

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.02.30-39>

## Влияние производных фуллеренов $C_{70}$ на транскрипционную активность генов оксидативного метаболизма

Савинова Е.А.<sup>1</sup>, Сергеева В.А.<sup>1</sup>, Ершова Е.С.<sup>1</sup>, Проскурнина Е.В.<sup>1</sup>, Каменева Л.В.<sup>1</sup>, Долгих О.А.<sup>1</sup>, Салимова Т.А.<sup>1</sup>, Вейко Н.Н.<sup>1</sup>, Краевая О.А.<sup>2</sup>, Трошин П.А.<sup>2</sup>, Костюк С.В.<sup>1</sup>

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова»  
15522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1.

2 — Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН  
142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр. Академика Семенова, д. 1

Задачей данного исследования являлось изучение влияния водорастворимых арильных производных фуллерена  $C_{70}$  на транскрипционную активность генов, регулирующих оксидативный метаболизм.

**Методы.** На культуре эмбриональных фибробластов легких человека исследованы токсичность двух производных  $C_{70}$  с минорными изменениями структуры при помощи МТТ-теста, уровень внутриклеточных активных форм кислорода, экспрессия генов и белков NOX4 и NRF2. Использованы методы флуоресцентной микроскопии, ПЦР-ОТ в реальном времени, проточной цитофлуориметрии.

**Результаты.** Оба соединения в равной мере вызывали снижение уровня внутриклеточных активных форм кислорода в течение суток, повышение экспрессии гена и белка NOX4 и повышение экспрессии гена и белка NRF2. Вероятно, повышение экспрессии NOX4 является компенсаторным в ответ на развитие внутриклеточного антиоксидантного ответа, а повышение экспрессии NRF2 является компенсаторным в ответ на активацию NOX4.

**Заключение.** Модификация поверхности заместителями, усиливающими антиоксидантные свойства вещества, приводит к изменению механизма влияния наночастиц на генетический аппарат клетки, при этом минорные различия в структуре заместителей не оказывают значимого влияния на эффекты.

**Ключевые слова:** фуллерен  $C_{70}$ , модифицированные фуллерены, оксидативный стресс, NOX4, NRF2.

**Для цитирования:** Савинова Е.А., Сергеева В.А., Ершова Е.С., Проскурнина Е.В., Каменева Л.В., Долгих О.А., Салимова Т.А., Вейко Н.Н., Краевая О.А., Трошин П.А., Костюк С.В. Влияние производных фуллеренов  $C_{70}$  на транскрипционную активность генов оксидативного метаболизма. *Медицинская генетика* 2023; 22(2): 30-39.

**Автор для корреспонденции:** Савинова Екатерина Алексеевна; e-mail: savinova.ekaterina96@yandex.ru

**Финансирование.** Работы по синтезу водорастворимых производных фуллеренов поддержаны Российским научным фондом (проект №19-13-00411-П), исследование токсичности и антиоксидантной активности поддержаны Российским научным фондом (проект 18-15-00437 П), исследование флуоресценции производных фуллеренов в клетках человека выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 10.02.2023

## Effect of $C_{70}$ fullerene derivatives on the transcriptional activity of genes of oxidative metabolism

Savinova E.A.<sup>1</sup>, Sergeeva V.A.<sup>1</sup>, Ershova E.S.<sup>1</sup>, Proskurnina E.V.<sup>1</sup>, Kameneva L.V.<sup>1</sup>, Dolgikh O.A.<sup>1</sup>, Salimova T.A.<sup>1</sup>, Veiko N.N.<sup>1</sup>, Regional O.A.<sup>2</sup>, Troshin P.A.<sup>2</sup>, Kostyuk S.V.<sup>1</sup>

1 — Research Center for Medical Genetic  
1, Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

2 — Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences  
1, Academician Semenov avenue, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russian Federation

**Objective.** We aimed to study the effect of water-soluble aryl  $C_{70}$  fullerene derivatives on the transcriptional activity of genes regulating oxidative metabolism.

**Methods.** The toxicity of two derivatives of  $C_{70}$  with minor changes in the structure was studied using the MTT test on a culture of human embryonic lung fibroblasts as well as intracellular reactive oxygen species, expression of NOX4 and NRF2 genes and proteins. Fluorescence microscopy, real-time PCR-RT, and flow cytometry were used.

**Results.** Both compounds equally caused a decrease in intracellular ROS during the day, an increase in the expression of the NOX4 gene and protein, and an increase in the expression of the NRF2 gene and protein. Probably, an increase in NOX4 expression is compensatory in response to the development of an intracellular antioxidant state, and an increase in NRF2 expression is compensatory in response to NOX4 activation.

**Conclusion.** Modification of the surface with substituents that enhance the antioxidant properties of the substance leads to a change in the mechanism of the influence of nanoparticles on genes, while minor differences in the structure of substituents do not significantly determine the effects.

**Keywords:** C<sub>70</sub> fullerene, modified fullerenes, oxidative stress, NOX4, NRF2.

**For citation:** Savinova E.A., Sergeeva V.A., Ershova E.S., Proskurnina E.V., Kameneva L.V., Dolgikh O.A., Salimova T.A., Veiko N.N., Regional O.A., Troshin P.A., Kostyuk S.V. Effect of C<sub>70</sub> fullerene derivatives on the transcriptional activity of genes of oxidative metabolism. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2023; 22(2): 30-39. (In Russ.)

**Corresponding author:** Ekaterina A. Savinova; **e-mail:** savinova.ekaterina96@yandex.ru

**Funding.** Works on the synthesis of water-soluble fullerene derivatives were supported by the Russian Science Foundation (project No. 19-13-00411-P), the study of toxicity and antioxidant activity was supported by the Russian Science Foundation (project 18-15-00437 P), the study of the fluorescence of fullerene derivatives in human cells performed within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflicts of interest.

**Accepted:** 10.02.2023

## Введение

Активное внедрение нанотехнологий в различные сферы медицины привело к появлению такой отрасли, как наномедицина. Это современное направление изучает свойства и применение материалов и устройств размером от 1 до 100 нм для диагностики и лечения заболеваний. Среди возможностей наномедицины адресная доставка лекарственных веществ, создание новых противораковых и противовирусных препаратов, а также диагностика с использованием наноматериалов [1-3].

