы антиоксидантных систем клетки. В норме транскрипционный фактор NRF2 в клетке находится в инактивированном состоянии за счет образования комплекса с белком цитоскелета KEAP1.

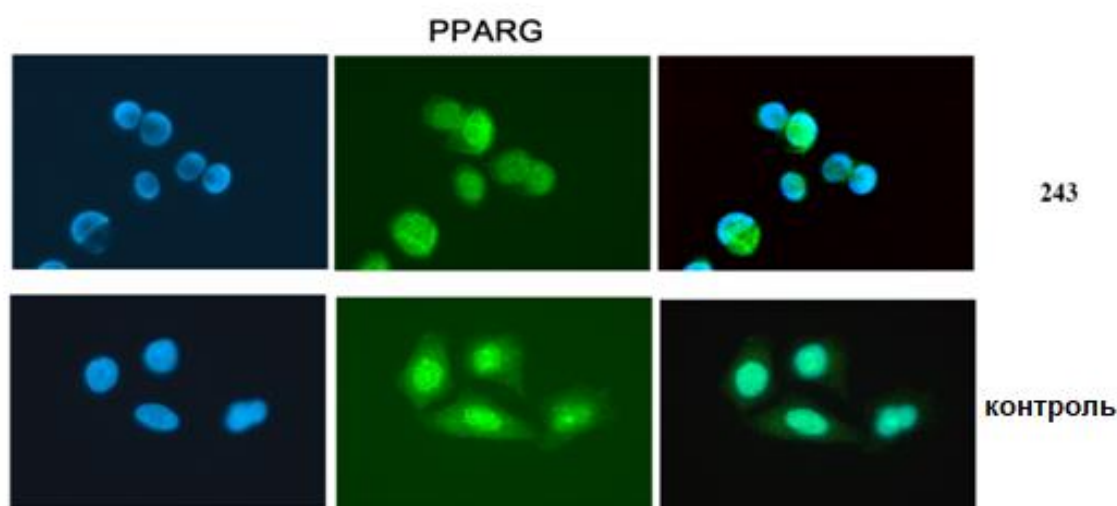


Рисунок 99. Клетки MCF7, инкубированные с исследуемым производным в концентрации 15 нм в течение суток. Слева – клетки, окрашенные DAPI, в середине - окрашенные антителами к PPARG, справа - совмещение. Ниже представлены контрольные клетки, окрашенные теми же антителами. Флуоресцентная микроскопия, увеличение x40.



При действии исследуемого соединения F-243 уровень экспрессии белков NRF2 и PPARG2 снижается на 10 – 20%, что показано методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих антител. Снижение уровня экспрессии PPARG2 показано также методом флуоресцентной микроскопии (рис. 99).

Несмотря на то, что уровень экспрессии NRF2 и PPARG снижается, из данных флуоресцентной микроскопии видно, что они перемещаются в ядро (рис. 99, рис. 100). Возможно, клетки пытаются ответить на окислительный стресс, однако он оказывается слишком сильным.

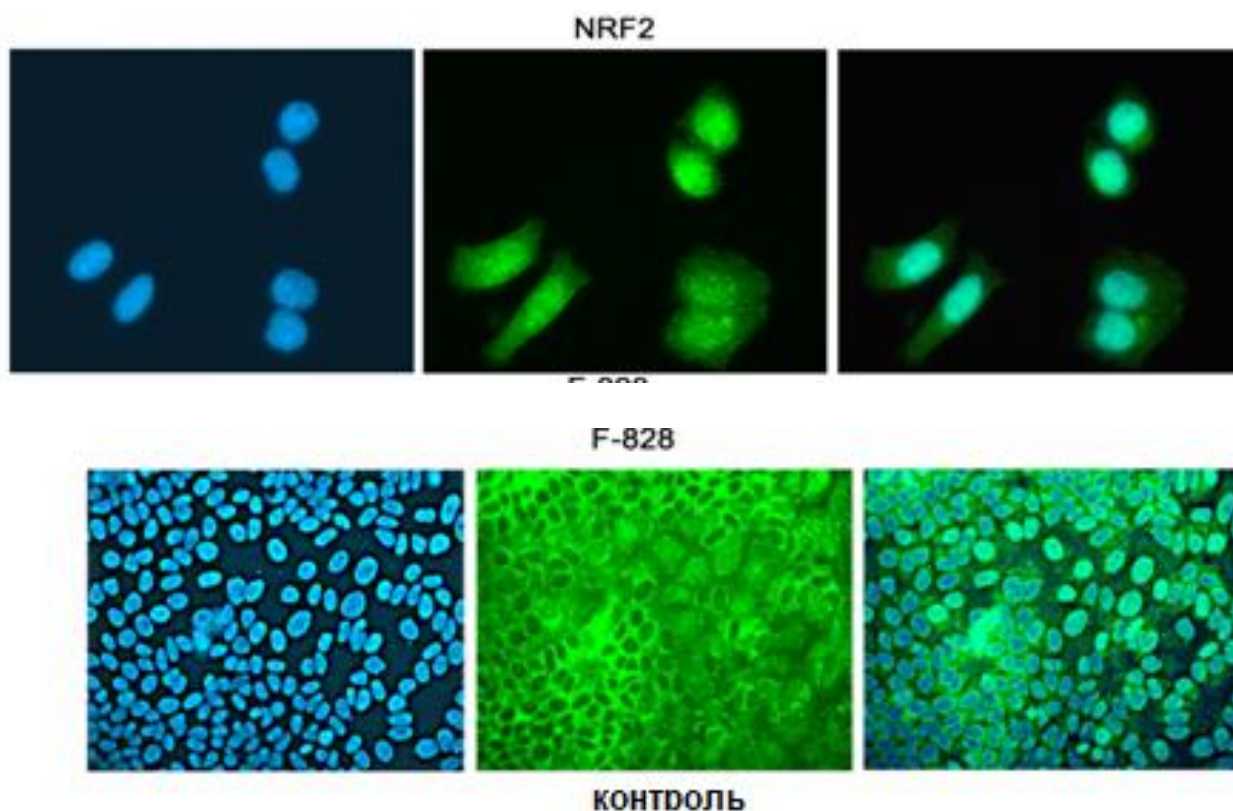


Рисунок 100. Клетки MCF7, инкубированные с исследуемым производным в концентрации 15 нм в течение суток. Слева – клетки, окрашенные DAPI, в середине – окрашенные антителами к NRF2, справа - совмещение. Ниже представлены контрольные клетки, окрашенные теми же антителами. Флуоресцентная микроскопия, увеличение x40.

### 3.8.6. Водорастворимые производные фуллерена C60 вызывают транслокацию NF-κB и STAT3 в ядро в MCF7

Транскрипционный фактор NF-κB транслоцируется в ядро и запускает NF-κB–сигнальный путь в ответ на внешние воздействия, что приводит к синтезу ряда цитокинов, молекул адгезии, факторов, направленных на выживание клетки. Аналогичным образом



действует и транскрипционный фактор STAT3. Исследуемое соединение не вызывало увеличения количества NF-κB и STAT3 (*рис. 100* – для STAT3).

Таким образом, новое водорастворимое производное фуллерена C<sub>60</sub> F-243 обладает собственной флуоресценцией как в водном растворе, так и внутри клеток, что позволяет детектировать его в раковых клетках через 3-24 ч. По химическому строению F-243 может служить акцептором АФК в клетках. Находясь вне клетки, F-243 связывает АФК, однако уже через 3 ч добавление F-243 к клеткам приводит к повышенному синтезу активных форм кислорода в связи с активацией транскрипции NOX4-оксидазы.

АФК вызывают окислительные повреждения ДНК раковых клеток, что приводит к появлению двуцепочечных разрывов ДНК в ядрах клеток. При повреждении ДНК происходит остановка клеточного цикла. Репарационные системы активируются через 1-3 ч, однако, их эффективности недостаточно для репарации всех повреждений, вызванных исследуемым соединением, поэтому через 24-72 ч активность системы репарации снижается. Активность антиапоптотических генов снижается через 3-72 ч после добавления F-243, тогда как активность проапоптотических генов, наоборот, повышается. Кроме того, производное фуллерена снижает потенциал митохондрий клеток, а транскрипционные факторы, отвечающие за антиокислительный ответ клеток, не активируются.

