

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.01.3-18>

## **Адаптивные реакции фибробластов легких эмбриона человека на производное фуллерена, модифицированного остатками 3-бензотиенилаланина**

**Костюк С.В.<sup>1</sup>, Малиновская Е.М.<sup>1</sup>, Ершова Е.С.<sup>1</sup>, Каменева Л.В.<sup>1</sup>, Савинова Е.А.<sup>1</sup>, Костюк С.Э.<sup>1</sup>, Салимова Т.А.<sup>1</sup>, Жиленков А.В.<sup>2</sup>, Краевая О.А.<sup>2</sup>, Трошин П.А.<sup>2</sup>, Ижевская В.Л.<sup>1</sup>, Куцев С.И.<sup>1</sup>, Вейко Н.Н.<sup>1</sup>**

1 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»  
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

2 – Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук  
142432, г. Черноголовка, пр. акад. Семенова, д.1.

Исследовано влияние производного фуллерена с пятью присоединенными остатками 3-бензотиенилаланина и одним атомом водорода (F1) на функционирование фибробластов легких эмбриона человека (ФЛЭЧ). Показали, что F1 в течение 24 часов проникает в цитоплазму большинства клеток в популяции. Для исследования воздействия F1 на ФЛЭЧ выбраны две концентрации: 18,3 нг/мл, входящая в диапазон нетоксичных концентраций, и концентрация, близкая к повреждающей – 28 мкг/мл, и три времени инкубации клеток с соединениями – 1, 3 и 24 часа. Обнаружили, что через 24 часа в присутствии низких концентраций F1 снижается уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках, что обусловлено повышением экспрессии гена *NRF2* и увеличением его функциональной активности. Соединение F1 в концентрации, близкой к токсичной, вызывает в культивируемых ФЛЭЧ повышение уровня экспрессии гена и белка NOX4, что приводит к синтезу АФК в клетках, к окислительным модификациям и двуниевым разрывам ДНК ядер клеток через 24 часа инкубации. Не обнаружено влияния F1 на уровень экспрессии гена и белка BRCA1 что, вероятно, способствует образованию в клетках и поддержанию на высоком уровне двуниевых разрывов ДНК через 24 часа инкубации. Повышение экспрессии антиапоптотических генов в ФЛЭЧ через 24 часа культивирования с F1 может способствовать выживанию клеток с поврежденной ДНК.

**Ключевые слова:** производные фуллерена, активные формы кислорода, антиоксидантные свойства, противовирусная активность; генотоксичность.

**Для цитирования:** Костюк С.В., Малиновская Е.М., Ершова Е.С., Каменева Л.В., Савинова Е.А., Костюк С.Э., Салимова Т.А., Жиленков А.В., Краевая О.А., Трошин П.А., Ижевская В.Л., Куцев С.И., Вейко Н.Н. Адаптивные реакции фибробластов легких эмбриона человека на производное фуллерена, модифицированного остатками 3-бензотиенилаланина. *Медицинская генетика* 2024; 23(1): 3-18.

**Автор для корреспонденции:** Малиновская Е.М.; e-mail: m.elena.0402@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания.

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

**Поступила:** 20.12.2023

## **Adaptive reactions of human embryo lung fibroblasts (HELFL) to a fullerene derivative modified with 3-benzothienylalanine residues**

**Kostyuk S.V.<sup>1</sup>, Malinovskaya E.M.<sup>1</sup>, Ershova E.S.<sup>1</sup>, Kameneva L.V.<sup>1</sup>, Savinova E.A.<sup>1</sup>, Kostyuk S.E.<sup>1</sup>, Salimova T.A.<sup>1</sup>, Zhilenkov A.V.<sup>2</sup>, Kraevaya O.A.<sup>2</sup>, Troshin P.A.<sup>2</sup>, Izhevskaya V.L.<sup>1</sup>, Kutsev S.I.<sup>1</sup>, Veiko N.N.<sup>1</sup>**

1 – Research Centre for Medical Genetics  
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of RAS,  
1, Semenov Prospect, Chernogolovka, 142432, Russian Federation

We investigated the effect of fullerene derivative with five attached residues of 3-benzothienylalanine and one hydrogen atom (F1) on the functioning of the human embryonic lung fibroblasts (HELFL). It was shown that F1 penetrates the cytoplasm of most cells in the population within 24 hours. To study the effect of F1 on HELFL, two concentrations were selected: 18.3 ng/ml, which is in the range of non-toxic concentrations and a concentration close to damaging – 28 µg/ml and three incubation times of cells with compounds – 1, 3 and 24 hours. It was found that after 24 hours in the presence of low concentrations of F1, the level of ROS in cells decreases, which is due to an increase in the expression of the *NRF2* gene and an increase in its functional activity. The F1 compound in a concentration close to toxic causes an increase in the expression level of the NOX4 gene and protein in cultured HELFL, which leads to the synthesis of ROS in cells and oxidative modifications, and double-stranded DNA breaks of cell nuclei after 24 hours of incubations. There was no effect of F1 on the expression level of the BRCA1 gene and protein, which probably contributes to the formation of double-stranded

DNA breaks in cells and maintenance at a high level after 24 hours of incubation. An increase in the expression of anti-apoptotic genes in HELF after 24 hours of cultivation with F1 may contribute to the survival of cells with damaged DNA.

**Keywords:** fullerene derivatives; reactive oxygen species; antioxidant properties; antiviral activity; genotoxicity.

**For citation:** Kostyuk S.V., Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Kameneva L.V., Savinova E.A., Kostyuk S.E., Salimova T.A., Zhilenkov A.V., Kraevaya O.A., Troshin P.A., Izhevskaya V.L., Kutsev S.I., Veiko N.N. Adaptive reactions of human embryo lung fibroblasts (HELF) to a fullerene derivative modified with 3-benzothienylalanine residues. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2024; 23(1): 3-18. (In Russ.)

**Corresponding author:** Malinovskaya E.M.; **email:** m.elena.0402@gmail.com

**Funding.** The study was supported by a government assignment from the Ministry of Science and Higher Education.

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

**Accepted:** 20.12.2023

## Введение

Нанотехнологии за последние десятилетия быстро продвинулись вперед благодаря активному получению новых наносоединений. Среди новых синтезированных наноматериалов производные фуллеренов являются очень перспективными благодаря своей функционализации, проводимости, большой площади поверхности и электрической активности [1]. Фуллерены имеют сферическую или эллипсоидальную форму с полый каркасной конструкцией. Фуллерен C(60), репрезентативный фуллерен, составляет ~0,7 нм в диаметре [2]. За последние 30 лет непрерывное развитие нанотехнологий способствовало получению большого количества новых водорастворимых производных фуллерена C(60) [3-5]. Фуллерен C(60) и его производные являются привлекательными новыми соединениями не только в качестве материалов для углеродных нанотехнологий, но и для медицинских областей из-за их уникальных химических и физических свойств [6, 7]. Фуллерены и их производные могут быть использованы в качестве антиоксидантов при воспалительных заболеваниях, противоопухолевой терапии, благодаря конъюгированным двойным связям, которые удаляют свободные радикалы [8-11]. Производные фуллерена C(60) активируют противоопухолевый иммунитет через поляризацию опухолеассоциированных макрофагов и могут быть использованы для эффективной иммунотерапии опухоли [12]. Кроме того, некоторые производные фуллеренов C(60) и C(70) стабилизируют иммунные эффекторные клетки и ингибируют высвобождение провоспалительных цитокинов, поэтому они могут потенциально рассматриваться как препараты для лечения различных заболеваний, таких как астма, артрит, рассеянный склероз [13-15]. Показано, что производные фуллерена с карбоновой кислотой проявляют нейропротекторную активность, ингибируют рост опухоли в модельных экспериментах и обладают потенциалом для использования в качестве

светочувствительных биохимических зондов [16-18]. Поскольку наночастицы одобрены для применения в качестве лекарств и их носителей, производные фуллеренов имеют большой потенциал в качестве носителей для таргетной доставки генов [19,20].

В настоящее время производные фуллерена рассматривают как эффективные препараты для противовирусной терапии [21-25], как системы доставки противовирусных препаратов [26,27]. В ряде работ показано, что производные фуллеренов оказывают ингибирующее действие против ВИЧ, вируса Эбола, вируса гриппа, цитомегаловируса, вируса простого герпеса [28-32]. Для использования производных фуллеренов в качестве лекарственных препаратов необходимо понимать, какое воздействие они оказывают на клетки человека. Для этой цели проводят исследования цитотоксичности и биосовместимости некоторых производных фуллеренов [33-36]. При этом, Park с соавт. обнаружили, что производные фуллерена C(60) индуцируют синтез провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, фактор некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкин-6 в легких мышей [37]. Sayes с соавт. обнаружили, что водорастворимая нано-C(60) коллоидная суспензия воздействует на функцию клеток через перекисное окисление липидов [38]. Тем не менее, мало исследованы изменения в сигнальных путях клеток человека при действии производных фуллерена C(60). Однако изменение уровня экспрессии генов и белков ключевых сигнальных путей клеток определяет не только цитотоксичность и биосовместимость наноматериалов, но и влияет на важные клеточные функции, антиоксидантную защиту, пролиферацию, репарацию ДНК, апоптоз. В этой работе мы исследовали влияние производного фуллерена с пятью присоединенными остатками 3-бензотиенилаланина и одним атомом водорода (Ф1) на функционирование фибробластов легких эмбриона человека (ФЛЭЧ).