Фуллерены благодаря уникальным электронным свойствам могут быть успешно использованы в наномедицине [4]. Возможность модифицирования их поверхности позволяет варьировать биохимические свойства в широком диапазоне, а разработка методов синтеза водорастворимых производных дает возможность применения к биологическим объектам, в том числе культивируемым клеткам [5-8].

Несмотря на многочисленные исследования, воздействие наносоединений на молекулярно-генетический аппарат клетки на сегодняшний день изучено недостаточно. В частности, важным аспектом представляется их воздействие на метаболизм активных форм кислорода (АФК), накопление которых в результате повышенного уровня их синтеза и/или сниженной активности антиоксидантных систем приводит к повреждениям клеточной ДНК. Фуллерены и их водорастворимые производные являются мощными акцепторами свободных радикалов, что делает соединения этого класса активными участниками оксидативного метаболизма [9]. В ходе исследования биологического действия водорастворимых производных C<sub>60</sub> на клетки человека выяснилось, что они вызывают активацию ряда генов в клетках [10-12], при этом ответ зависел не только от природы функциональных групп, присоединенных к фуллерену, но и от типа клетки.

Наиболее хорошо изучен самый распространенный фуллерен C<sub>60</sub> [13], в то время как биохимические свойства C<sub>70</sub> и его производных исследованы существенно меньше. Фуллерен C<sub>70</sub> отличается вставкой десяти углеродных атомов в экваториальную область C<sub>60</sub>, вследствие этого молекула приобретает эллипсоидную форму; ее электронные свойства изменяются, что отражается и на биохимических свойствах. Так, C<sub>70</sub> проявляет более выраженную прооксидантную активность по сравнению с C<sub>60</sub> [14]. Задачей данного исследования являлось изучение влияния двух водорастворимых арильных производных фуллерена C<sub>70</sub> на транскрипционную активность генов, регулирующих оксидативный метаболизм.

## Методы

### Синтез фуллеренов

Арильные производные фуллерена C<sub>70</sub> с условным обозначением Ф1 и Ф2 синтезировали из хлорфуллерена C<sub>70</sub>Cl<sub>8</sub> как описано в работе [15] (рис. 1). Производное Ф1 (водорастворимое производное фуллерена C<sub>70</sub> с восьмью присоединенными остатками калиевой соли 2-(3-фенилпропил)малоновой кислоты) было охарактеризовано ранее [16]. Производное фуллерена Ф2 (водорастворимое производное фуллерена C<sub>70</sub> с восьмью присоединенными остатками калиевой соли метил 2-([1,1'-бифенил]-4-ил)уксусной кислоты) в форме полного метилового эфира (Ф2-ОМе) было получено впервые в реакции хлорфуллерена C<sub>70</sub>Cl<sub>8</sub> с метил 2-([1,1'-бифенил]-4-ил)ацетатом по методике, описанной в работе [15]. Кислотный гидролиз сложноэфирных групп соединения Ф2-ОМе позволил получить соответствующую кислоту Ф2-ОН, обработка которой карбонатом калия привела к образованию водорастворимой калиевой соли Ф2.

### Культивирование клеток

В экспериментах *in vitro* использованы культуры эмбриональных фибробластов легких человека (ФЛЭЧ) из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ» 2–6-го пассажей. Культуры клеток для проведения научной работы получены с соблюдением этических норм в рамках проведения научных исследований. Различные концентрации производных фуллерена добавляли к среде культивирования, клетки культивировали в присутствии соединений от 1 до 72 часов.

### Оценка токсичности и уровня внутриклеточных АФК

Для определения токсичности соединений в отношении культур клеток проводили стандартный МТТ-тест с детекцией на планшетном ридере («EnSpire», Финляндия).

Уровень АФК определяли с помощью красителя 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) («Molecular Probes/Invitrogen», «СА», США), который под действием АФК окисляется с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF). Уровень АФК детектировали методами флуоресцентной микроскопии (AxioVert, «Carl Zeiss Microscopy», Германия), проточной цитометрии (Partec CyFlow® ML, Германия) и с использованием планшетного ридера («EnSpire», Финляндия).

### Исследование экспрессии генов и белков

Уровень экспрессии белков определяли путём проточной цитофлуориметрии с использованием специфичных антител на приборе CyFlow Space (Partec, Германия). Уровень экспрессии генов оценивали

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. После воздействия фуллеренов из клеток выделяли РНК с использованием наборов YellowSolve («Клоноген», Россия) согласно стандартной методике с последующими фенол-хлороформной экстракцией и осаждением хлороформом и изопропиловым спиртом (49:1). Концентрацию РНК определяли с помощью красителя Quant-iT RiboGreen RNA reagent («MoViТес», Германия) на планшетном ридере («EnSpire equipment», Финляндия)  $\lambda_{ex} = 487$  нм,  $\lambda_{fl} = 524$  нм. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью реактивов фирмы «Силекс» (Россия) согласно стандартной методике. ПЦР проводили с использованием соответствующих праймеров («Синтол») и интеркалирующего красителя SybrGreen на приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США).

### Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph. При анализе предполагаемых различий между выборками исходили из гипотезы об отсутствии различий, которую проверяли с помощью расчета U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,01$ .

### Результаты

#### Исследование токсического действия фуллеренов на клетки

Для оценки цитотоксичности исследуемых соединений был проведен стандартный МТТ-тест. Реакция происходит путем восстановления бесцветного

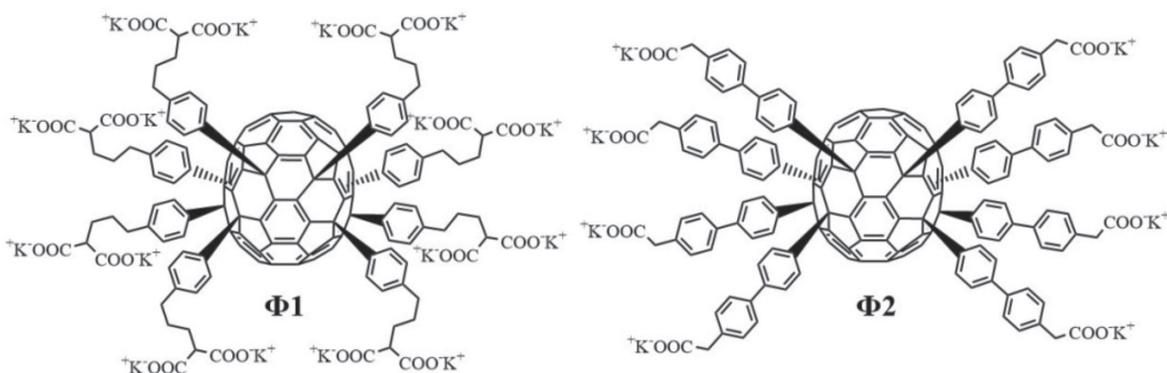


Рис. 1. Структурные формулы исследованных фуллеренов.