Таким образом, исследуемое водорастворимое производное фуллерена F-243 является токсичным для раковых клеток линии MCF7. При адресной доставке данное производное могло бы служить потенциальным противораковым препаратом, однако, необходимо учитывать, что, в случае выживания клеток после действия F-243 они могут приобрести дополнительные мутации за счет репарации двуцепочечных разрывов гомологической рекомбинацией.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство исследованных производных фуллерена хорошо растворимы в среде культивирования. Все водорастворимые производные фуллеренов флуоресценцируют в клетках в красной области (600-800 нм), возбуждаемой УФ-излучением (300-400 нм), независимо от того, имеют они собственную флуоресценцию, или нет. Они обладают разной скоростью проникновения в клетки и разной скоростью вымывания из клеток. Они обладают способностью проникать внутрь клетки и локализуются в цитоплазме вблизи ядра. Некоторые производные фуллерена C<sub>60</sub> прочно связываются со структурами клеток, а некоторые, в частности, соединения F-243 и F-828 вымываются из клеток при фиксации. Обнаружено водорастворимое производное фуллерена, которое обладает способностью прокрашивать ядра клеток и может быть использовано в качестве витального красителя. Такой же результат ранее получен и другими исследователями [56]. Наночастицы [C<sub>60</sub> (C(COOH)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> поступают в живые клетки 3T3 L1 и RH-35 главным образом через клатрин-опосредованный эндоцитоз, который зависит от времени и температуры.

Обнаружен «ранний» и «поздний» ответ ФЛЭЧ на водорастворимые производные фуллеренов. Ранняя реакция клеток включает быстрое понижение физиологического уровня АФК, пропорционально концентрации фуллерена. Различные типы производных фуллерена могут нейтрализовать физиологически активные АФК [57]. В то же время, АФК участвуют во многих процессах в нормальной клетке, включая внутриклеточную и межклеточную сигнализацию, пролиферацию и апоптоз. Основными источниками АФК в фибробластах являются NADPH-зависимые оксидазы, в том числе, NOX4 [58]. Белки NOX являются мембрано-связанными ферментами, которые катализируют восстановление кислорода с помощью НАДФН в качестве донора электронов. Показано, что NOX4 вовлечен в фиброгенный ответ на повреждение легкого [42].

Резкое снижение физиологического уровня АФК в культуре клеток стимулирует "ранний" ответ клетки – интенсивный синтез АФК через 1 час после добавления фуллеренов. "Ранний" ответ реализуется через активацию экспрессии NOX4. Количество фермента значительно возрастает вблизи клеточной мембраны, в цитоплазме и в ядре. Повышенный уровень АФК обнаружен в клетках, хотя наночастицы все еще присутствуют в среде культивирования и продолжают связывать АФК, которые

синтезированы клеткой. Ингибирование активности NOX4 плюмбагином предотвращает фуллерен-индуцированный синтез АФК в клетках.

Примечательно, что активация экспрессии NOX4 не всегда приводит к активации фактора NRF2, который обеспечивает антиоксидантный ответ. Наоборот, большинство исследованных фуллеренов вызывает снижение экспрессии этого фактора транскрипции. Возможно, это тоже часть клеточной реакции, направленной на поддержание физиологического уровня АФК в условиях непрерывного связывания АФК на поверхности клеток и в среде культивирования с наночастицами фуллерена.

Увеличение содержания АФК в ядре вызывает увеличение фосфорилированной формы гистона H2AX, что свидетельствует об увеличении количества разрывов ДНК в ядре клетки. В дальнейшем в клетках активируются системы репарации, что приводит к уменьшению числа разрывов ДНК.

Длительная инкубация клеток с производными фуллерена приводит к «позднему» ответу клеток. Через 24 - 48 ч инкубации с фуллеренами в ФЛЭЧ вновь наблюдается увеличение уровня АФК. Увеличение уровня АФК связано с усилением экспрессии фермента NOX4 на поверхности клетки, в цитоплазме и в ядре. Одной из вероятных причин вторичного возрастания NOX4 и АФК может быть связывание АФК наночастицами внутри клетки. Для того, чтобы пополнить физиологически необходимый пул АФК внутри клеток, снова активируется экспрессия NOX4. На данном этапе наночастицы в цитоплазме клетки уже не в состоянии связать все синтезируемые АФК в цитоплазме и ядре, потому что количество наночастиц цитоплазме и мощность каждого фуллерена с учетом количества связывания АФК ограничены.

Различные значения концентрации фуллеренов в среде вызывают различные "поздние" реакции в клетках. Низкие концентрации производных фуллерена стимулируют пролиферативную активность клеток: наблюдается повышенная экспрессия Ki-67 и гена CCND1. При этом увеличивается уровень разрывов ДНК, повышается экспрессия гена BRCA1.

При повышении концентрации фуллеренов в среде культивирования наблюдается снижение пролиферативной активности клеточных культур. Снижается экспрессия маркеров пролиферации Ki-67 и PCNA, наблюдается снижение уровня экспрессии гена CCND1 и увеличение экспрессии гена CDKN2A. Повышается уровень АФК, возрастает число разрывов ДНК в клетках, увеличивается активность NF-κB и p53.

Водорастворимые производные фуллерена в высоких концентрациях вызывают значительное увеличение уровня АФК, увеличение экспрессии гена *NOX4*, высокий уровень повреждения ДНК клеток. Повреждение ДНК вызывает гибель части клеток посредством некроза. Еще большее повышение концентрации приводят к массовой гибели клеток по механизму некроза. Имеются сообщения об активации апоптоза в клетках в присутствии токсических концентраций фуллеренов [59,60]. Однако показано, что производные фуллерена способны инициировать дозозависимую цитотоксичность с помощью механизма некроза [61].

Таким образом, в широком диапазоне концентраций фуллерены способны изменять профиль функциональной активности генов эмбриональных фибробластов легкого. Показали, что антиоксидантная активность обусловлена активацией экспрессии мастер-регулятора антиокислительного ответа в клетках - NRF2. Производные фуллерена, не активирующие экспрессию NRF2, индуцируют активацию экспрессии транскрипционного фактора NF-κB. Соединения фуллерена, инициирующие развитие вторичного окислительного стресса в клетках, вызывают образование разрывов ДНК и активируют гены репарации ДНК.

Обнаруженный механизм антиоксидантной активности водорастворимых производных фуллерена C60 может привести к созданию эффективных схем антиоксидантной терапии, когда производные фуллерена будут добавляться комплексно либо с активаторами NRF2, либо с ингибиторами NOX4. В процессе исследований обнаружили одно соединение, не инициирующее вторичный синтез активных форм кислорода *in vitro* в эмбриональных фибробластах легких человека. Это соединение может рассматриваться в качестве потенциального антиоксиданта.

Показали, что фосфоросодержащие водорастворимые производные фуллерена C60 обладают способностью активировать гены миогенной дифференцировки в МСК. Обнаружено соединение F-827 в диапазоне концентраций 129 пМ - 195 мкМ являющееся стимулятором миогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека.

Обнаружено водорастворимое производное фуллерена F-243 обладающее токсичностью для раковых клеток линии MCF7. При адресной доставке данное производное можно рассматривать в качестве потенциального противоракового препарата.

## ВЫВОДЫ

1. Исследованные водорастворимые производные фуллерена (F-828, F-827, F-243, GI-761, OKR111, OKR112, VI-419, VI-434K2) проникают в цитоплазму, флуоресцируют в клетках ( $\lambda_{\text{возб.}} = 300-400$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 600-800$  нм) и локализуются вблизи ядра. Только производное фуллерена VI-434K2 прокрашивает ядра клеток. Прочно связывается с клетками только фуллерен GI-761.