## Материалы и методы

### Синтез производного фуллерена C(60)

Синтез и характеристика Ф1 были подробно описаны ранее [39]. Ф1 хорошо растворим в воде и питательной среде.

### Клеточная культура

В работе были использованы ФЛЭЧ (четвертый пассаж клеток) из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». Было получено одобрение Комитета по этике ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 5). Клетки рассеивали плотностью  $1,7 \times 10^4$  на 1 мл среды DMEM («ПанЭко», Москва, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой («PAA Laboratories», Вена, Австрия), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10 мкг/мл гентамицина («Sigma-Aldrich», Сент-Луис, Миссури, США) и культивировали при 37°C как описано ранее [40,41]. Фуллерен растворяли в стерильных условиях в физиологическом растворе. После добавления Ф1 в среду культивирования клетки инкубировали в течение разных временных интервалов.

### Анализ МТТ

Клетки выращивали в 96-луночной планке в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ), как описано ранее [40,41]. Анализ результата теста проводили при 550 нм с помощью EnSpire Plate Reader («EnSpire Equipment», Турку, Финляндия).

### Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентную микроскопию проводили с использованием флуоресцентного микроскопа AxioScore A1 («Carl Zeiss», Германия) и системы для проведения клеточного имиджинга CyTell (GE Healthcare).

### Экспрессия генов методом ПЦР-анализа в режиме реального времени

РНК экстрагировали из клеток с использованием наборов YellowSolve («Клоноген», Санкт-Петербург, Россия) с последующими фенол-хлороформной экстракцией и осаждением хлороформом и изоамиловым спиртом (49:1). Концентрацию РНК определяли с помощью реагента РНК Quant-iT RiboGreen («MoViTec», Геттинген, Германия) на планшетном ридере («EnSpire Equipment», Турку, Финляндия),  $\lambda_{эм} = 487$  нм,  $\lambda_{фл} = 524$  нм. Реакция обратной транскрипции проводилась

с использованием реагентов компании «Силекс» (Москва, Россия). ПЦР проводили с использованием соответствующих праймеров («Syntol», Москва, Россия) и интеркалирующего красителя SybrGreen на аппарате StepOnePlus («Applied Biosystems», Foster City, CA, США). Условия ПЦР подбирались индивидуально для каждой пары праймеров. Экспрессия генов была проанализирована в нескольких независимых экспериментах, результаты были обработаны с использованием калибровки (референсный ген *TBP*).

Использованные праймеры («Syntol», Москва, Россия):

*BCL2* (TTTGAAATCCGACCACTAA;  
AAAGAAATGCAAGTGAATGA);  
*BRCA1* (GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTTA;  
GCTTTATCAGGTTATGTT-GCATGGT);  
*BAX* (CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG,  
CCAGCCCATGATGGTTCTGAT);  
*NFKB1* (CAGATGGCCCATACSTTCAAAT;  
CGGAAACGAAATCCTCTCTGTT);  
*NOX4* (TTGGGGCTAGGATTGTGTCTA;  
GAGTGTTCGGCACATGGGTA);  
*NRF2* (TCCAGTCAGAAACCAGTGGAT;  
GAATGTCTGCGCCAAAAGCTG);  
*TBP* (референсный ген)  
(F: GCCCGAAACGCCGAATAT,  
R: CCGTGGTTTCGTGGCTCTCTCT).

### Метод проточной цитофлуориметрии

Согласно стандартному протоколу, экспрессию внутриклеточных белков изучали с использованием соответствующих моноклональных антител. Клетки промывали 1% альбумином в растворе PBS, фиксировали 3,7% формальдегидом в течение 10 мин при 37°C, промывали и пермеабелизировали в 90% метаноле при -20 °C. Затем клеточную суспензию инкубировали с первичными антителами в течение ночи при +4°C (1 мкг/мл в PBS в присутствии 1% альбумина), и, при необходимости, с вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем анализировали с помощью Cyflow cytofluorometer («Sytex Partec», Görlitz, Germany).

Использованные антитела: CY5.5-NOX4 (bs-1091r-cy5-5, «Bioss Inc.», США); NRF2 pSer40 (bs2013, «Bioss Inc.», США); PE-8OHdG (sc-393871 PE, «Santa Cruz», США); DyLight488- $\gamma$ H2AX (pSer139) (nb100-78356G «NovusBio», США); FITC-BRCA1, (NB100-598F «NovusBio», США); A350-BCL2 (bs-15533r-a350, «Bioss Inc.», США). PCNA (ab2426, «Abcam», Великобритания).

### Анализ активных форм кислорода

Анализ ROS проводили методом проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Клетки инкубировали с Ф1, промывали PBS и обрабатывали 10 мкМ раствором H<sub>2</sub>DCFHDA в PBS («Molecular Probes/Invitrogen», Carlsbad, CA, США), после чего анализировали суммарный флуоресцентный сигнал при  $\lambda_{ex} = 503$  нм и  $\lambda_{em} = 524$  нм с помощью Cyflow цитометра («Sysmex Partec», Görlitz, Germany). Константа скорости реакции образования DCF (k) рассчитана с использованием зависимости интенсивности сигнала DCF от времени инкубации клетки с H<sub>2</sub>DCFHDA. Данные представлены в виде отношения k1/k0, где k1 и k0 – константы скорости образования DCF в экспонированных и неэкспонированных клетках соответственно.

### Статистика

Проводили три независимых эксперимента в трех повторах каждый. В FCA проанализированы медианы интенсивности сигнала. На гистограммах показаны среднее и стандартное отклонение (SD). Значимость различий была проанализирована с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни. P-значения

< 0,005 считались статистически значимыми и отмечены на рисунках знаком «\*». Данные были проанализированы при помощи программ Excel, Microsoft Office («Microsoft», Redmond, WA, США), Statistica 6.0 («Dell Round Rock», TX, США) и StatGraphics («Statgraphics Technologies», The Plains, VA, США).

### Результаты

Исследовали влияние водорастворимого производного фуллерена Ф1 с молярной массой 2011 г/моль (рис. 1) на функциональную активность ФЛЭЧ.

Ранее было показано, что это соединение обладает противовирусной активностью. Исследуемое соединение Ф1 является одним из наиболее эффективных ингибиторов вирусов гриппа на основе фуллеренов [39]. В частности, оно на 50% снижает индуцированную вирусом гибель клеток в клеточной линии MDCK, инфицированной устойчивым к римантадину вирусом гриппа H1N1 в концентрации  $5,53 \pm 1,72$  мкг/мл. Кроме того, соединение проявляет низкую цитотоксичность при  $CC_{50} = 300$  мкг/мл, что приводит к высокому индексу селективности, равному 55. Водорастворимое производное фуллерена Ф1 также продемонстрировало выраженный ингибирующий эффект в отношении других подтипов вируса гриппа: H3N2, H5N2, H7N9 [39].

### Анализ цитотоксичности Ф1 в отношении ФЛЭЧ

Для оценки цитотоксичности исследуемого соединения в отношении нормальных клеток человека – ФЛЭЧ – был проведен МТТ-тест. Исследовали влияние Ф1 в концентрации 0,3 мкг/мл – 0,3 мг/мл. Фуллерены добавляли в среду в начале культивирования ФЛЭЧ. Длительность культивирования составляла 72 часа. Соединение Ф1 в концентрации 4,2 нг/мл – 122 мкг/мл не оказывает значительного цитотоксического воздействия на ФЛЭЧ (вызывает гибель менее 20 % клеток в популяции), а в концентрации 0,5 мг/мл – 2,3 мг/мл Ф1 оказывает повреждающее воздействие на клетки, вызывая гибель более 20 % клеток (рис. 2). Ф1 оказалось менее цитотоксичным в отношении нормальных клеток человека *in vitro* по сравнению с ранее исследованными нами соединениями [40,42], что открывает перспективы исследования эффектов воздействия более высоких концентраций водорастворимых производных фуллеренов на культивируемые клетки человека.

### Исследование флуоресцентных свойств Ф1

Большинство исследованных нами ранее водорастворимых производных фуллеренов обладает способ-

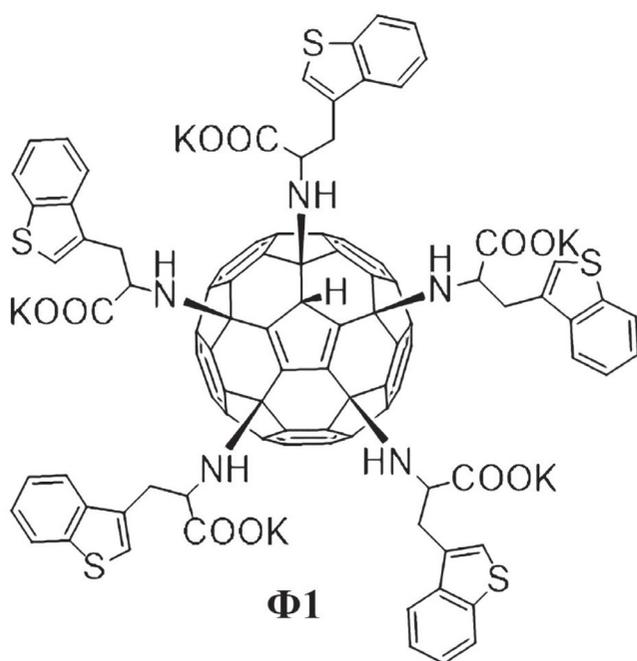


Рис. 1. Молекулярная формула Ф1.

Fig. 1. Molecular formula of F1.