Fig. 1. The structure of the studied fullerenes.

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами до пурпурного формазана, что подтверждает наличие живых функционирующих клеток. Образование формазана детектируется спектрофотометрически. Для проведения теста в течение 24 часов инкубировали клетки ФЛЭЧ с производными Ф1 и Ф2 в широком диапазоне концентраций от 0,2 нМ до 0,4 мМ, что позволило определить границы токсичности (рис. 2).

Соединение Ф1 является токсичным при концентрации выше 52 мкМ, соединение Ф2 является токсичным при концентрации выше 0,4 мМ. На основании МТТ-теста была выбрана концентрация фуллеренов для дальнейшего исследования примерно в середине нетоксичного диапазона — 0,4 мкМ.

#### Проникновение фуллеренов в клетки

Оба производных Ф1 и Ф2 обладают собственной флуоресценцией в красной области спектра с максимумом флуоресценции 629 нм (Ф1) и 715 нм у Ф2. Наличие собственной флуоресценции позволило детектировать проникновение фуллеренов в клетки. В течение первых 60 минут Ф1 и Ф2 проникают в цитоплазму клеток, максимум флуоресценции фуллеренов в клетках приходится на 3 часа после их добавления в среду культивирования. В течение 24 часов Ф1 и Ф2 остаются в клетках.

На рис. 3 приведен пример флуоресценции соединения Ф1 через 24 часа после добавления к клеткам. На большом увеличении видны места локализации Ф1 в клетке. Аналогичную картину флуоресценции наблюдали для производного Ф2.

#### Уровень внутриклеточных АФК

Уровень АФК в клетках после воздействия Ф1 и Ф2 исследовали с помощью реагента H2DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). После проникновения через плазматическую мембрану клетки реагент деацетируется внутриклеточными эстеразами. Нефлуоресцирующий DCFH в цитоплазме окисляется свободными радикалами до интенсивно флуоресцирующего DCF. Соединения Ф1 и Ф2 в концентрации 0,4 мкМ были введены во флаконы с клетками ФЛЭЧ на 3 и 24 часа. В качестве контроля использовали клетки, культивирующиеся без воздействия фуллеренов, и среда без клеток (фон). После инкубации добавляли H2DCFH-DA и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра (рис. 4).

При воздействии соединений Ф1 и Ф2 в концентрации 0,4 мкМ на фибробласты уровень АФК снижается на протяжении 3 часов после инкубации и немного медленнее в течение 24 часов.

Количественные данные, свидетельствующие о влиянии производных фуллеренов на уровень АФК в ФЛЭЧ, полученные на проточном цитофлуориметре, подтвердили независимым методом. На рис. 5а приведена зависимость уровня АФК в клетках от времени инкубации при действии Ф1, зарегистрированная на планшетном ридере. По окончании времени воздействия фуллерена на клетки добавляли раствор H2DCFH-DA и анализировали изменение флуоресценции сигнала (длины волн  $\lambda_{ex} = 495$  нм,  $\lambda_{fl} = 526$  нм) в зависимости от времени инкубации клеток в присутствии красителя. Флуоресценция DCF нарастала