2. Исследованные производные фуллерена нетоксичны в наномолярных концентрациях (менее 1 нМ) в отношении ФЛЭЧ, МСК и клеток линии MCF7. В микромолярной концентрации (менее 25 мкМ) нетоксично соединение F-828. Соединения F-827, GI-761, VI-419, VI-434K2 нетоксичны в миллимолярной концентрации (менее 0,4 мМ). Обнаружено водорастворимое производное фуллерена F-243, обладающее токсичностью в концентрации более 10 нМ в отношении раковых клеток линии MCF7, в концентрации выше 50 нМ – в отношении клеток ФЛЭЧ и МСК.

3. Определен механизм антиоксидантной активности водорастворимых производных фуллерена C<sub>60</sub> *in vitro* на эмбриональных фибробластах легких человека (ФЛЭЧ). Все исследованные производные фуллерена эффективно связывают свободные радикалы в растворах и культивируемых клетках – ФЛЭЧ, активируя экспрессию гена фермента NOX4, что приводит к развитию вторичного окислительного стресса в клетках. Механизм повышения уровня свободных радикалов белком NOX4 доказан с помощью ингибитора NOX4 – плюмбагина.

4. Показано, что только соединение VI-419 активирует в клетках экспрессию мастер-регулятора антиокислительного ответа - NRF2 и на уровне гена, и на уровне белка и может рассматриваться в качестве потенциального антиоксиданта. Производные фуллерена F-828, F-827, F-243, GI-761, OKR111, OKR112, VI-434K2 индуцируют активацию экспрессии транскрипционного фактора NF-κB и его транслокацию в ядра клеток.

5. Соединения фуллерена F-828, F-827, F-243, GI-761, OKR111, OKR112, VI-434K2 вызывают образование разрывов ДНК клеток, кратковременную остановку клеточного цикла и активируют гены репарации ДНК (*BRCA1*, *BRCA2*). Производное фуллерена F-828 в концентрациях (0,1 - 0,5 мкМ) стимулирует пролиферацию клеток и увеличение числа клеток в популяции ФЛЭЧ. В эмбриональных фибробластах легкого человека F-

828 усиливает экспрессию генов сигнального каскада Rho/Rock и Smad, потенциально запускающих патологический процесс фиброза.

6. Фосфоросодержащее производное фуллерена F-827 в диапазоне концентраций 129 пМ - 195 мкМ обладает способностью активировать миогенную дифференцировку в МСК, повышая экспрессию транскрипционных факторов миогенной дифференцировки и на уровне генов (*MYOD*, *MYOG*, *MRF4*, *MYF5*), и на уровне белков. Адипогенная и остеогенная дифференцировки при этом не активируются.

7. Соединение F-243, в концентрации 10-50 нМ, токсичной для раковых клеток и нетоксичной для фибробластов и МСК, вызывает через 3 ч в клетках MCF7 повышенный синтез АФК, окислительные повреждения и двуцепочечных разрывы ДНК раковых клеток и активацию апоптоза, что приводит к гибели раковых клеток.

### **ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ**

1. Исследованные водорастворимые производные фуллерена C60 могут применяться в качестве антиоксидантов короткого действия, а при использовании ингибиторов NOX4 или активаторов NRF2 антиоксидантная активность фуллеренов может быть пролонгированной. Соединение, оказывающее пролонгированное снижение уровня активных форм кислорода в клетках (VI-419-P3K), может быть использовано в качестве антиоксиданта длительного действия.

2. Все исследованные соединения могут использоваться для детекции распространения фуллеренов *in vivo* благодаря выявленной флуоресценции этих соединений *in vitro*.

3. Одно из исследованных соединений – VI-434 может быть использовано в качестве витального красителя, выявляющего ядра клеток в практике лабораторной работы.

4. Обнаруженное свойство одного из производных фуллерена C60 – F-827 – вызывать миогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток - потенциально позволит использовать его в регенеративной медицине для лечения обширных травм или миодистрофических болезней, например, мышечной дистрофии Дюшенна, Ландузи-Дежерина или миотонической дистрофии.

5. Водорастворимое производное фуллерена F-243 является токсичным для раковых клеток линии MCF7. При адресной доставке данное производное может служить потенциальным противораковым препаратом, однако, необходимо учитывать, что, в

случае выживания клеток после действия F-243 они могут приобрести дополнительные мутации за счет ошибок репарации двунитевых разрывов.

б. Детальное исследование сигнальных путей, задействованных в ответе клеток на инкубацию с производными фуллерена C<sub>60</sub>, несет огромную ценность для дальнейшей разработки лекарств на основе фуллеренов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sitharaman B. Water-soluble fullerene (C<sub>60</sub>) derivatives as nonviral gene-delivery vectors/ Sitharaman B., Zakharian TY, Saraf A, Misra P, Ashcroft J, Pan S, Pham QP, Mikos AG, Wilson LJ, Engler DA// *Mol Pharm.* - 2008.-V.5(4). - P. 567-78.
2. Bakry R. Medicinal applications of fullerenes/ Bakry R, Vallant RM, Najam-ul-Haq M, Rainer M, Szabo Z, Huck CW, Bonn GK // *Int J Nanomedicine.* - 2007. - V.2(4). - P. 639-649.
3. Galvan YP. Fullerenes as Anti-Aging Antioxidants/ Galvan YP, Alperovich II, Zolotukhin P, Prazdnova E, Mazanko M, Belanova A, Chistyakov V// *Curr Aging Sci.* - 2017. –V.10(1) – P.56-67.
4. Bosi S1. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications// Bosi S1, Da Ros T, Spalluto G, Prato M. *Eur J Med Chem.* – 2003. – V.38(11-12). – P.913-923.
5. Prylutska, S.V. Pristine C(60) fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis/ S.V. Prylutska, A.P. Burlaka, Y.I. Prylutsky, U.Ritter, P. Scharff // *Exp Oncol.* – 2011.– №33. – P. 162-164.
6. Friedman, S.H. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification/ S.H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, et al. // *J Am Chem Soc.* – 1993. – V. 115. – P. 6506-6509.
7. Marchesan, S. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives/ S. Marchesan, T. Da Ros, G. Spalluto, et al. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2005. – V. 15. – P. 3615-3618.
8. Shoji, M. Anti-influenza activity of C<sub>60</sub> fullerene derivatives/ M. Shoji, E. Takahashi, D. Hatakeyama, Y. Iwai, Y. Morita, R. Shirayama, N. Echigo, H. Kido, S. Nakamura, T. Mashino, T. Okutani, T. Kuzuhara // *PLoS One.* – 2013.– V. 8. – № 6).– P. e66337.
9. Grinholc, M. Antimicrobial photodynamic therapy with fulleropyrrolidine:photoinactivation mechanism of *Staphylococcus aureus*, in vitro and in vivo studies/ M. Grinholc, J. Nakonieczna, G. Fila, A. Taraszkievicz, A. Kawiak, G. Szewczyk, T. Sarna, L. Lilge, K.P. Bielawski // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2015. – V. 99. – P. 4031-4043.
10. Markovic, Z. The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes/ Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, D. Kleut, N. Nikolic, S. Vranjes- Djuric, M. Misirkic, L. Vucicevic, K. Janjetovic, A. Isakovic, L. Harhaji, B. Babic-Stojic, M. Dramicanin, V. Trajkovic // *Biomaterials.* – 2007. – V. 28. – P. 5437-5448.