ностью флуоресцировать в водных растворах, что позволяет оценить скорость проникновения фуллеренов в культивируемые клетки человека и выявить их локализацию внутри клеток [40-44]. В результате анализа флуоресцентных свойств соединения Ф1 обнаружили, что оно обладает собственной флуоресценцией и флуоресцирует в водных растворах и в среде культивирования клеток. При сканировании спектра возбуждения водных растворов Ф1 (длина волны возбуждения в диапазоне 230-600 нм при длине волны испускания 500 нм) обнаружен максимум возбуждения при длине волны 340 нм (рис. 3, А). При снятии спектра флуоресценции исследуемого соединения при длине волны возбуждения 340 нм обнаружен максимум флуоресценции при длине 520 нм (рис. 3, А).

Флуоресценцию соединения Ф1 использовали для анализа проникновения и локализации в культивируемых ФЛЭЧ.

Методом проточной цитофлюометрии показали, что соединение Ф1 проникает через цитоплазматическую мембрану быстро: уже через 1-3 часа обнаруживается флуоресценция Ф1 в цитоплазме клеток (рис. 3, Б).

Методом флуоресцентной микроскопии показали, что соединение Ф1 проникает в цитоплазму большинства клеток в популяции ФЛЭЧ (рис. 4). Через 24 часа высокий флуоресцентный сигнал Ф1 наблюдается в цитоплазме, в околядерной области практически всех клеток в популяции (рис. 4), что может свидетельствовать о накоплении этих производных фуллерена

в клетках и о длительном периоде флуоресценции соединений в ФЛЭЧ.

Таким образом, мы показали, что соединение Ф1 обладает флуоресценцией, которая позволяет исследовать его проникновение в клетки, накопление и локализацию в цитоплазме.

Для исследования воздействия на эмбриональные фибробласты были выбраны две концентрации Ф1: низкая, входящая в диапазон нетоксичных концентраций фуллерена, – 18 нг/мл, и концентрация, близкая к повреждающей, – 28 мкг/мл; и три времени инкубации клеток с соединениями – 1, 3 и 24 часа. Изменения всех значений определяли в относительных единицах по отношению к контролю (клеткам, культивируемым без фуллерена).

#### Влияние Ф1 на уровень активных форм кислорода (АФК) в ФЛЭЧ

Исследовали процессы, происходящие в живых клетках после взаимодействия с Ф1. Для оценки уровня синтеза АФК в клетках использовали соединение H2DCFH-DA (dichlorodihydrofluoresceindiacetate) – краситель, который быстро проникает через клеточные мембраны. В цитозоле этот краситель гидролизуется до DCFH гидролазами клетки. Нефлуоресцирующий DCFH является чувствительным внутриклеточным маркером окислительного стресса, окисляясь АФК до интенсивно флуоресцирующего DCF. На рис. 5 приводятся зависимости отношения констант скорости синтеза DCF в клетках при концентрациях Ф1 18,3 нг/мл

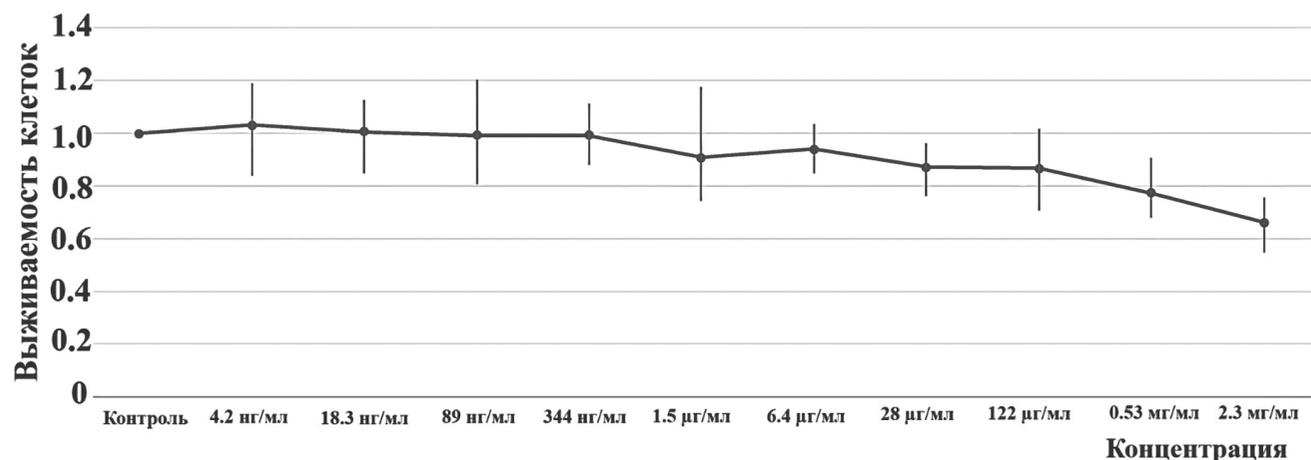


Рис. 2. МТТ-тест: по оси X – концентрации фуллерена Ф1, по оси Y – оптическая плотность при длине волны 570 нм.

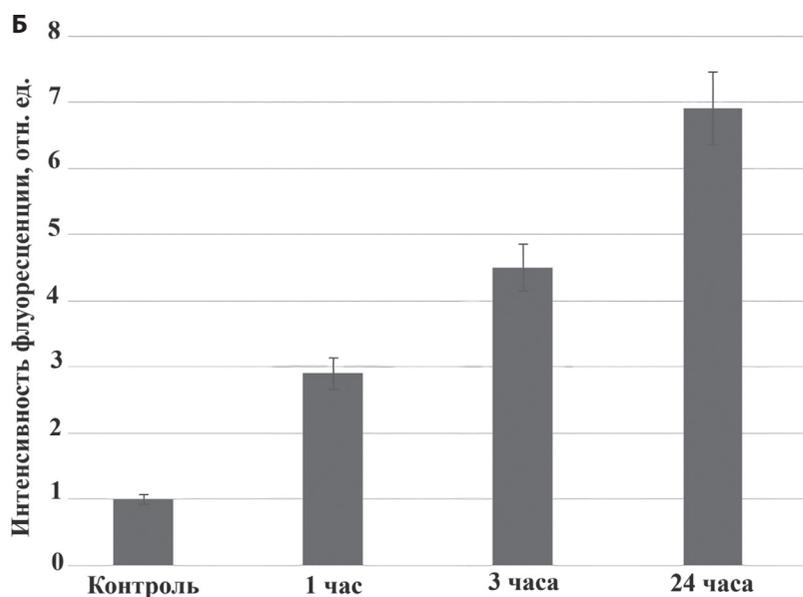
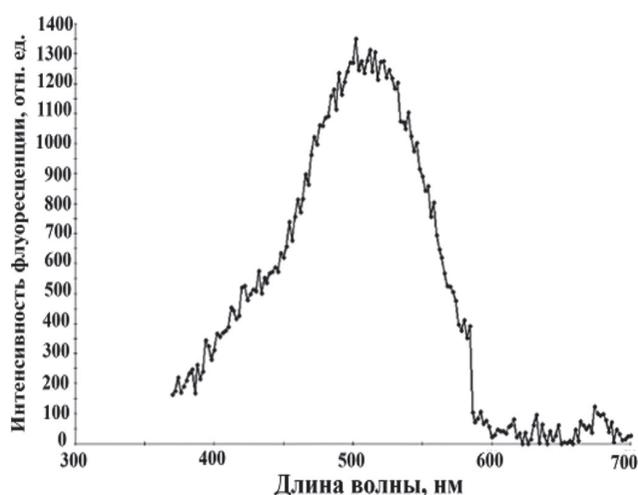
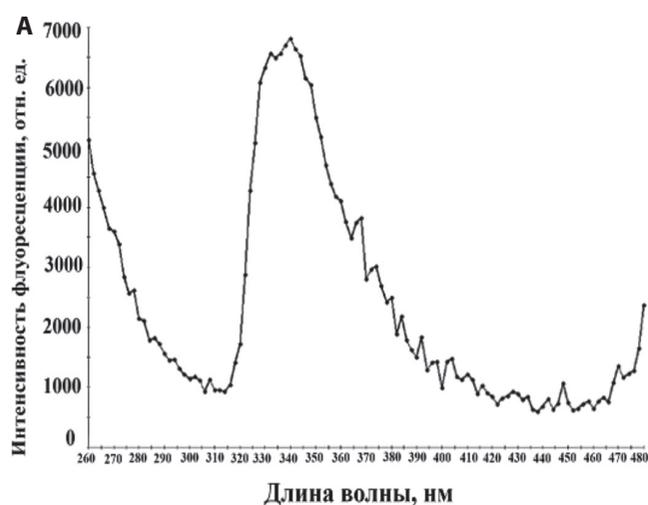
Fig. 2. MTT test: on the X axis – the concentration of F1 fullerene, on the Y axis – optical density at a wavelength of 570 nm.

и 28 мкг/мл к контролю (клеткам, культивируемым без фуллерена) от времени (1, 3, 24 часа инкубации клеток с соединением).