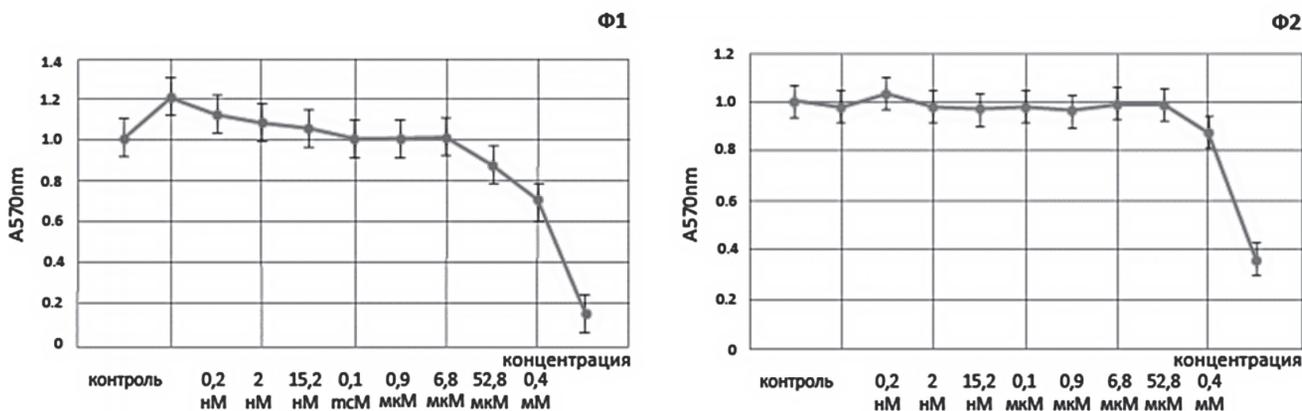
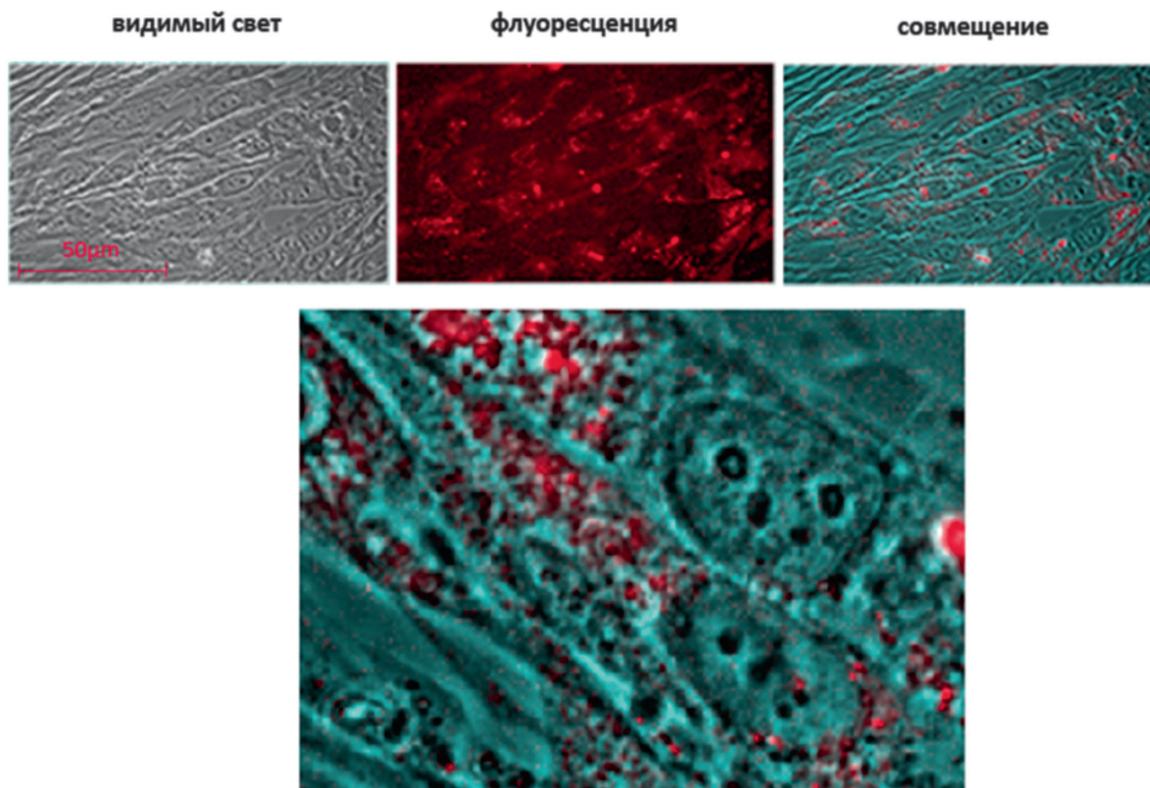


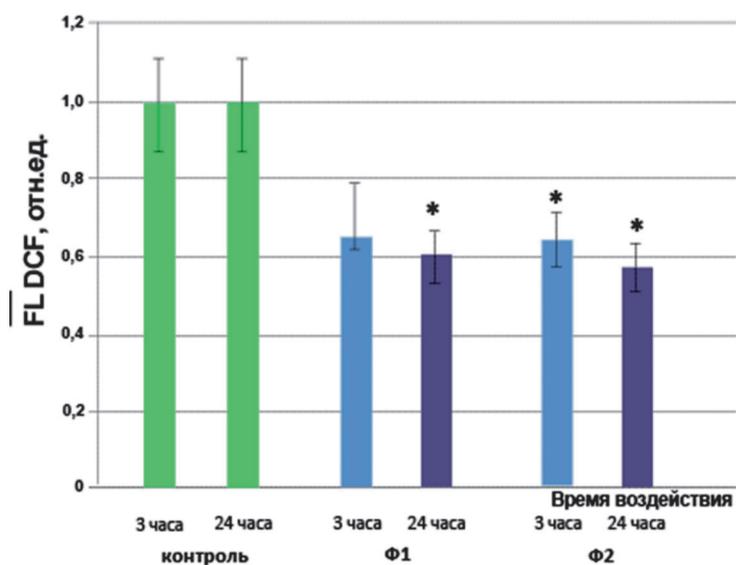
Рис. 2. МТТ-тест: по оси X – концентрации фуллеренов Ф1 (слева) и Ф2 (справа); по оси Y – оптическая плотность при 570 нм.

Fig. 2. MTT test: on the X axis, the concentrations of fullerenes F1 (left) and F2 (right); on the Y axis, optical density at 570 nm.



**Рис. 3.** Локализация фуллерена Ф1 (0,4 мкМ) в клетках ФЛЭЧ через 24 часа после добавления к среде культивирования; верху – увеличение 40х, внизу – увеличение 100х.

**Fig. 3.** Localization of F1 fullerene (0.4 µM) in human embryonic lung fibroblasts 24 hours after addition to the culture medium; top – 40x magnification, bottom – 100x magnification.



**Рис. 4.** Зависимость синтеза АФК в клетках от времени инкубации (в течение 3 и 24 часов) с фуллеренами Ф1 и Ф2 (концентрация 0,4 мкМ); (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 4.** Dependence of ROS synthesis in cells on the time of incubation (for 3 and 24 hours) with F1 and F2 fullerenes (concentration 0.4 µM); (\*) Significant differences from control cells,  $p < 0.01$ , nonparametric U-test.

во времени, причем угол наклона между кривой и осью X отражает скорость синтеза DCF ( $k$ ). Для получения величины угла наклона применяли линейную аппроксимацию, при этом коэффициенты линейной регрессии были не ниже 0,96 ( $p < 0,001$ ). Скорость синтеза DCF отражает количество АФК в клеточной культуре. Результаты представлены в виде отношения констант скорости синтеза  $k_i/k_0$  (рис. 5б).

Таким образом, воздействие соединений Ф1 и Ф2 на скорость синтеза АФК в ФЛЭЧ в концентрации 0,4 мкМ значительно снижает уровень синтеза АФК по отношению к контролю, как при 3-х часовой, так и при суточной инкубации.