11. Gharbi, N. [60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity/ Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F // *Nano Lett.* - 2005. - V. 5(12). - P. 2578-2585.
12. Kroto, H.W. C60: Buckminsterfullerene/ H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley // *Nature.* - 1985. - V. 318. - P. 162-163.
13. Diederich, F. The higher fullerenes: isolation and characterization of C76, C84, C90, C94, and C70O, an oxide of D5 h-C70/F. Diederich, R. Ettl, Y. Rubin, R.L. Whetten, R. Beck, M. Alvarez, S. Anz, D. Sensharma, F. Wudl, K.C. Khemani, A. Koch // *Science.* - 1991. - V. 252. - P. 548-551.
14. Piskoti, C. C36, a new carbon solid/ C. Piskoti, J. Yarger, A. Zettl // *Nature.* - 1998. - V. 393. - P. 771-774.
15. Scott, L.T. A rational chemical synthesis of C60/ L.T. Scott, M.M. Boorum, B.J. McMahon, S. Hagen, J. Mack, J. Blank, H. Wegner, A. de Meijere // *Science.* - 2002. - V. 295. - № 5559. - P. 1500-1503.
16. Mojica, M. Synthesis of fullerenes/ M. Mojica, J.A. Alonso, F. Méndez // *J. Phys. Org. Chem.* - 2013. - V. 26. - Iss. 7. - P. 526-539.
17. Scrivens, W.A. Purification of gram quantities of C60. A new inexpensive and facile method/ W.A. Scrivens, P.V. Bedworth, J.M. Tour // *J. Am. Chem. Soc.* - 1992. - V. 114. - № 20. - P. 7917-7919.
18. Harhaji, L. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene/L. Harhaji, A. Isakovic, N. Raicevic, Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, N. Nikolic, S. Vranjes-Djuric, I. Markovic, V. Trajkovic // *Eur J Pharmacol.* - 2007. - V. 568. - P. 89-98.
19. Zhu, X. Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates/X. Zhu, L. Zhu, Y. Lang, Y. Chen // *Environ Toxicol Chem.* - 2008. - V. 27. - P. 1979-1985.
20. Vileno, B. Spectroscopic and photophysical properties of a highly derivatized C60 fullerol/ B. Vileno, P.R. Marcoux, M. Lekka, A. Sienkiewicz, I. Feher, L. Forro // *Adv Funct Mater.* - 2006. - V. 16. - P. 120-128.
21. Su, Y. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fulleranol in different cell lines/ Y. Su, J.Y. Xu, P. Shen, J. Li, L. Wang, Q. Li, W. Li, G.T. Xu, C. Fan, Q. Huang // *Toxicology.* - 2010. - V. 269. - P. 155-159.

22. Isakovic, A. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene/ A. Isakovic, Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, N. Nikolic, S. Vranjes-Djuric, M. Mirkovic, M. Dramicanin, L. Harhaji, N. Raicevic, Z. Nikolic, V. Trajkovic // *Toxicol Sci.* – 2006. – V. 91. – № 1. – P. 173–183.
23. Bosi, S. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives/ S. Bosi, L. Feruglio, T. Da Ros, G. Spalluto, B. Gregoretti, M. Terdoslavich, G. Decorti, S. Passamonti, S. Moro, M.J. Prato // *J Med Chem.* – 2004. – V. 47. – P. 6711-6715.
24. Gelderman, M.P. Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: fulleranol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> induced tissue factor and ICAM-I membrane expression and apoptosis in vitro/ M.P. Gelderman, O. Simakova, J.D. Clogston, A.K. Patri, S.F. Siddiqui, A.C. Vostal, J. Simak// *Int J Nanomedicine.* – 2008. – V.3. – P. 59-68.
25. Yamawaki, H. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells/ H. Yamawaki, N. Iwai // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2006. – V. 29. – P. C1495-C1502.
26. Trpkovic, A. Oxidative stress-mediated hemolytic activity of solvent exchange-prepared fullerene (C<sub>60</sub>) nanoparticles/ A. Trpkovic, B. Todorovic-Markovic, D. Kleut, M. Misirkic, K. Janjetovic, L. Vucicevic, A. Pantovic, S. Jovanovic, M. Dramicanin, Z. Markovic, V. Trajkovic // *Nanotechnology.* – 2010. – V. 21. – P. 375102.
27. Nakagawa, Y. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction/ Y. Nakagawa, T. Suzuki, H. Ishii, D. Nakae, A. Ogata // *Arch Toxicol.* – 2011. V. 85. – P. 1429-1440.
28. Zhao, B. Difference in phototoxicity of cyclodextrin complexed fullerene [(gamma-CyD)<sub>2</sub>/C<sub>60</sub>] and its aggregated derivatives toward human lens epithelial cells/ B. Zhao, Y.Y. He, C.F. Chignell, J.J. Yin, U. Andley, J.E. Roberts // *Chem Res Toxicol.* – 2009. – V. 22. – P. 660-667.
29. Taroni, P. Fullerol in human lens and retinal pigment epithelial cells: time domain fluorescence spectroscopy and imaging/ P. Taroni, C. D'Andrea, G. Valentini, R. Cubeddu, D.N. Hu, J.E. Roberts // *Photochem Photobiol Sci.* – 2011. – V. 10. – P. 904-910.
30. Roberts, J.E. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells/ J.E. Roberts, A.R. Wielgus, W.K. Boyes, U. Andley, C. Chignell // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2008. – V. 228. – P. 49-58.
31. Markovic, Z. The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes/ Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, D. Kleut, N. Nikolic, S. Vranjes-Djuric, M.

- Misirkić, L. Vucicević, K. Janjetović, A. Isaković, L. Harhaji, B. Babić-Stojić, M. Dramićanin, V. Trajković // *Biomaterials*. – 2007. – V. 28. – P. 5437-5448.
32. Saitoh, Y. Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS generation and DNA damages/ Y.Saitoh, A. Miyanishi, H. Mizuno, S. Kato, H. Aoshima, K. Kokubo, N. Miwa // *J Photochem Photobiol B*. – 2011. – V. 102. – P. 69-76.
33. Ehrich, M. Fullerene antioxidants decrease organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition in vitro/ M. Ehrich, R. Van Tassell, Y. Li, Z. Zhou, C.L. Kepley // *Toxicol In Vitro*. – 2011. – V. 25. – P. 301-307.
34. Gonçalves, D.M. Evidence that polyhydroxylated C60 fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo/ D.M. Gonçalves, D. Girard // *Chem. Res. Toxicol.* – 2013. – V.26. – № 12. – P. 1884-1892.
35. Zhanga, B. Macrophage apoptosis induced by aqueous C60 aggregates changing the mitochondrial membrane potential/ B. Zhanga, W. Biana, A. Palb, Y. He // *Env. Toxicol.Pharmacol.* – 2015. – V. 39. – P. 237-246.
36. Johnson-Lyles, D.N. Fullerenol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction/ D.N. Johnson-Lyles, K. Peifley, S. Lockett, B.W. Neun, M. Hansen, J. Clogston, S.T. Stern, S.E. McNeil // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2010. – V. 248. – P. 249-258.
37. Utsunomiya, S. Uraninite and fullerene in atmospheric particulates/ S. Utsunomiya, K.A. Jensen, G.J. Keeler, R.C. Ewing // *Environ Sci Technol.* – 2002. – V. 36. – P. 4943-4947.
38. Fujita, K. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C60 fullerene particles/ K. Fujita, Y. Morimoto, A. Ogami, T. Myojyo, I. Tanaka, M. Shimada, W.N. Wang, S. Endoh, K. Uchida, T. Nakazato, K. Yamamoto, H. Fukui, M. Horie, Y. Yoshida, H. Iwahashi, J. Nakanishi // *Toxicology*. – 2009. – V. 258. – P. 47-55.
39. Dugan, L.L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders/L.L. Dugan, E.G. Lovett, K.L. Quick, J. Lotharius, T.T. Lin, K.L. O'Malley // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2001. – V. 7. – № 3. – P. 243-246.
40. Wolff, D.J. Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by tris-malonyl-C(60)-fullerene adducts /D.J. Wolff, A.D. Papoiu, K. Mialkowski, C.F. Richardson, D.I. Schuster, S.R. Wilson // *Arch Biochem Biophys.* – 2000. – V. 378. – № 2. – P. 216-223.