При культивировании клеток в присутствии Ф1 в концентрации 28 мкг/мл уровень АФК незначительно снижен по отношению к контролю в течение 1–3 ч инкубации и возрастает ( $\approx$  на 10%) через 24 часа инкубации, что может быть связано с активацией синтеза свободных радикалов в клетках, превышающей возможности связывания АФК соединением Ф1. На рис. 6 приведены данные флуоресцентной микроскопии, полученные при действии высокой (28 мкг/мл) концентра-

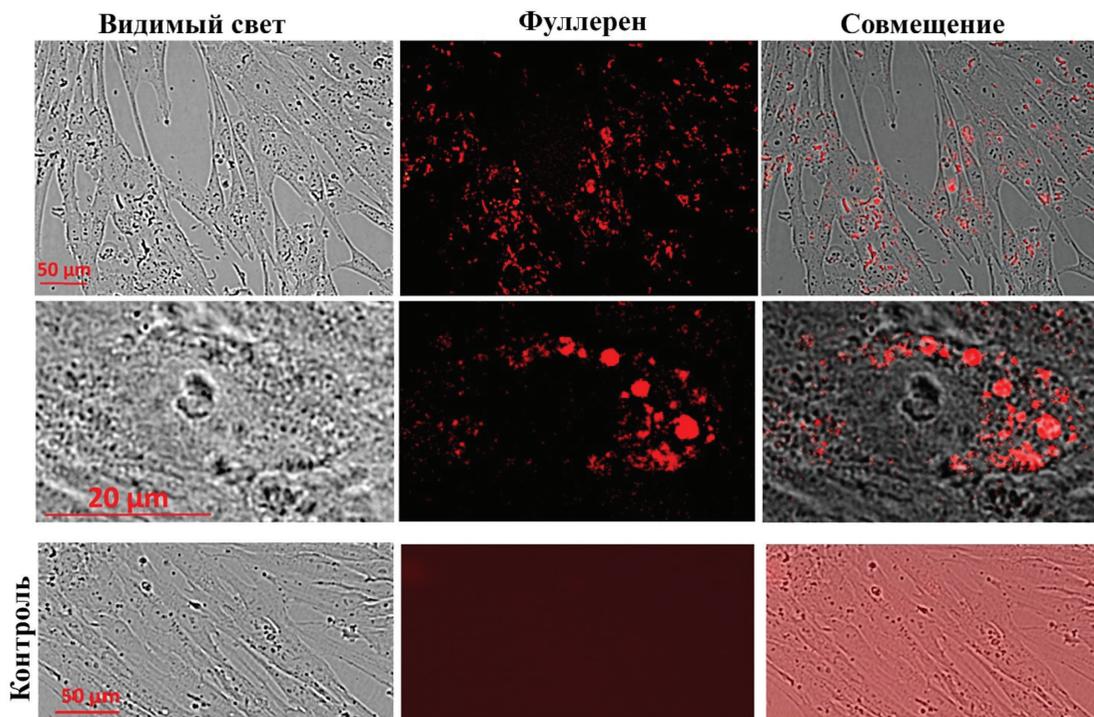
ции соединения Ф1 на ФЛЭЧ через 24 часа. Через 24 ч уровень АФК в клетках значительно повышается.

Однако низкие концентрации Ф1 оказывают на уровень АФК эффект, противоположный высоким концентрациям этого соединения. При добавлении к клеткам Ф1 в концентрации 18 нг/мл наблюдается тенденция к повышению уровня АФК на 10–20% через 1–3 часа, а через 24 часа культивирования клеток в присутствии Ф1 в концентрации 18 нг/мл наблюдается значительное снижение уровня АФК относительно трехчасовой инкубации с Ф1 (на 10–30%) и относительно контроля ( $\approx$  на 10%).



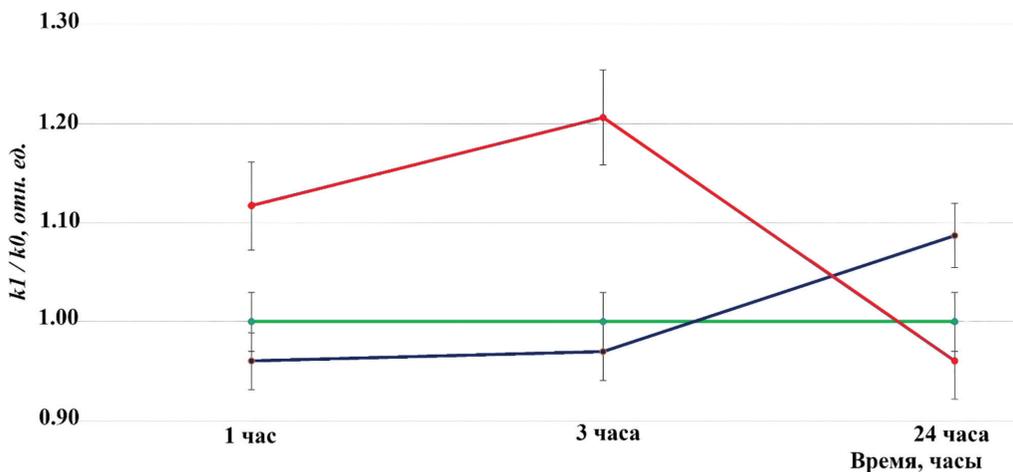
**Рис. 3.** А – Спектры возбуждения и флуоресценции водного раствора фуллерена Ф1 в концентрации 0,5 мг/мл при длине волны возбуждения 340 нм. Б – Гистограмма распределения флуоресценции (с максимумом возбуждения 340 нм) через 1, 3 и 24 часа после добавления соединения Ф1 к клеткам.

**Fig. 3.** A – Excitation and fluorescence spectra of an aqueous solution of fullerene F1 at a concentration of 0.5 mg/ml and excitation wavelength of 340 nm. B – Histogram of fluorescence distribution (with an excitation maximum of 340 nm) 1, 3 and 24 hours after adding the F1 compound to the cells.



**Рис. 4.** Флуоресценция Ф1 (в концентрации 28 мкг/мл) в клетках через 24 часа (слева – видимый свет; в центре – флуоресценция соединений с использованием фильтра 450-630 нм, возбуждение при длине волны 370 нм; справа – объединенная фотография), снизу – клетки без добавления фуллерена. Первый и третий ряды – увеличение 40х, второй ряд – увеличение 100х.

**Fig. 4.** Fluorescence of F1 (at a concentration of 28 μg/ml) in cells after 24 hours (left - visible light; center – fluorecence using a 450-630 nm filter, excitation at a wavelength of 370 nm; right – combined photograph), bottom – cells without the addition of fullerene. The first and third rows are 40x magnification, the second row is 100x magnification.



**Рис. 5.** Зависимости отношения констант скорости синтеза DCF в клетках при инкубации с фуллереном Ф1 в концентрации 18,3 нг/мл (красная линия), 28 мкг/мл (фиолетовая линия) к контролю (клеткам, культивируемым без фуллерена, зеленая линия) от времени (1, 3, 24 часа инкубации).

**Fig. 5.** Dependence of the ratio of the rate constants of DCF synthesis in cells during incubation with fullerene F1 at a concentration of 18.3 ng/ml (red line), 28 μg/ml (purple line) to control (cells cultured without fullerene, green line) on time (1, 3, 24 hours of incubation).

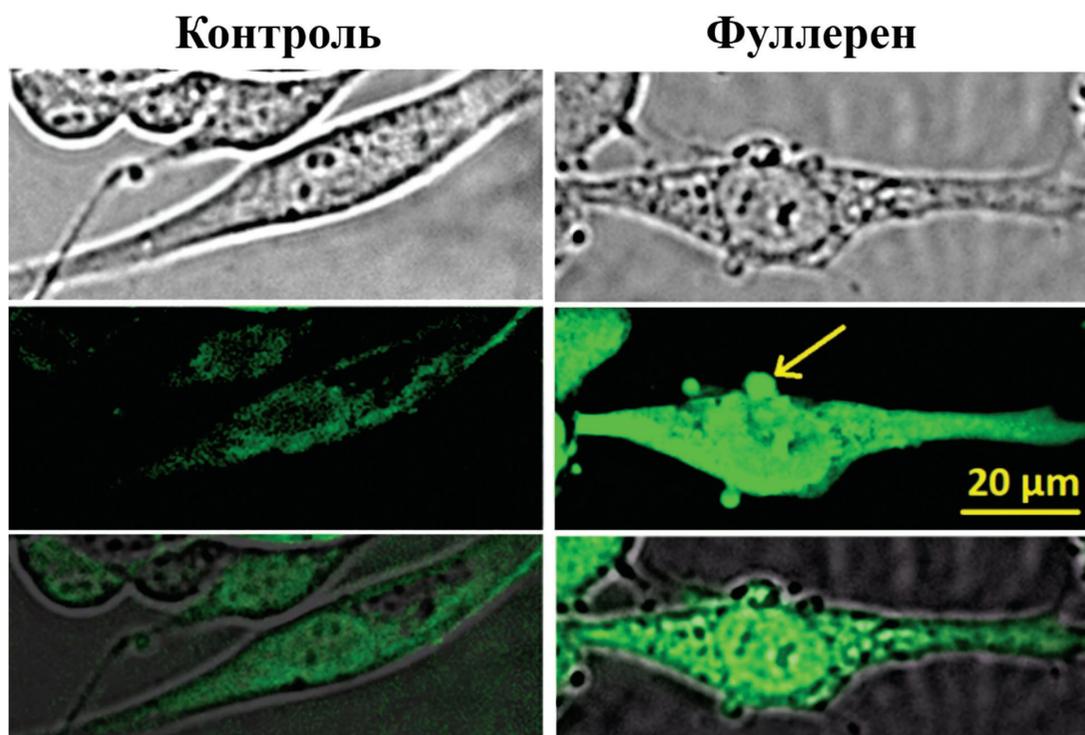
Мы предположили, что повышение уровня АФК при действии Ф1 в высокой концентрации может быть обусловлено тем, что одновременно со связыванием АФК запускается процесс синтеза АФК в клетке, который может нивелировать связывание свободных радикалов производными фуллерена. Генерация АФК митохондриями происходит при синтезе аденозинтрифосфата (АТФ) в результате окислительного фосфорилирования. При действии Ф1 на ФЛЭЧ мы не обнаружили активации митохондрий. NADPH-оксидазы также являются продуцентом физиологических количеств АФК в клетках. Одной из экспрессирующихся в фибробластах NADPH-оксидаз является NOX4, экспрессия которой регулируется на уровне гена. Исследовали уровень экспрессии NOX4 на уровне гена и белка в клетках при действии Ф1.