### Экспрессия NOX4

Одним из основных участников АФК-метаболизма в фибробластах является NADPH-оксидаза NOX4, катализирующая синтез пероксида водорода. Регуляция активности АФК ферментом NOX4 происходит в основном на транскрипционном уровне. Исследовали уровень экспрессии мРНК фермента NOX4 методом ПЦР в реальном времени после инкубации ФЛЭЧ

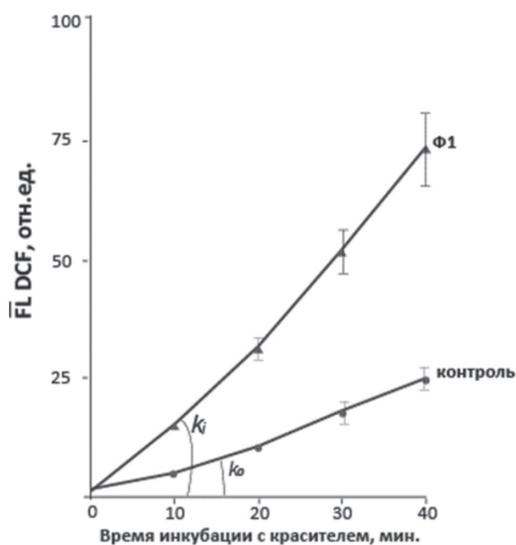
с соединениями Ф1 и Ф2 (0,4 мкМ) в течение 3 и 24 часов (рис. 6а).

Видно, что уровень экспрессии гена NOX4 при добавлении исследуемых соединений в течение 3 часов практически не отличается от контроля, но через 24 часа картина существенно меняется, и уровень экспрессии гена NOX4 статистически значимо увеличивается в 1,6 – 1,8 раз ( $p < 0,01$ ) (рис. 6а).

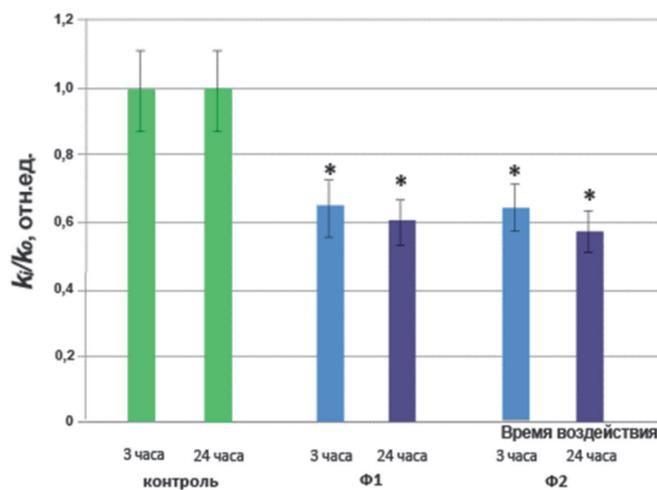
Далее проверяли влияние производных фуллерена C<sub>70</sub> Ф1 и Ф2 на синтез белка NOX4. Количество белка определяли методом проточной цитофлуориметрии, гистограммы строили с использованием среднего значения FL1-NOX4 (рис. 6б). Уровень белка NOX4 при введении Ф1 и Ф2 в первые 3 часа не отличался от контроля, через 24 часа возрастал в 1,8 – 2,4 раза ( $p < 0,01$ ), при этом не было обнаружено корреляции между средним значением экспрессии белка NOX4 и уровнем АФК.

### Экспрессия NRF2

Одним из главных транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию антиоксидантных



(а)



(б)

**Рис. 5.** (А) Уровень АФК в клетках ФЛЭЧ при действии фуллерена Ф1. Клетки культивировали 3 часа в присутствии Ф1 или без фуллерена (контроль). (Б) Гистограмма отношения констант скорости синтеза  $k_i/k_0$  АФК в клетках в зависимости от времени инкубации (в течение 3 и 24 часов) с фуллеренами Ф1 и Ф2 (концентрация 0,4 мкМ); (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 5.** (A) ROS level in human embryonic lung fibroblasts under the action of F1 fullerene. Cells were cultured for 3 hours in the presence of F1 or without fullerene (control). (B) Histogram of the ratio of ROS synthesis rate constants  $k_i/k_0$  in cells depending on the time of incubation (for 3 and 24 hours) with F1 and F2 fullerenes (concentration 0.4  $\mu$ M); (\*) Significant differences from control cells,  $p < 0.01$ , nonparametric U-test.

белков, является NRF2 (*Nuclear Factor–Erythroid-2–Related Factor 2*). При окислительном стрессе NRF2, не удерживаемый белком KEAP1, накапливается в цитоплазме и перемещается в ядро, где связывается с ARE (antioxidant response element) цис-регуляторными элементами, регулируемыми экспрессию антиоксидантных генов и белков. Активация NRF2 приводит к индукции многих цитопротекторных белков. Экспериментально показанное влияние фуллеренов Ф1 и Ф2 на уровень АФК и фермента NOX4 позволило предположить, что они могут также оказывать влияние на транскрипционный фактор NRF2. Поэтому изучали действие производных фуллерена C<sub>70</sub> Ф1 и Ф2 на уровень экспрессии NRF2 в клетках ФЛЭЧ (рис. 7а).