41. Gharbi, N. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity/N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, et al. // *Nano Lett.* – 2005. – V.5. – P. 2578-2585.
42. Slater, T.F. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury/ T.F. Slater, K.H. Cheeseman, K.U. Ingold // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – V. 1985. – V. 311. – P. 633-645.
43. Bisaglia, M. C3-fullero-trismethanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis/ M. Bisaglia, B. Natalini, R. Pellicciari, et al. // *J Neurochem.* – 2000. – V. 74. – P. 1197-1204.
44. Straface, E. C3-Fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability/ E. Straface, B. Natalini, D. Monti, et al. // *FEBS Lett.* – V. 1999. – V. 454 – P. 335-340.
45. Monti, D. C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells/ D. Monti, L. Moretti, S. Salvioli, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2000. – V. 277. – P. 711-717.
46. Xiao, L. The water-soluble fullerene derivative ‘Radical Sponge’ exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes/ L. Xiao, H. Takada, X.H. Gan, et al. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2006. – V. 16. – P. 1590-1595.
47. Yumita, N. Sonodynamically induced cell damage and membrane lipid peroxidation by novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I)/ N. Yumita, Y. Iwase, K. Nishi, T. Ikeda, S. Umemura, I. Sakata, Y. Momose // *Anticancer Res.* – 2010. – V. 30. – P. 2241-2246.
48. Yumita, N. Sonodynamically-induced anticancer effects by functionalized fullerenes/ N. Yumita, Y. Iwase, T. Imaizumi, A. Sakurazawa, Y. Kaya, K. Nishi, T. Ikeda, S.-I. Umemura, F.-S. Chen, Y. Momose // *Anticancer Res.* – 2013. – V. 33. – P. 3145-3152.
49. Yumita, N. Involvement of reactive oxygen species in the enhancement of membrane lipid peroxidation by sonodynamic therapy with functionalized fullerenes/ N. Yumita, Y. Iwase, T. Watanabe, K. Nishi, H. Kuwahara, M. Shigeyama, K. Sadamoto, T. Ikeda, S.-I. Umemura // *Anticancer Res.* – 2014. – V. 34. – P. 6481-6488.
50. Tokuyama, H. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid/ H. Tokuyama, S. Yamago, E. Nakamura, T. Shiraki, Y. Sugiura // *J Am Chem Soc.* – 1993. – V. 115. – P. 7918-7919.

51. Rancan, F. Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C(60) mono-adduct and a malonic acid C(60) tris-adduct on Jurkat cells/ F. Rancan, S. Rosan, F. Boehm, A. Cantrell, M. Brellreich, H. Schoenberger, A. Hirsch, F. Moussa // *J Photochem Photobiol B.* – 2002. – V.67 . – P. 157-162.
52. Tabata, Y. Photodynamic effect of polyethylene glycol-modified fullerene on tumor/ Y. Tabata, Y. Murakami, Y. Ikada // *Jpn J Cancer Res.* – 1997. – V. 88 – P. 1108-1116.
53. Kotelnikova, R.A. Nanobionics of pharmacologically active derivatives of fullerene C60/ R.A. Kotelnikova, G.N. Bogdanov, E.C. Frog, et al. // *J Nanoparticle Res.* – 2003. – V. 5. – P. 561-566.
54. Mashino, T. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives/ T. Mashino, K. Shimotohno, N. Ikegami, et al. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2005.– V. 15. – P. 1107-1109.
55. Marcorin, G.L. Design and synthesis of novel [60]Fullerene derivatives as potential HIV aspartic protease inhibitors/ G.L. Marcorin, T. Da Ros, S. Castellano, et al. // *Org Lett.* – 2000. – V.2. – P. 3955-3958.
56. Xu, Z.P. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery/ Z.P. Xu, Q.H. Zeng, G.Q. Lu, et al. // *Chem Eng Sci.* – 2005. – V. 61. – P. 1027-1040.
57. Foley, S. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative/ S. Foley, C. Crowley, M. Smahi, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – V. 294. – P. 116 -119.
58. Nakamura, E. Functionalized fullerenes in water, the first 10 years of their chemistry, biology, and nanoscience/ E. Nakamura, H. Isobe // *Acc Chem Res.* – 2003. – V. 36. – P. 807-815.
59. Ryman-Rasmussen, J.P. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties/ J.P. Ryman-Rasmussen, J.E. Riviere, N.A. Monteiro-Riviere // *Toxicol Sci.* – 2006. – V. 91. – V. 159-165.
60. Panchuk, R.R. Application of C60 Fullerene-Doxorubicin Complex for Tumor Cell Treatment In Vitro and In Vivo/ R.R. Panchuk, S.V. Prylutska, V.V. Chumak, N.R. Skorokhyd, L.V. Lehka, M.P. Evstigneev, Yu.I. Prylutsky, W. Berger, P. Heffeter, P. Scharff, U. Ritter, R.S. Stoika // *J Biomed Nanotechnol.* – 2015.– V. 11.– P. 1139-1152.
61. Bobylev, A.G. Fullerenolates: metallated polyhydroxylated fullerenes with potent anti-amyloid activity/ A.G. Bobylev, A.B. Kornev, L.G. Bobyleva, M.D. Shpagina, I.S. Fadeeva,

- R.S. Fadeev, D.G. Deryabin, J. Balzarini, P.A. Troshin, Z. A. Podlubnaya // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. – V.9 – P. 5714-5719.
62. Dellinger, A. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells/ A. Dellinger, Z. Zhou, S.K. Norton, R. Lenk, D. Conrad, C.L. Kepley // *Nanomedicine.* – 2010. – V.6. – № 4.– P. 575-582.
63. Norton, S.K. Epoxyeicosatrienoic acids are involved in the C(70) fullerene derivative-induced control of allergic asthma/ S.K. Norton, D.S. Wijesinghe, A. Dellinger, et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2012. – V. 130. – № 3. – P. 761-769.
64. Yin, R. Antimicrobial photodynamic inactivation with decacationic functionalized fullerenes: oxygen independent photokilling in presence of azide and new mechanistic insights/ R. Yin, M. Wang, Y.-Y. Huang, G. Landi, D. Vecchio, L.Y. Chiang, M.R. Hamblin // *Free Radic Biol Med.* – 2015 – V. 79. – P. 14.27.
65. Liu, W. Electrospinning of poly(L-lactide) nanofibers encapsulated with water-soluble fullerenes for bioimaging application/ W. Liu, J. Wei, Y. Chen, P. Huo, Y. Wei // *ACS ACS Appl. Mater. Interfaces.* –2013. – V. 5. – № 3. – P. 680-685.
66. Minter D. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications/ D. Minter, K.G. Marra, J.P. Rubin // *Adv Biochem Eng Biotechnol.*– 2013.– V. 129. – P. 59-71.
67. DiRocco, G. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells/ G. DiRocco, M.G. Iachininoto, A. Tritarelli, S. Straino, A. Zacheo, A. Germani, F. Crea, M.C. Capogrossi // *J Cell Sci.* – 2006. – V. 119. – № 4. – P. 2945-2952.
68. Clavijo-Alvarez, J.A. A novel perfluoroelastomer seeded with adipose-derived stem cells for soft-tissue repair/ J.A. Clavijo-Alvarez, J.P. Rubin, J. Bennett, V.T. Nguyen, J. Dudas, C. Underwood, K.G. Marra // *Plast Reconstr Surg.* – 2006. – V. 118. – № 5. – P. 1143-1144.
69. Sabourin, L.A. The molecular regulation of myogenesis/ L.A. Sabourin, M.A. Rudnicki // *Clin Genet.* – 2000. – V. 57. – № 1. – P. 16-25.
70. Park, S. Autophagy induction in the skeletal myogenic differentiation of human tonsil-derived mesenchymal stem cells/ S. Park, Y. Choi, N. Jung, J. Kim, S. Oh, Y. Yu, J.H. Ahn, I. Jo, B.O. Choi, S.C. Jung // *Int. J. Mol. Med.* – 2017. – V. 39. – № 4. – P.831-840
71. Hoffmann, A. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling/ A. Hoffmann, D. Baltimore // *Immunol Rev.* – 2006.– V. 210. – P. 171-186.