При действии на клетки соединения Ф1 в концентрации 28 мкг/мл возрастает уровень экспрессии NOX4 в 1,5–2,8 раз на уровне гена и белка через 3–24 часа по-

сле начала инкубации с соединением (рис. 7). Повышение уровня экспрессии белка NOX4 через 24 часа инкубации клеток с Ф1 может объяснить, почему возрастает уровень АФК в клетках через 24 часа после добавления этого соединения к ФЛЭЧ. На рис. 6 стрелкой отмечен флуоресцирующий DCF на поверхности клеток, этот флуоресцентный сигнал может быть следствием синтеза АФК ферментом NOX4, расположенном на поверхности клеток.

При действии на ФЛЭЧ соединения Ф1 в концентрации 18 нг/мл экспрессия NOX4 на уровне гена и белка в клетках также постепенно возрастает к 3 часам после добавления фуллерена, через 24 часа немного снижается, но остается повышенной (рис. 7).

Таким образом, через 24 часа культивирования ФЛЭЧ в присутствии высоких концентраций Ф1 в клетках наблюдается повышение уровня экспрессии гена и белка NOX4, что индуцирует синтез АФК в клетках и может оказывать повреждающее действие на клетки.



**Рис. 6.** Флуоресценция DCF при инкубации ФЛЭЧ с Ф1 в концентрации 28 мкг/мл через 24 часа; сверху – видимый свет, в центре флуоресценция DCF, снизу – совмещенная фотография.

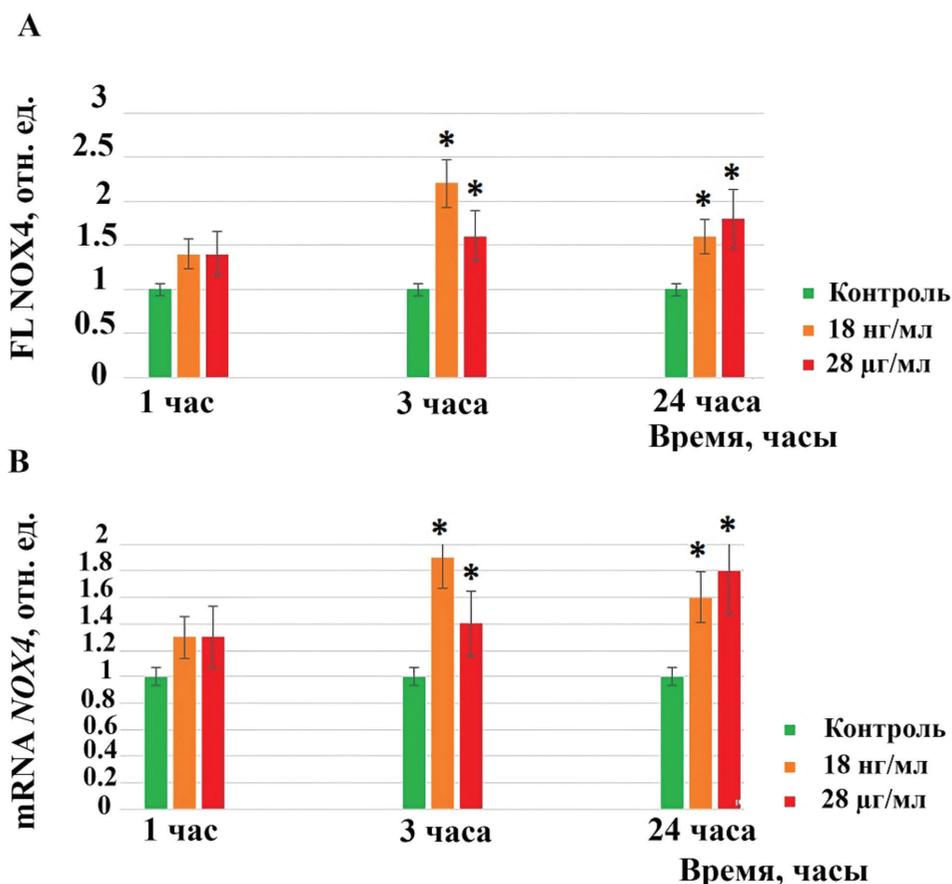
**Fig. 6.** DCF fluorescence upon incubation of HELF with F1 at a concentration of 28 μg/ml after 24 hours; top – visible light, DCF fluorescence in the center, bottom – combined photograph.

*Влияние Ф1 на экспрессию гена  
и активность транскрипционного фактора NRF2,  
отвечающего за развитие  
антиокислительного ответа в клетках*

В регуляции антиокислительного ответа клеток принимает участие транскрипционный фактор NRF2. Показали, что уровень экспрессии гена *NRF2* возрастает в 2–2,5 раза через 24 часа после добавления к среде культивирования клеток Ф1 в концентрации 18 нг/мл и  $\approx$  в 1,5 раза при действии на клетки соединения Ф1 в концентрации 28 мкг/мл (рис. 8, А).

Уровень экспрессии фосфорилированной формы белка NRF2 (phNRF2) через 24 часа после добавле-

ния к среде культивирования клеток Ф1 в концентрации 18 нг/мл повышается, видимо, за счет повышения уровня трансляции. Но мы наблюдали повышение уровня phNRF2 уже через 1 час после добавления к среде культивирования клеток Ф1 в концентрации 18 нг/мл и 28 мкг/мл в 2–2,5 раза (рис. 8, В), что, скорее всего, обусловлено высвобождением NRF2 из депонированного в клетках NRF2, связанного с KEAP1. При исследовании локализации транскрипционного фактора NRF2 с использованием системы для проведения клеточного имиджинга CyTell (GE Healthcare) показали, что через 1 час и через 24 часа после добавления к среде культивирования клеток Ф1 в концентрации 18 нг/мл NRF2 локализуется, преимуществен-



**Рис. 7.** А – Уровень белка NOX4 в ФЛЭЧ, обработанных Ф1 в концентрациях, указанных на рисунке, относительно контрольных значений (клеток, культивируемых в отсутствие фуллерена). Метод проточной цитофлуориметрии. В – Уровень экспрессии гена *NOX4* в клетках (ФЛЭЧ) при действии Ф1 в концентрации, указанной на рисунке. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 7.** А – NOX4 protein level in HELF in the presence of F1 at the indicated concentrations, relative to control values (cells cultured in the absence of fullerene). Flow cytometry method. В – Expression of the *NOX4* gene in cells (HELF) in the presence of F1 at the indicated concentration. (\*) – significant differences with control cells,  $p < 0.01$ , nonparametric U-test.

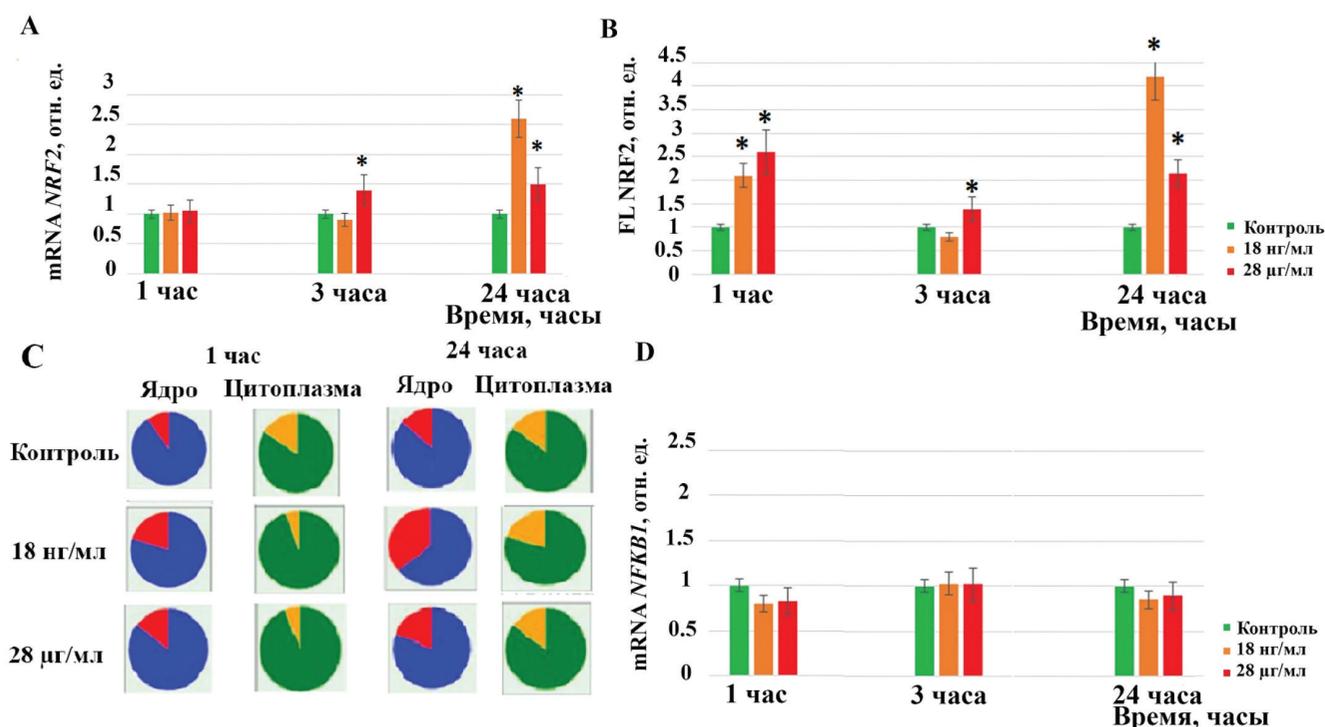
но, в ядре клеток, что свидетельствует об активности NRF2 (рис. 8, С).