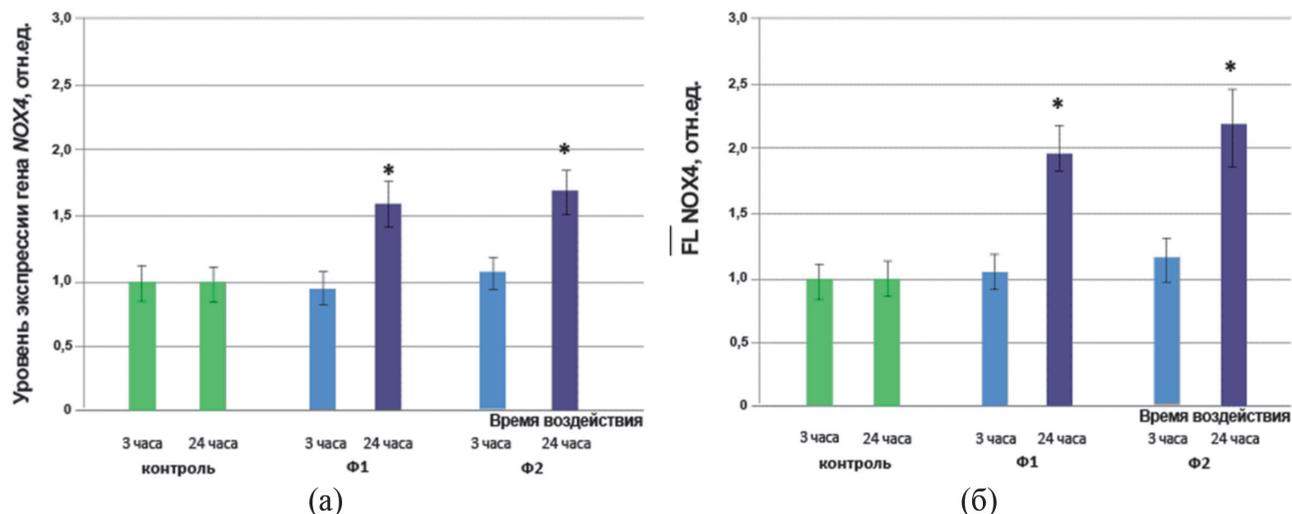
Соединения Ф1 и Ф2 оказывали значимое влияние на уровень транскрипции гена *NRF2*, повышая его в 2 раза ( $p < 0,01$ ). Далее проанализировали влияние Ф1 и Ф2 в ФЛЭЧ на уровень белка NRF2 методом проточной цитофлуориметрии (рис. 7б). Как видно из графиков, уровень белка NRF2 возрастал в 2,6–3,2 раза ( $p < 0,01$ ).

Активность транскрипционного фактора NRF2 зависит от его локализации, NRF2 в контроле локализован преимущественно в цитоплазме. Исследуе-

мые соединения Ф1 и Ф2 вызывали повышение экспрессии NRF2 как в цитоплазме, так и в ядре фибробластов (рис. 8).

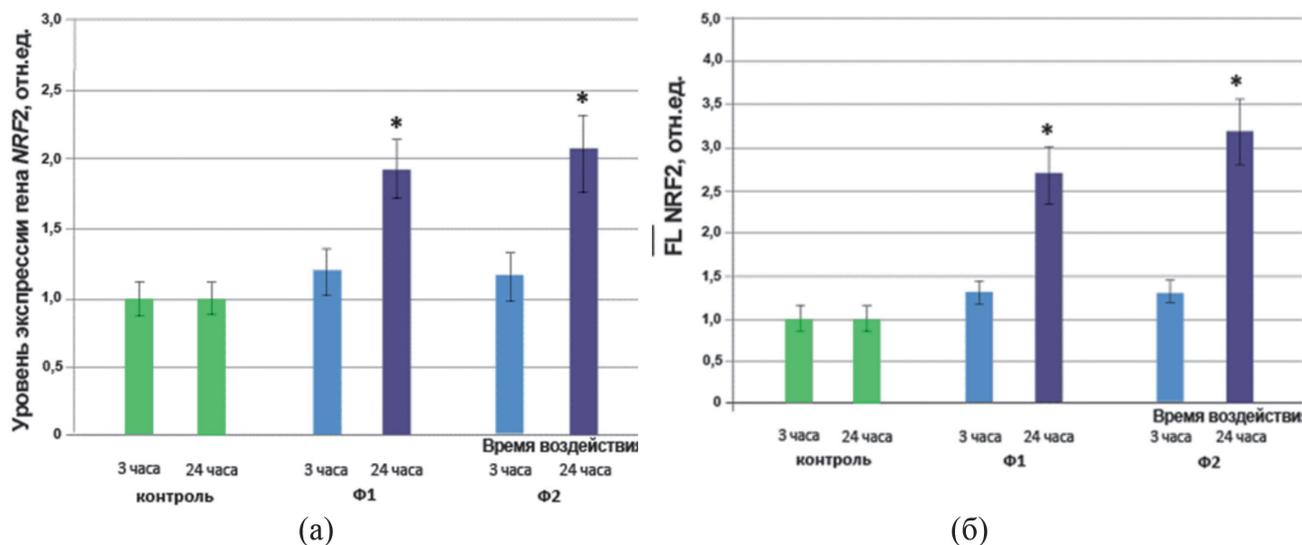
### Обсуждение

На основе экспериментальных данных можно предположить следующий механизм влияния производных фуллеренов на ФЛЭЧ. При введении соединений в клеточную среду фуллерены активно поглощают АФК за счет двойных сопряженных связей в каркасе. В ответ на снижение уровня АФК повышается транскрипционная активность гена *NOX4*. Спустя 24 часа после введения производных фуллерена C<sub>70</sub> Ф1 и Ф2 происходит увеличение уровня транскрипционной активности фермента NOX4 и, соответственно, уровня АФК. При этом Ф1 и Ф2 пролонгировано оказывают антиоксидантное действие без развития вторичного окислительного стресса в клетках (рис. 9). Вероятно, что такое пролонгированное антиоксидантное действие вызвано активацией транскрипционной активности мастер-регулятора антиоксидантного ответа NRF2. Активация NRF2, предположительно, является компенсаторной в ответ на повышение экспрессии NOX4.