72. Pedruzzi, L.M. Nrf2-keap1 system versus NF- $\kappa$ B: the good and the evil in chronic kidney disease?/ L.M. Pedruzzi, M.B. Stockler-Pinto, M. Jr. Leite, D. Mafra // *Biochimie.* – 2012. – V. 94. – № 12. – P. 2461-2466.
73. Wakabayashi, N. When NRF2 talks, who's listening?/ N. Wakabayashi, S.L. Slocum, J.J. Skoko, S. Shin, T.W. Kensler // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – V. 13. – № 11. – P. 1649-1663.
74. Gloire, G. Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation/ G. Gloire, J. Piette // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009 – V. 11. – P. 2209-2222.
75. Salminen, A. Activation of innate immunity system during aging: NF- $\kappa$ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging/ A. Salminen, J. Huuskonen, J. Ojala, A. Kauppinen, K. Kaarniranta, T. Suuronen // *Ageing Res. Rev.* – 2008. – V. 7. – № 2. – P. 83-105.
76. Baud, V. The alternative NF- $\kappa$ B activation pathway and cancer: friend or foe?/ V. Baud, E. Jacque // *Med. Sci.* – 2008. – V. 24. – P. 1083-1088
77. Delogu, G. Functionalized carbon nanotubes as immunomodulator systems/ M. Pescatori, D. Bedognetti, E. Venturelli, C. Ménard-Moyon, C. Bernardini, E. Muresu, A. Piana, G. Maida, R. Manetti, F. Sgarrella, A. Bianco, G. Delogu// *Biomaterials.* –2013.–V. 34. – P. 4395-4403.
78. Golokhvast, K.S. The impact of multi-walled carbon nanotubes with different amount of metallic impurities on immunometabolic parameters in healthy volunteers/ T.I.Vitkinaa, V.I.Yankova, T.A.Gvozdenco, V.L.Kuznetsov, D.V.Krasnikov, A.V.Nazarenko, V.V.Chaika, S.V.Smagin, A.M.Tsatsakis, A.B.Engin, S.P.Karakitsios, D.A.Sarigiannis, K.S.Golokhvast// *Food and Chemical Toxicology.*–2016.– V. 87. – P. 138-147.
79. Pickett, C.B. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress// T Nguyen, P Nioi, C. B. Pickett// *J Biol Chem.* – 2009. – V. 284(20). – P. 13291–13295.
80. Kansanen, E. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer/ E. Kansanen, S.M. Kuosmanen, H. Leinonen, A.L. Levonen // *Redox Biol.* – 2013. – V. 1. – № 1. – P. 45-49.].
81. Hayes, J.D. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway/ J.D. Hayes, M. McMahon, S. Chowdhry, A.T. Dinkova-Kostova // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – V. 13. – № 11. – P. 1713-1748.

82. Kensler, T.W. Nrf2: friend or foe for chemoprevention?/ T.W. Kensler, N. Wakabayashi // *Carcinogenesis*. - 2010. - V. 31. - P. 90
83. Pedruzzi, L.M. Nrf2-keap1 system versus NF- $\kappa$ B: the good and the evil in chronic kidney disease?/ L.M. Pedruzzi, M.B. Stockler-Pinto, M. Jr. Leite, D. Mafra // *Biochimie*. - 2012. - V. 94. - №12. - P. 2461-2466.
84. Ren, L. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system./ S. Y. Min Chen, Y. J. Mingliang, C. T. Zhou, Y. Wang, Z. Hou, L. Ren// *Int J Nanomedicine*. - 2014. - V. 9. - P. 2073–2087.
85. Jove, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions./ H. Yu, H. Lee, A. Herrmann, R. Buettner, R. Jove// *Nat Rev Cancer*. - 2014.- V.14(11). -P. 736-746.
86. Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3/ H. Yu, D. Pardoll, R. Jove// *Nature Reviews Cancer*. - 2009. - V.9. -P. 798–809.
87. Auwerx, J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene/ L. Fajas, D. Auboeuf, E. Raspé, K. Schoonjans, A.M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J.C. Fruchard, S. Deeb, A. Vidal-Puig, J. Flier, M.R. Briggs, B. Staels, H. Vidal, J. Auwerx// *J Biol Chem*. -1997. -V. 272 (30). -P. 18779–18789.
88. Gummersbach, C. New aspects of adipogenesis: radicals and oxidative stress/ C. Gummersbach, K. Hemmrich, K.D. Kroncke et al. // *Differentiation*. - 2009. - V. 77. - №2. - P. 115-120.
89. Park, S.H. Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP homologous protein enhances nuclear factor-kappaB signals via repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma/ S.H. Park, H.J. Choi, H. Yang et al. // *J Biol Chem*. - 2010. - V. 285. - №46. - P. 35330-35339.
90. Schmidt, M.V. The nuclear hormone receptor PPAR $\gamma$  as a therapeutic target in major diseases/ M.V. Schmidt, B. Brune, A. von Knethen // *Sci World J*. - 2010. - V. 10. - P. 2181-2197.
91. Tamuraa, H. A proline-type fullerene derivative inhibits adipogenesis by preventing PPAR $\gamma$  activation/ M. Funakoshi-Tago, T. Hattori, F. Ueda, K. Tago, T. Ohe, T. Mashino, H. Tamuraa// *Biochem Biophys Rep*. -2016. -V.5. -P. 259–265.
92. Almalki, S.G. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells./S.G. Almalki, D.K. Agrawal// *Differentiation*. -2016-V.92. - P.41-51.



93. Sabourin, L.A. The molecular regulation of myogenesis/ L.A. Sabourin, M.A. Rudnicki// Clin Genet. –2000. –V.57. –P.16-25.
94. Ferri, P. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts./P. Ferri, E. Barbieri, S. Burattini, M. Guescini, A. D'Emilio, L. Biagiotti, P. Del Grande, A. De Luca, V. Stocchi, E. Falcieri.// J Cell Biochem. –2009. –V.15. –P.1302-1317.
95. Sweetman, D. Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle/G.F. Mok, D. Sweetman.// Reproduction. –2011. –V.141. –P.301-312.
96. Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription.// Development. –2005. –V.132. –P. 2685–2695.
97. Bareja, A. Human and mouse skeletal muscle stem cells: convergent and divergent mechanisms of myogenesis./ A. Bareja, J.A. Holt, G. Luo, C. Chang, J. Lin, A.C. Hinken, J.M. Freudenberg, W.E. Kraus, W.J. Evans, A.N. Billin. // PLoS One.–2014.–V.9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0090398. eCollection 2014.
98. Kitzmann, M. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts./ M. Kitzmann, A. Fernandez.// Cell Mol Life Sci.–2001.V.58. –P.571–579.
99. Doucet, C. Multiple phosphorylation events control mitotic degradation of the muscle transcription factor Myf5./ C. Doucet, G.J. Gutierrez, C. Lindon, T. Lorca, G. Lledo, C. Pinset, O. Coux. // BMC Biochem. –2005. –V.6. –P.6-27.
100. Sabourin, L.A. Reduced differentiation potential of primary MyoD<sup>-/-</sup> myogenic cells derived from adult skeletal muscle./ L.A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, P. Seale, A. Asakura, M.A. Rudnicki// J Cell Biol. –1999. –V.144. –P.631–643.
101. Blais, A. An initial blueprint for myogenic differentiation./ A. Blais, M. Tsikitis, D. Acosta-Alvear, R. Sharan, Y. Kluger, D. Dynlacht.// Genes Dev.–2005.–V.19. –P.553–569.
102. Figueroa, A. Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes./ A. Figueroa, A. Cuadrado, J. Fan, U. Atasoy, G.E. Muscat, P. Munoz-Canoves, M. Gorospe, A. Munoz.// Mol Cell Biol.–2003.–V.23(14) .–P.4991–5004.
103. Higashioka, K. Myogenic Differentiation from MYOGENIN-Mutated Human iPS Cells by CRISPR/Cas9./ K. Higashioka, N. Koizumi, H. Sakurai, C. Sotozono, T. Sato.// Stem Cells Int.–2017.doi: 10.1155/2017/9210494. Epub 2017 Apr 4.
104. Moretti, I. MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity./ I. Moretti, S. Ciciliot, K.A. Dyar, R. Abraham, M. Murgia, L. Agatea, T. Akimoto, S.