Изменение транскрипционной активности гена *NRF2* может быть обратно пропорционально активации транскрипции гена *NFKB1* [40]. Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, кодируемый геном *NFKB1*, транслируется в ядро и запускает NF- $\kappa$ B-сигнальный путь в ответ на внешнее воздействие, что приводит к синтезу ряда цитокинов, молекул адгезии, факторов, направленных на выживание клетки. Выявили, что уровень экспрессии гена *NFKB1* не изменяется через 3 часа при действии Ф1 на клетки и незначительно

снижается через 1 и 24 часа при действии Ф1 на ФЛЭЧ, что, действительно, находится в противофазе с изменением экспрессии гена *NRF2*. (рис. 8, D).

*Влияние Ф1 на образование окислительных модификаций и разрывов ДНК в ФЛЭЧ и на активацию генов репарации*

Поскольку при действии водорастворимого производного фуллерена Ф1 наблюдается активация гена *NOX4* и индуцируется синтез АФК, можно предположить, что свободные радикалы оказывают повреждающее действие на генетический аппарат клетки, вы-



**Рис. 8.** А – Экспрессия гена *NRF2* в ФЛЭЧ при действии Ф1 в концентрации, указанной на рисунке. В – Количество фосфорилированной формы белка NRF2 (phNRF2) в ФЛЭЧ при действии Ф1 в концентрациях, указанных на рисунке. С – Данные системы клеточного имиджинга CyTell: красным отмечен процент phNRF2-положительных ядер, синим – процент phNRF2-отрицательных ядер клеток, желтым – процент клеток с флуоресценцией антител к phNRF2 в цитоплазме, зеленым – процент клеток с цитоплазмой без антител к phNRF2. D – Уровень экспрессии гена *NFKB1* в клетках при действии Ф1 в концентрации, указанной на рисунке. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками (культивируемыми в отсутствие фуллерена),  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 8.** A – Expression of the *NRF2* gene in HELF in the presence of F1 at the concentration indicated in the figure. B – The amount of the phosphorylated form of the NRF2 protein (phNRF2) in HELF in the presence of F1 at the concentrations indicated in the figure. C – Data from the CyTell cell imaging system: red indicates the percentage of phNRF2-positive nuclei, blue – the percentage of phNRF2-negative cell nuclei, yellow – the percentage of cells with fluorescence of antibodies to phNRF2 in the cytoplasm, green – the percentage of cells with cytoplasm without antibodies to phNRF2. D – Level of expression of the *NFKB1* gene in the presence of F1 at the concentration indicated in the figure. (\*) – significant differences with control cells (cultured in the absence of fullerene),  $p < 0.01$ , nonparametric U-test.

зывая окислительные модификации и разрывы ДНК ядер клеток. Исследовали уровень окислительных повреждений ДНК ядер фибробластов при действии Ф1 на ФЛЭЧ. Ф1 при его добавлении в среду культивирования клеток в концентрации 18 нг/мл вызывает повышение уровня окислительных модификаций ДНК (8-oxodG) через 3 часа в 2–2,5 раза и через 24 часа в 3–3,5 раза (рис. 9, А). При действии на клетки Ф1 в концентрации 28 мкг/мл уровень окислительных модификаций ДНК (8-oxodG) через 24 часа повышается в 2–2,5 раза (рис. 9, А).

Повышение уровня 8oxodG может обуславливать образование разрывов в клетке. Один из методов выявления двуниевых разрывов ДНК основан на том, что у консервативного белка-гистона, участвующего в упаковке хроматина (H2AX) фосфорилируется остаток серина 139 на участке разрыва ДНК. Связанные с мечеными антителами фосфорилированные гистоны  $\gamma$ H2AX визуализируются в клеточном ядре; их накопление в больших количествах указывает на повышение уровня двуниевых разрывов ДНК в ядрах клеток. Методом проточной цитофлуориметрии показали, что производное фуллерена Ф1 при его добавлении в среду культивирования ФЛЭЧ в концентрации 18 нг/мл вызывает повышение уровня двуниевых разрывов ДНК через 3–24 часа в 1,5–2 раза (рис. 9, В, С). При действии на клетки соединения Ф1 в концентрации 28 мкг/мл уровень двуниевых разрывов ДНК возрастает через 24 часа в 1,5 раза (рис. 9, В, С).

В ответ на повреждение ДНК в клетках могут активироваться гены, участвующие в процессах репарации ДНК, ключевым из таких генов является ген *BRCA1*. Водорастворимое производное фуллерена Ф1 в концентрациях 18 нг/мл и 28 мкг/мл не влияет на уровень экспрессии гена и белка *BRCA1* по сравнению с контролем, что, вероятно, и способствует образованию в клетках и поддержанию на высоком уровне двуниевых разрывов ДНК через 24 часа инкубации в присутствии этого соединения.

#### Влияние соединения Ф1 на пролиферацию и апоптоз культивируемых ФЛЭЧ

Образующиеся в клетках разрывы ДНК могут репарироваться с остановкой клеточного цикла. Кроме того, клетки могут активировать программу запрограммированной клеточной гибели (апоптоз). С использованием МТТ-теста мы не обнаружили усиления пролиферативной активности ФЛЭЧ в присутствии Ф1 в концентрациях 18 нг/мл и 28 мкг/мл (рис. 2). Не изме-

нялся уровень маркера пролиферации PCNA в ФЛЭЧ в течение 24 часов после добавления Ф1 к клеткам (рис. 10, А). При исследовании уровня экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл – *CCND1*, *CDKN1A* и *CDKN2* также не обнаружили значимых изменений уровня их РНК в течение 24 часов после добавления Ф1 в среду культивирования ФЛЭЧ, что также свидетельствует об отсутствии влияния Ф1 на прогрессию клеточного цикла.

Изменение количества клеток в популяции зависит как от прогрессии клеточного цикла, так и от уровня апоптоза клеток. Мы исследовали влияние соединения Ф1 на уровень экспрессии проапоптотического (*BAX*) и антиапоптотического (*BCL2*) генов. Наиболее адекватным и часто используемым является отношение уровня экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* к проапоптотическому гену *BAX*, свидетельствующее об уровне апоптоза в популяции клеток. Соединение Ф1 в концентрации 18 нг/мл не влияло на соотношение *BCL2/BAX* на протяжении 24 часов культивирования (рис. 10, В).

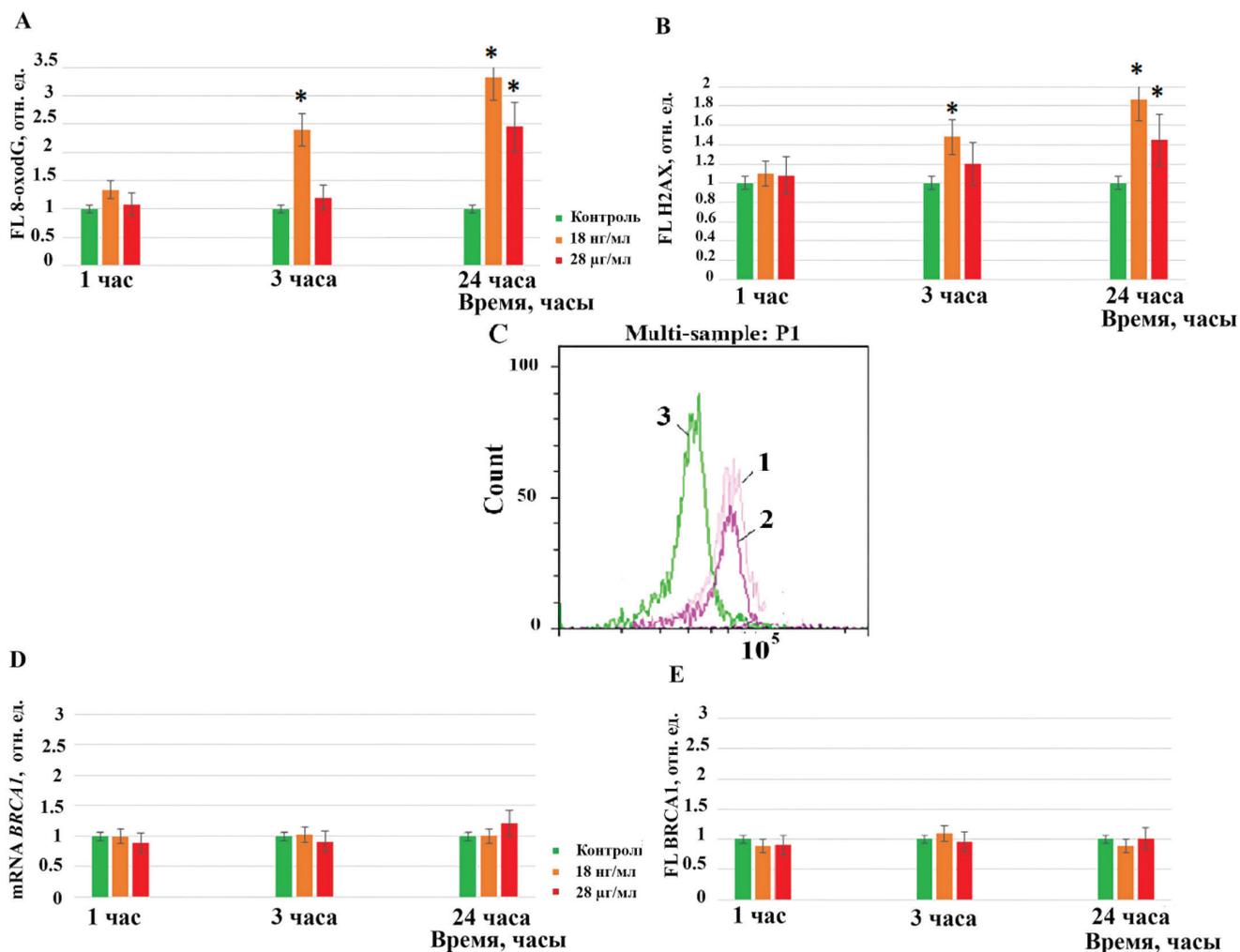
При действии на клетки производного фуллерена Ф1 в концентрации 28 мкг/мл через 1 час инкубации наблюдается повышение экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* и ингибирование проапоптотического гена *BAX*, при этом соотношение *BCL2/BAX* возрастает примерно в 2 раза (рис. 10, В). Через 24 часа культивирования в присутствии Ф1 в концентрации 28 мкг/мл соотношение *BCL2/BAX* возрастает в 1,5–2 раза, что может свидетельствовать о повышенной выживаемости клеток с поврежденной ДНК.