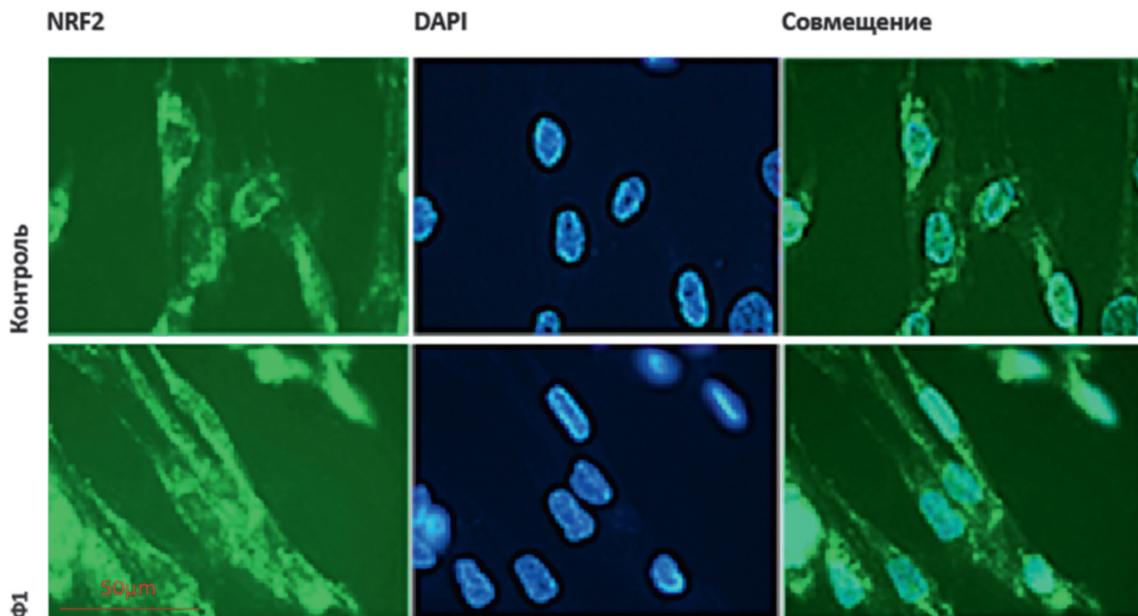
**Рис. 6.** Гистограммы, отражающие уровень экспрессии (А) гена *NOX4* и (Б) белка *NOX4* в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии Ф1 и Ф2 в концентрации 0,4 мкМ; (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 6.** Histograms reflecting the level of expression of (A) the *NOX4* gene and (B) the *NOX4* protein in human embryonic lung fibroblasts during incubation for 3 and 24 hours in the presence of F1 and F2 fullererenes at a concentration of 0.4  $\mu\text{M}$ ; (\*) Significant differences from control cells,  $p < 0.01$ , nonparametric U-test.



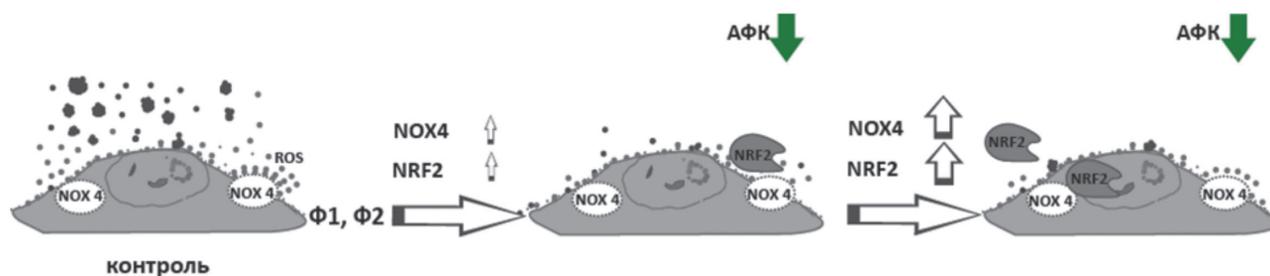
**Рис. 7.** Уровень экспрессии (А) гена *NRF2* и (Б) белка NRF2 в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии Ф1 и Ф2 в концентрации 0,4мкМ; (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 7.** The level of expression of (A) the *NRF2* gene and (Б) the NRF2 protein in human embryonic lung fibroblasts during incubation for 3 and 24 hours in the presence of F1 and F2 fullerenes at a concentration of 0.4  $\mu\text{M}$ ; (\*) Significant differences from control cells,  $p < 0.01$ , nonparametric U-test



**Рис. 8.** Локализация и экспрессия NRF2 в клетках при действии Ф1 в концентрации 0,4 мкМ на культуру клеток ФЛЭЧ в течение 24 часов. NRF2 визуализировали с помощью антител к NRF2. Для окраски ядер использовали раствор ДНК-связывающегося красителя DAPI.

**Fig. 8.** Localization and expression of NRF2 in human embryonic lung fibroblasts upon exposure to F1 at a concentration of 0.4  $\mu\text{M}$  for 24 hours. NRF2 was visualized with anti-NRF2 antibodies. The nuclei were stained with a solution of DNA-binding dye DAPI.



**Рис. 9.** Схематичное объяснение влияния производных фуллерена C<sub>70</sub> на ФЛЭЧ.

**Fig. 9.** Scheme of the effect of C<sub>70</sub> fullerene derivatives on human embryonic lung fibroblasts.

Ранее мы изучали свойства водной дисперсии фуллерена C<sub>70</sub> в культуре ФЛЭЧ [14]. Немодифицированный фуллерен не проявлял токсичности в широком диапазоне концентраций до 9,1 мкМ. В течение суток инкубация с 1,5 мкМ C<sub>70</sub> приводила к увеличению уровня внутриклеточных АФК в 1,6 раз. Экспрессия гена *NOX4* в течение суток возрастала примерно в 1,7 раз, на экспрессию гена *NRF2* инкубация с немодифицированным C<sub>70</sub> влияния не оказала. Таким образом, немодифицированный фуллерен C<sub>70</sub> проявлял прооксидантные свойства, проявляющиеся в индукции внутриклеточного оксидативного стресса, вероятно, за счет прямой активации экспрессии *NOX4* без вовлечения противовоспалительного пути *NRF2*. При этом немодифицированный C<sub>70</sub> не оказывал антиоксидантного действия по отношению к органическим радикалам [17]. Модификация поверхности C<sub>70</sub> заместителями, содержащими ароматическое кольцо, привела к изменению свойств — производные Ф1 и Ф2 проявляют антиоксидантные свойства по отношению к внутриклеточным АФК. Повышение экспрессии гена и белка *NOX4* под действием Ф1 и Ф2 происходит примерно в той же степени, но, возможно, это повышение является компенсаторным для поддержания АФК-баланса. Компенсаторным, предположительно, является и повышение экспрессии *NRF2*.

Возникает вопрос о специфичности действия модифицирующих заместителей — какие именно свойства заместителей приводят к изменению свойств фуллерена. Очевидно, что минорные изменения структуры заместителя роли не играют: Ф1 и Ф2 проявляют практически одинаковые свойства, отличаясь при этом числом карбоксильных и фенильных групп. Масса заместителей примерно одинакова, но производное Ф1 обладает большим поверхностным зарядом, чем Ф2,

имея в два раза больше карбоксильных групп. С другой стороны, у производного Ф2 в два раза больше фенильных групп. Возможно, в данном случае основную роль играет примерно одинаковая антиоксидантная активность производных (рис. 9), а минорные различия в структуре имеют меньшее значение. Эта гипотеза нуждается в дальнейшей проверке.