- Bicciato, M. Forcato, P. Pierre, N.H. Uhlentaut, P.W. Rigby, J.J. Carvajal, B. Blaauw, E. Calabria, S. Schiaffino. // *NatCommun.* – 2016.doi: 10.1038/ncomms12397.
105. Weyemi, U. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses/ U. Weyemi, C. Dupuy // *Mutat Res.* – 2012. – V. 751. – № 2. – P. 77-81.
106. Chen, F. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system/ F. Chen, S. Haigh, S. Barman, D.J. Fulton // *Front Physiol.* – 2012. – V. 1. – № 3. – P. 412.
107. Brown, D.I. Nox proteins in signal transduction/ D.I. Brown, K.K. Griending // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – V. 47. – P. 1239–1253.
108. Buelna-Chontal, M. Redox Activation of Nrf2 & NF-κB: A double end sword?/ M. Buelna-Chontal, C. Zazueta. // *Cell Signal.* – 2013. – V. 13. – P. 242-248.
109. Костюк, С.В. Фрагменты внеклеточной ДНК усиливают транскрипционную активность генома мезенхимальных стволовых клеток человека, активируют TLR-зависимый сигнальный путь и ингибируют апоптоз/ С.В. Костюк, Е.М. Малиновская, А.В. Ермаков, Т.Д. Смирнова, Л.В. Каменева, О.В. Чвартацкая, П.А. Лосева, Е.С. Ершова, Л.Н. Любченко, Н.Н. Вейко // *Биомедицинская химия.* – 2012. – Т. 58. – № 6. – С. 673-683.
110. LeBel, C.P. Evaluation of the probe 2\_,7\_-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress/ C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – V. 5. – P. 227–231.
111. Seitz, N. A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data/ N. Seitz, M. Böttcher, S. Keiter, T. Kosmehl, W. Manz, H. Hollert, T. Braunbeck // *Mutat Res.* – 2008. – V. 652. – № 1. – P. 38-45.
112. Scully, R. Double strand break repair functions of histone H2AX/ R. Scully, A. Xie // *Mutat Res.* – 2013. – V. 750. – № 1-2. – P. 5-14.
113. Watson, S. Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses/ S. Watson, S. Mercier, C. Bye, J. Wilkinson, A. L. Cunningham, A. N. Harman// *Virology* – 2007.–V.4. –P. 130-133.
114. Vandesompele, J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes/ J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman// *Genome Biol.* –2002. –V.18. –P.3-7.

115. Tilli, T.M. A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases/T.M. Tilli, S. Castro, J.A. Tuszynski, N. Carels// BMC Genomics. –2016. –V.7(1). – P.639-671. doi: 10.1186/s12864-016-2946-1.
116. Wang, T. Selection of suitable housekeeping genes for real-time quantitative PCR in CD4(+) lymphocytes from asthmatics with or without depression/T1 Wang, ZA Liang, AJ Sandford, XY Xiong, YY Yang, YL Ji, JQ He// PLoS One. –2012. –V.7(10). e48367. doi: 10.1371/journal.pone.0048367. Epub 2012 Oct 24.
117. Santos, S.M. Interaction of fullerene nanoparticles with biomembranes: from the partition in lipid membranes to effects on mitochondrial bioenergetics/ S.M. Santos, A.M. Dinis, F. Peixoto, L. Ferreira, A.S. Jurado., R.A. Videira// Toxicol Sci. – 2014. – V.138. - №1. – P.117-129.
118. Tzur, A. Optimizing Optical Flow Cytometry for Cell Volume-Based Sorting and Analysis/ A. Tzur, J.K. Moore, P. Jorgensen, H.M. Shapiro, M.W. Kirschner// PLoS ONE. – V.6. – №1. - e16053.
119. Yin, J.J. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials/ J.J. Yi., F. Lao, P.P. Fu, W.G. Wamer, Y. Zhao, P.C. Wang. et al.// Chen Biomaterials. - 2009. - V.30. - №4. - P.611-21.
120. Marshall, N.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function// N.J. Marshall, C.J. Goodwin, S.J. Holt. // Growth Regul. – 1995. - V.5. – P. 69-84.
121. Chistyakov, V.A. Possible mechanisms of fullerene C<sub>60</sub> antioxidant action/ V.A. Chistyakov, Y.O. Smirnova, E.V. Prazdnova, A.V. Soldatov// Biomed Res Int. – 2013. – P.821498. doi: 10.1155/2013/821498.
122. Nakagawa, Y. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction/ Y. Nakagawa, T. Suzuki, H. Ishii, D. Nakae, A. Ogata// Arch Toxicol.- 2011. – V.85. – P.1429-1440.
123. Dellinger, A. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells/ A. Dellinger, Z. Zhou, S.K. Norton, R. Lenk, D. Conrad, C.L. Kepley.// Nanomedicine. – 2010. - V.6. №4. – P.575-582.
124. Holder, A.L. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays/ A.L. Holder, R. Goth-Goldstein, D. Lucas, C.P. Koshland// Chem Res Toxicol. – 2012. – V.17. - P. 1885-1892.

125. Lupu, A.R. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO<sub>2</sub> nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays/ A.R. Lupu, T. Popescu// *Toxicol In Vitro*. – 2013. - V.27. №5. – P.1445-1450.
126. Ershova, E.S. Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts/ E.S. Ershova, V.A. Sergeeva, A.I. Chausheva, D.G. Zheglo, V.A. Nikitina, T.D. Smirnova, L.V. Kameneva, L.N. Porokhovnik, S.I. Kutsev, P.A. Troshin, I.I. Voronov, E.A. Khakina, N.N. Veiko, Kostyuk S.V.// *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. – 2016/ - V.805. – P.46-57. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.05.004.
127. Weyemi, U. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses/ U. Weyemi, C. Dupuy // *Mutat Res*. – 2012. – V. 751. – №2. – P. 77-81.
128. Sedelnikova, O.A. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis/ O.A. Sedelnikova, C.E. Redon, J.S. Dickey, A.J. Nakamura, A.G. Georgakilas, W.M. Bonner // *Mutat.Res*. – 2010. – V. 704. – P. 152–159.
129. Lambeth, J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy/ J.D. Lambeth // *Free Radic Biol Med*. – 2007. – V. 43. – №3. – P. 332-347
130. Cossarizza, A. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry/ A. Cossarizza, R. Ferraresi, L. Troiano, E. Roat, L. Gibellini, L. Bertoncelli, M. Nasi, M. Pinti // *Nat Protoc*. – 2009. – V. 4. – № 12. – P. 1790-1797.
131. Zhu, H. Oxidation pathways for the intracellular probe 2\_,7\_-dichlorofluorescein/ H. Zhu, G.L. Bannenberg, P. Moldeus, H.G. Shertzer // *Arch. Toxicol*. – 1994. – V. 68. – P. 582-587.
132. Beuerle, F. Antioxidant Properties of Water-Soluble Fullerene Derivatives/ Cataldo F., Da Ros T. (eds) *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes. Carbon Materials: Chemistry and Physics*. –2008. – V.1. – Springer, Dordrecht.
133. Cave A.C. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease / A.C. Cave, A. Brewer, R. Narayanapanicker, D.J. Ray, S. Grieve, S. Walker, A.M. Shah // *AntioxidRedoxSignal*. – 2006. - V.8. – P. 691–728.
134. Weyemi, U. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses/ U. Weyemi, C. Dupuy // *Mutat Res*. – 2012. – V. 751. – № 2. – P. 77-81.