#### Обсуждение

Большинство производных фуллеренов являются хорошими антиоксидантами в растворах [8,10]. Однако процесс воздействия производных фуллерена на АФК в живых клетках более сложен [41–44]. Несмотря на то, что большинство водорастворимых соединений фуллерена способно связывать АФК, одновременно может запускаться процесс синтеза свободных радикалов в клетке, что может нивелировать снижение уровня АФК производными фуллерена [41–44]. В живой клетке АФК образуются в цитоплазме, на поверхности клеточной мембраны и в ядре. Кроме того, клетки продуцируют молекулы пероксида водорода в межклеточную среду. Умеренные количества АФК принимают участие в реализации многих клеточных процессов, таких, как пролиферация и межклеточная сигнализация [45]. Окислительный стресс включает-

ся в несбалансированном состоянии окислительно-антиоксидантной системы, проявляющемся повышением концентрации АФК мгновенно или хронически

[46]. Избыточный синтез клеткой АФК может вызывать клеточную гибель или повреждение клеток [45]. Изменение уровня АФК является результатом синте-



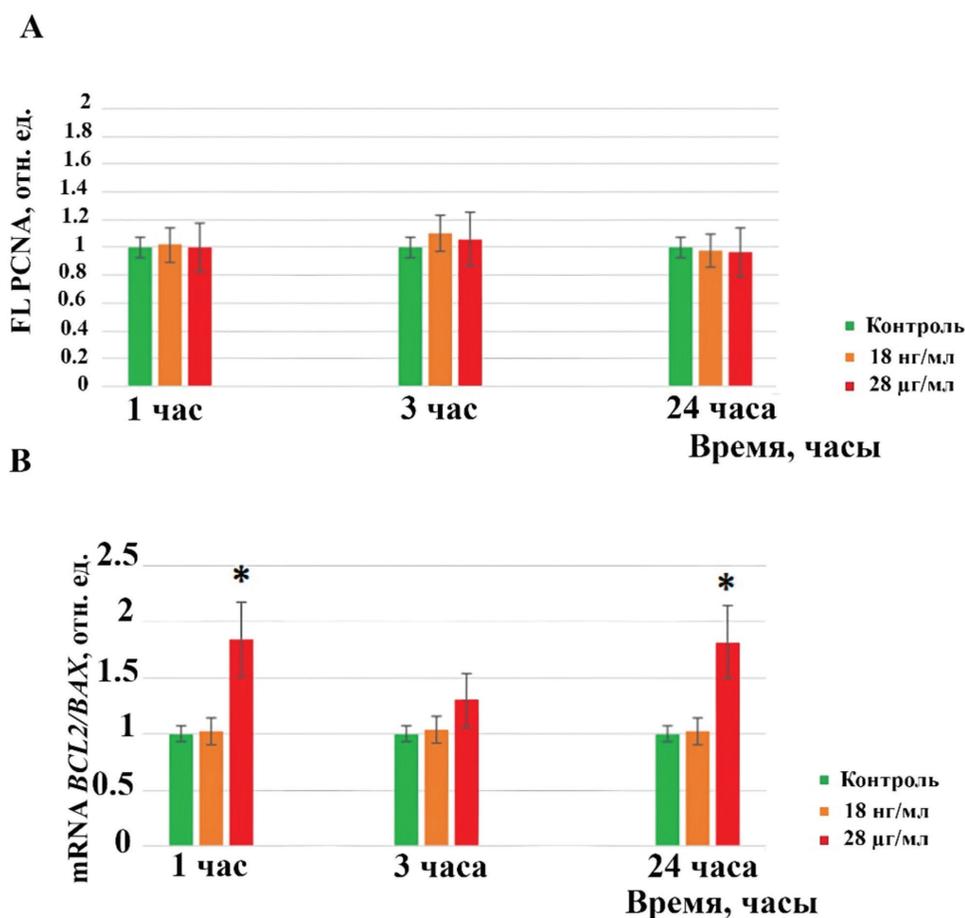
**Рис. 9.** А, В – Гистограммы распределения медиан значений сигналов маркера окисления ДНК – 8-oxodG (А) и фосфорилированной формы гистона H2AX (В) в ФЛЭЧ при действии Ф1 в концентрациях, указанных на рисунке, относительно контрольных значений. С – Пример получаемых методом проточной цитофлуориметрии распределений фосфорилированной формы гистона в ФЛЭЧ через 24 часа после добавления к клеткам Ф1 в концентрации 28 μг/мл (1) и 18 нг/мл (2) по сравнению с контролем – клетками без добавления фуллерена (3). Д – Экспрессия гена *BRCA1* в клетках ФЛЭЧ при действии Ф1 в концентрациях, указанных на рисунке. Е – Гистограммы распределения медиан значений сигналов белка *BRCA1* в ФЛЭЧ при действии Ф1 в концентрациях, указанных на рисунке, относительно контрольных значений. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 9.** А, В – Histograms of the distribution of median values of signals of the DNA oxidation marker – 8-oxodG (А) and the phosphorylated form of histone H2AX (В) in HELF in the presence of F1 at the concentrations indicated in the figure, relative to control values. С – An example of the distribution of the phosphorylated form of histone in HELF 24 hours after adding to F1 cells at a concentration of 28 μg/ml (1) and 18 ng/ml (2) compared to the control (3), obtained by the flow cytometry. Д – Expression of the *BRCA1* gene in HELF cells in the presence of F1 at the concentrations indicated in the figure. Е – Histograms of the distribution of median values of *BRCA1* protein signals in HELF in the presence of F1 at the concentrations indicated in the figure, relative to control values. (\*) – significant differences with control cells,  $p < 0.01$ , nonparametric U-test.

за свободных радикалов в клетках и связывания свободных радикалов фуллереном.

Вероятно, высокие концентрации Ф1 при добавлении в среду культивирования клеток работают как акцепторы свободных радикалов, но через 24 часа в клетках включаются механизмы, противодействующие снижению уровня АФК и активируется синтез свободных радикалов, что и приводит к повышению уровня АФК. Исследуемое производное фуллерена C(60) при добавлении в среду культивирования ФЛЭЧ оказывается менее эффективным антиоксидантом в первые 3

часа инкубации по сравнению с ранее исследованными соединениями [41-43], однако мы обнаружили эффект снижения уровня АФК в клетках в присутствии низких концентраций Ф1 через 24 часа после раннего подъема значений уровня АФК, что может быть обусловлено избирательной регуляцией экспрессии генов в клетках, зависящей от концентрации добавляемого соединения. Действительно, Ф1 вызывал усиление транскрипции гена *NRF2*, ключевого регулятора антиоксидантной защиты клеток [47]. Как в раннее время воздействия Ф1 на клетки (1 час), так и через 24 часа,



**Рис. 10.** А – Гистограммы распределения медиан значений сигналов белка PCNA в ФЛЭЧ при действии Ф1 в концентрациях, указанных на рисунке, относительно контрольных значений. В – Отношение уровня экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* к проапоптотическому гену *BAX* в культуре клеток ФЛЭЧ при действии Ф1 в концентрации, указанной на рисунке. (\*) – достоверные отличия с контрольными клетками,  $p < 0,01$ , непараметрический U-тест.

**Fig. 10.** A – Histograms of the distribution of median values of PCNA protein signals in HELF in the presence of F1 at the concentrations indicated in the figure relative to control values. B – Ratio of the expression level of the anti-apoptotic gene *BCL2* to the pro-apoptotic gene *BAX* in the HELF in the presence of F1 at the concentration indicated in the figure. (\*) – significant differences with control cells,  $p < 0.01$ , nonparametric U-test.