## Выводы

Исследовано влияние водорастворимых производных фуллерена C<sub>70</sub> на уровень внутриклеточных АФК и экспрессию ключевых АФК-зависимых генов *NOX4* и *NRF2* в культуре ФЛЭЧ. Заместители в исследуемых соединениях различались числом карбоксильных и фенильных групп, будучи примерно одинаковой массы. Оба соединения в равной мере вызывали снижение уровня внутриклеточных АФК в течение суток, и, вероятно, компенсаторное повышение экспрессии генов и белков *NOX4* и *NRF2*. Такое действие исследованных фуллеренов принципиально отличается от воздействия на клетки немодифицированного каркаса C<sub>70</sub>, проявляющего прооксидантные свойства, как показано нами ранее. Таким образом, модификация поверхности заместителями, усиливающими антиоксидантные свойства вещества, приводит к изменению механизма влияния наночастиц на генетический аппарат клетки, при этом минорные различия в структуре заместителей не оказывают значимого влияния на эффекты.

## Литература/References

1. Abbasi Kajani A., Haghjooy Javanmard S., Asadnia M., Razmjou A. Recent Advances in Nanomaterials Development for Nanomedicine and Cancer. *ACS Appl Bio Mater* 2021, 4, 5908-5925, doi:10.1021/acsabm.1c00591.

2. Cote B., Rao D., Alani A.W.G. Nanomedicine for Drug Delivery throughout the Alimentary Canal. *Mol Pharm* 2022, *19*, 2690-2711, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00694.
3. Liu H., Zhong W., Zhang X., Lin D., Wu J. Nanomedicine as a promising strategy for the theranostics of infectious diseases. *J Mater Chem B* 2021, *9*, 7878-7908, doi:10.1039/d1tb01316e.
4. Dellinger A., Zhou Z., Connor J., Madhankumar A.B., Pamujula S., Sayes C.M., Kepley C.L. Application of fullerenes in nanomedicine: an update. *Nanomedicine (Lond)* 2013, *8*, 1191-1208, doi:10.2217/nnm.13.99.
5. Nakamura S., Mashino T. Water-soluble fullerene derivatives for drug discovery. *J Nippon Med Sch* 2012, *79*, 248-254, doi:10.1272/jnms.79.248.
6. Hsieh F.Y., Zhilenkov A.V., Voronov I.I.; Khakina E.A., Mischenko D.V., Troshin P.A., Hsu S.H. Water-Soluble Fullerene Derivatives as Brain Medicine: Surface Chemistry Determines If They Are Neuroprotective and Antitumor. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017, *9*, 11482-11492, doi:10.1021/acsami.7b01077.
7. Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur J Med Chem* 2003, *38*, 913-923, doi:10.1016/j.ejmech.2003.09.005.
8. Bogdanovic G., Djordjevic A. Carbon nanomaterials: Biologically active fullerene derivatives. *Srp Arh Celok Lek* 2016, *144*, 222-231.
9. Trpkovic A., Todorovic-Markovic B., Trajkovic V. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Arch Toxicol* 2012, *86*, 1809-1827, doi:10.1007/s00204-012-0859-6.
10. Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova E., Kameneva L., Malinovskaya E., Dolgikh O., Konkova M., Voronov I., Zhilenkov A., Veiko N., et al. Antioxidant Properties of Fullerene Derivatives Depend on Their Chemical Structure: A Study of Two Fullerene Derivatives on HELFs. *Oxid Med Cell Longev* 2019, *2019*, 4398695, doi:10.1155/2019/4398695.
11. 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., et al. Functionalized Fullerene Increases NF-kappaB Activity and Blocks Genotoxic Effect of Oxidative Stress in Serum-Starving Human Embryo Lung Diploid Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev* 2016, *2016*, 9895245, doi:10.1155/2016/9895245.
12. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Chausheva A.I., Zheglo D.G., Nikitina V.A., Smirnova T.D., Kameneva L.V., Porokhovnik L.N., Kutsev S.I., Troshin P.A., et al. Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2016, *805*, 46-57, doi:10.1016/j.mrgentox.2016.05.004.
13. Yan W., Seifermann S.M., Pierrat P., Brase S. Synthesis of highly functionalized C60 fullerene derivatives and their applications in material and life sciences. *Org Biomol Chem* 2015, *13*, 25-54, doi:10.1039/c4ob01663g.
14. Proskurnina E.V., Mikheev I.V., Savinova E.A., Ershova E.S., Veiko N.N., Kameneva L.V., Dolgikh O.A., Rodionov I.V., Proskurnin M.A., Kostyuk S.V. Effects of Aqueous Dispersions of C60, C70 and Gd@C82 Fullerenes on Genes Involved in Oxidative Stress and Anti-Inflammatory Pathways. *Int J Mol Sci* 2021, *22*, doi:10.3390/ijms22116130.
15. Kornev A.B., Peregudov A.S., Martynenko V.M., Balzarini J., Hoorelbeke B., Troshin P.A. Synthesis and antiviral activity of highly water-soluble polycarboxylic derivatives of [70]fullerene. *Chem Commun (Camb)* 2011, *47*, 8298-8300, doi:10.1039/c1cc12209f.
16. Fedorova N., Klimova R., Tulenev Y., Chichev E., Kornev A., Troshin P., Kushch A. Carboxylic Fullerene C60 Derivatives: Efficient Microbicides Against Herpes Simplex Virus And Cytomegalovirus Infections In Vitro. *Mendeleev Communications* 2012, *22*, 254-256, doi:10.1016/j.mencom.2012.09.009.
17. Mikheev I.V., Sozarukova M.M., Izmailov D.Y., Kareev I.E., Proskurnina E.V., Proskurnin M.A. Antioxidant Potential of Aqueous Dispersions of Fullerenes C60, C70, and Gd@C82. *Int J Mol Sci* 2021; *22*. doi:10.3390/ijms22115838.