135. Chen, F. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system/ F. Chen, S. Haigh, S. Barman, D.J. Fulton // *Front Physiol.* – 2012. – V. 1. – №3. – P. 412.
136. Schroder, K. Nox 4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase/ K. Schroder, M. Zhang, S. Benkhoff, A. Mieth, R. Pliquett, J. Kosowski et al. // *Circ. Res.* – 2012. – V. 110. – P. 1217–1225.
137. Chen, F. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system/ F. Chen, S. Haigh, S. Barman, D.J. Fulton // *Front Physiol.* – 2012. – V. 1. – №3. – P. 412
138. Ding, Y. Inhibition of Nox-4 activity by plumbagin, a plant-derived bioactive naphthoquinone./ Y. Ding, Z.J. Chen, S. Liu, D. Che, M. Vetter, C.H. Chang. // *J Pharm Pharmacol.* – 2005. – V. 57(1). – P. 111-116.
139. Kim, H.J. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure/ H.J. Kim, N.D. Vaziri // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2010. – V. 298. – P. 662-671.
140. Kostyuk, S.V. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts/ S.V. Kostyuk, V.J. Tabakov, V.V. Chestkov, M.S. Konkova, K.V. Glebova, G.V. Baydakova, E.S. Ershova, V.L. Izhevskaya, A. Baranova, N.N. Veiko // *Mutat Res.* – 2013. – V. 747-748. – P. 6-18.
141. Collins, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay/ A.R. Collins // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V. 13. – P. 150-155.
142. Kornev, A.B. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60]fullerene using chlorofullerene C<sub>60</sub>Cl<sub>16</sub> as a precursor/ A.B. Kornev, E.A. Khakina, S.I. Troyanov, A.A. Kushch, A. Peregudov, A. Vasilchenko, D.G. Deryabin, V.M. Martynenko, P.A. Troshin // *Chem Commun (Camb).* – 2012. – V. 48. – P. 5461-5463.
143. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Tabakov V.J., Kameneva L.A., Porokhovnik L.N., Voronov I.I., Khakina E.A., Troshin P.A., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Functionalized Fullerene Increases NF- $\kappa$ B Activity and Blocks Genotoxic Effect of Oxidative Stress in Serum-Starving Human Embryo Lung Diploid Fibroblasts // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016. vol. 2016, Article ID 9895245, 17 pages.
144. Guillaud, S. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF7)./ S. Guillaud, D. du Manoir, D. Seigneurin. // *Anal Cell Pathol.* – 1989. – V. 11. – P. 25–39.

145. Lambert, P.F. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP./ P.F. Lambert, F. Kashanchi, M.F. Radonovich, R.Shiekhattar, J.N. Brady //J Biol Chem. –1998. –V.273. –P.33048-33053.
146. May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein./ P. May, E.May // Oncogene. – 1999. – V.18. – P.7621-7636.
147. Baldwin, A.S. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529/ A.S Baldwin Jr., D. Wang // J. Biol. Chem. –1998. –V.273. –P. 29411–29416.
148. Kuznetsov, A.V. Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods/ A.V. Kuznetsov, I. Kehrer, A.V. Kozlov, M. Haller, H. Redl, M. Hermann, M. Grimm, J. Troppmair// Anal Bioanal Chem. – 2011. – V.400. – P.2383-2390.
149. Klionsky, D.J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)/ D.J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, and al.// Autophagy. – 2016. – V.12. – P.1-222.
150. Bai, G. A far-upstream AP-1/Smad binding box regulates human NOX4 promoter activation by transforming growth factor- $\beta$ / G. Bai, T.D. Hock, N. Logsdon, Y. Zhou, V.J. Thannickal// Gene. –2014. –V.540. –P. 62-67.
151. Moriyama, T. The Rho-ROCK system as a new therapeutic target for preventing interstitial fibrosis/ T. Moriyama, K. Nagatoya.// Drug News Perspect. –2004. –V.17. –P.29-34.
152. Ji, H. Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- $\beta$ /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation/ H. Ji, H. Tang, H. Lin, J. Mao, L. Gao, J. Liu, T. Wu.// Biomed Rep. –2014. –V.2. –P.787-792.
153. Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species// J Cell Biol. – 2011. –V.194(1) –P.7–15. PMID: PMC3135394
154. Ansari, S. Muscle Tissue Engineering Using Gingival Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in Alginate Hydrogels Containing Multiple Growth Factors/ S. Ansari, C. Chen, X. Xu, N. Annabi, H.H. Zadeh, B.M. Wu, A. Khademhosseini, S. Shi, A. Moshaverinia.//Ann Biomed Eng. – 2016. –V.44(6). –P.1908-20.
155. Wilschut, K.J. Concise Review: Stem Cell Therapy for Muscular Dystrophies/K.J. Wilschut, V.B. Ling, H.S. Bernstein// Stem Cells Transl Med. –2012. –V.1(11). –P.833–842.

156. Le Blanc, K. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation/ K. Le Blanc, O. Ringden// *Biol Blood Marrow Transplant.* –2005. –V.11. –P.321–334.
157. Almalki, S.G. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells/ S.G. Almalki, D.K. Agrawal// *Differentiation.* –2016. –V.92(1-2).–P.41-51. doi: 10.1016/j.diff.2016.02.005. Epub 2016 Mar 21.
158. Mok, G.F. Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle/ G.F. Mok, D. Sweetman// *Reproduction.* –2011. –V.141(3). –P.301-312.
159. Tomczak, K.K. Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation/ K.K. Tomczak, V.D. Marinescu, M.F. Ramoni, D. Sanoudou, F. Montanaro, M. Han, L.M. Kunkel, I.S. Kohane, A.H. Beggs// *FASEB Journal.* – 2004. – V.18(2). –P.403–405.
160. Sun, L. Ubiquitinproteasome-mediated degradation, intracellular localization, and protein synthesis of MyoD and Id1 during muscle differentiation/ L. Sun, J.S. Trausch-Azar, A. Ciechanover, A.L. Schwartz// *J Biol Chem.* – 2005. –V.280(28). –P.26448–26456.
161. Batonnet-Pichon, S. MyoD undergoes a distinct G2/M-specific regulation in muscle cells/ Batonnet-Pichon S, Tintignac LJ, Castro A, Sirri V, Leibovitch MP, Lorca T, Leibovitch SA. // *Exp Cell Res.* – 2006. –V.312(20). –P.3999–4010.
162. Acharya, S.(2R,3S,2''R,3''R)-Manniflavanone protects proliferating skeletal muscle cells against oxidative stress and stimulates myotube formation/ S. Acharya, T.D. Stark, S.T. Oh, S. Jeon, S.C. Pak, M. Kim, J. Hur, T. Matsutomo, T. Hofmann, R.A. Hill, O.B. Balemba // *J Agric Food Chem.* – 2017.– V. 65. – № 18. – P. 3636-3646.
163. LeBel, C.P. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress/ C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – V. 5. – P. 227–231.
164. Royall, J.A. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells/ J.A. Royall, H. Ischiropoulos // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1993. – V. 302. – P. 348-355.
165. Delaney, K. The role of TGF-β1 during skeletal muscle regeneration/ K. Delaney, P. Kasprzycka, M.A. Ciemerych, M. Zimowska // *Cell Biol Int.* – 2017.– V. 41. – № 7. – P. 706-715.

166. Jang, Y.N. JAK-STAT pathway and myogenic differentiation/ Y.N. Jang, E.J. Baik // JAKSTAT. – 2013. – V. 2. – № 2. – P. 23282 1-6.
167. Lv, F. Inhibitory effects of mild hyperthermia plus docetaxel therapy on ER(+/-) breast cancer cells and action mechanisms/ F. Lv, Y. Yu, B. Zhang, D. Liang, Z.M. Li, W. You // J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. – 2013. – V. 33. – № 6. – P. 870-876.
168. Dizdaroglu, M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin/ M. Dizdaroglu //M. Mutat. Res. – 1992. – V. 275. – № 3-6. – P. 331-342.
169. Lobrich, M. H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair. Strengths, limitations and optimization/ M. Lobrich, A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A.A. Goodarzi, O. Barton, P.A. Jeggo // Cell Cycle. – 2010. – № 9. – P. 662-669.
170. Ermakov, A.V. An extracellular DNA mediated bystander effect produced from low dose irradiated endothelial cells/ A.V. Ermakov, M.S. Konkova, S.V. Kostyuk, T.D. Smirnova, E.M. Malinovskaya, L.V. Efremova, N.N. Veiko // Mutat Res. – 2011. – №712. –P. 1-10.
171. Goodarzi, A.A. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks/ A.A. Goodarzi, P.A. Jeggo // Adv. Genet. – 2013. – №82. – P. 1-45.
172. Mermershtain, I. Structural mechanisms underlying signaling in the cellular response to DNA double strand breaks/ I. Mermershtain, J.N. Glover //Mutat. Res. – 2013. – №750. – P. 15-22.
173. Wu, J. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA/ J. Wu, L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen et al. // Science. – 2013. – №339. – P. 826-830.
174. Abdelwahid, E., Rolland S., Teng X., Conradt B., Hardwick J.M., White K. Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes/ E. Abdelwahid, S. Rolland, X. Teng, B. Conradt, J.M. Hardwick, K. White // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – №1813. – P. 597-607.