Ф1 способствовал высвобождению NRF2 из комплекса с ингибитором и его активации. Таким образом, антиоксидантное действие на клетки Ф1 обусловлено суммарным воздействием процессов связывания свободных радикалов соединением, индукции синтеза АФК ферментом NOX4 и активности транскрипционного фактора NRF2, регулирующего экспрессию генов антиоксидантной защиты в клетках.

Помимо антиоксидантных свойств, производные фуллеренов могут представлять собой альтернативные средства для борьбы с вирусами на разных стадиях инфекции путем избирательного действия или в широком спектре [48]. Основопологающим требованием является нетоксичность. Однако биосовместимые наноматериалы часто имеют небольшую противовирусную активность или вообще не имеют ее, что препятствует их практическому использованию [48]. Производные фуллерена C(60) имеют сочетание биосовместимости и противовирусных свойств, что позволяет рассматривать их как эффективные противовирусные препараты. Их противовирусная активность осуществляется через несколько механизмов. Противовирусное воздействие Ф1 в отношении вируса гриппа может быть связано с изменением уровня АФК [49], а снижение уровня экспрессии *NF-kB* с последующим ингибированием

медиаторов воспаления может обладать как иммуномодулирующим, так и противовирусным потенциалом [49,50]. Антиоксидантные свойства Ф1 в низких концентрациях могут обуславливать противовирусную активность этих соединений, поскольку окислительный стресс, индуцированный вирусами, включает не только вмешательство в ведущие метаболические процессы организма, но и регулирует репликацию вируса, и для многих антиоксидантов показан широкий спектр противовирусной активности. Возможно, противовирусная активность Ф1 связана с ингибированием позднего апоптоза клеток, вызванного вирусом, что может быть обусловлено ингибированием апоптотических генов и усилением экспрессии антиапоптотических генов [49]. Это не исключает того, что противовирусное действие Ф1 может быть обусловлено специфическим связыванием Ф1 и вирусных белков, или препятствием развитию жизненного цикла вирусов, как это отмечалось для ряда производных фуллерена [25,48-54].

### Заключение

При дальнейшей разработке противовирусных препаратов необходимо учитывать биологические эффекты, которые вызывают производные фуллере-

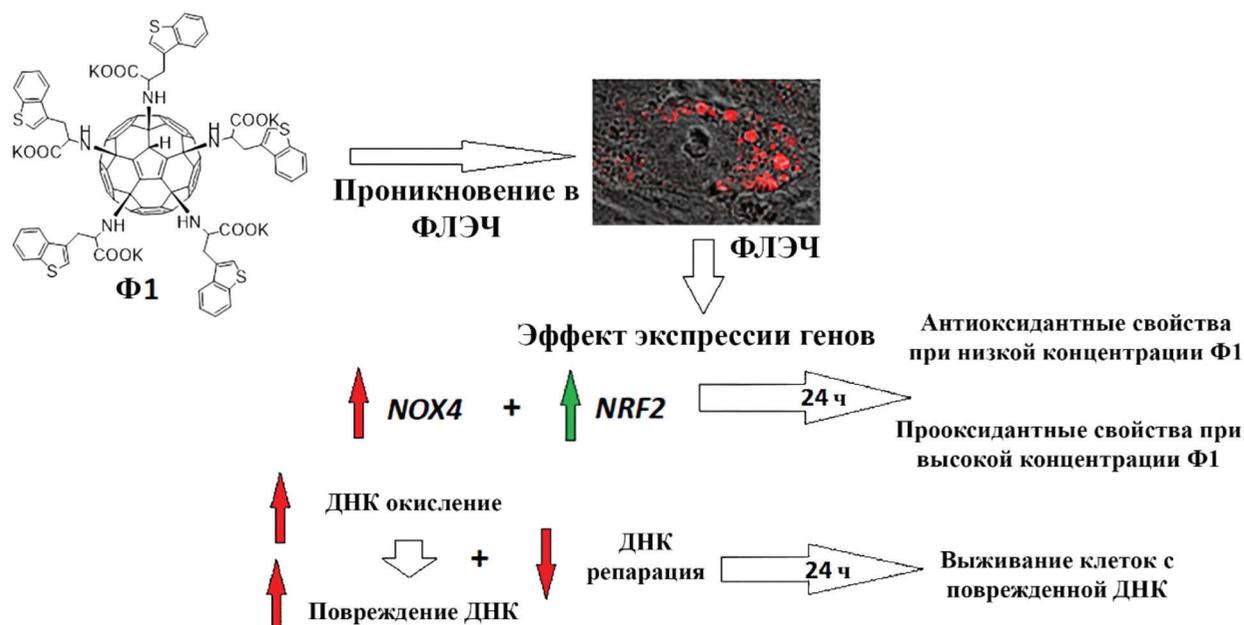


Рис. 11. Эффект воздействия Ф1 на ФЛЭЧ (объяснения в тексте).

Fig. 11. Effect of F1 on HELF (explanations in the text).

нов в отношении ФЛЭЧ. Соединение Ф1 в концентрации, близкой к токсичной, вызывает в культивируемых ФЛЭЧ повышение уровня экспрессии гена и белка NOX4, что приводит к синтезу АФК в клетках и к развитию повреждающего действия соединений на клетки: окислительным модификациям и двунитевым разрывам ДНК ядер клеток через 24 часа инкубации. При этом снижается уровень апоптоза через 24 часа, что может способствовать накоплению в популяции клеток с поврежденной ДНК. Схематично эффект воздействия Ф1 на ФЛЭЧ показан на рис. 11.

### Литература/References

- Sridharan R., Monisha B., Kumar P.S., Gayathri K.V. Carbon nanomaterials and its applications in pharmaceuticals: A brief review. *Chemosphere*. 2022;294:133731.
- Xu P.Y., Li X.Q., Chen W.G., et al. Progress in antiviral fullerene research. *Nanomaterials (Basel)*. 2022;12(15):2547
- Tian H.-R., Chen M.-M., Wang K., et al. An unconventional hydrofullerene C<sub>66</sub>H<sub>4</sub> with symmetric heptagons retrieved in low-pressure combustion. *J. Am. Chem. Soc.* 2019;141(16):6651-6657.
- Zhang H.-G., Zhuo Y.-Q., Zhang X.-M., et al. Synthesis of fullerenes from a nonaromatic chloroform through a newly developed ultra-high-temperature flash vacuum pyrolysis apparatus. *Nanomaterials*. 2021;11(11):3033.
- Kornev A.B., Khakina E.A., Troyanov S.I., et al. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60]fullerene using chlorofullerene C<sub>60</sub>Cl<sub>6</sub> as a precursor. *Chem. Commun.* 2012;48(44):5461-3
- Mashino T. [Development of Bio-active Fullerene Derivatives Suitable for Drug]. *Yakugaku Zasshi*. 2022;142(2):165-179. (In Japanese)
- Dellinger A., Zhou Z., Connor J., et al. Application of fullerenes in nanomedicine: An update. *Nanomedicine*. 2013;8(7):1191-208.
- McEwen C.N., McKay R.G., Larsen B.S. C<sub>60</sub> as a radical sponge. *J. Am. Chem. Soc* 1992;114:4412-4.
- Maas M. Carbon nanomaterials as antibacterial colloids. *Materials*. 2016 Jul 25;9(8):617.
- Yang B., Chen Y., Shi J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chem. Rev*. 2019;119(8):4881-4985.
- Li L., Zhen M., Wang H., et al. Functional gadofullerene nanoparticles trigger robust cancer immunotherapy based on rebuilding an immunosuppressive tumor microenvironment. *Nano Lett*. 2020;20(6):4487-4496.
- Zhou Y., Li J., Ma H., et al. Biocompatible [60]/[70] fullereneols: potent defense against oxidative injury induced by reduplicative chemotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017;9(41):35539-35547
- Norton S.K., Wijesinghe D.S., Dellinger A., et al. Epoxyeicosatrienoic acids are involved in the C70 fullerene derivative-induced control of allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;130(3):761-769.e2.
- Zhou Z., Lenk R.P., Dellinger A., Wilson S.R., Sadler R., Kepley C.L. Liposomal formulation of amphiphilic fullerene antioxidants. *Bioconjugate Chem.* 2010;21(9):1656-61.
- Basso A.S., Frenkel D., Quintana F.J., et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J. Clin. Investig.* 2008;118(4):1532-43.
- Tokuyama H., Yamago S., Nakamura E., Shiraki T., Sugiura Y. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 1993;115:7918-9.
- Dugan L.L., Turetsky D.M., Du C., et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94(17): 9434-9.
- Wong C.-W., Zhilenkov A.V., Kraevaya O.A., Mischenko D.V., Troshin P.A., Hsu S.-H. Toward understanding the anti-tumor effects of water-soluble fullerene derivatives on lung cancer cells: apoptosis or autophagy pathways? *J. Med. Chem.* 2019;62(15):7111-7125.
- Sigwalt D., Holler M., Iehl J., Nierengarten J.-F., Nothisen M., Morin E., Remy J.-S. Gene delivery with polycationic fullerene hexakis-adducts. *Chem. Commun.* 2011;47(16):4640-2.
- Fan J., Fang G., Zeng F., Wang X., Wu S. Water-dispersible fullerene aggregates as a targeted anticancer prodrug with both chemodynamic and photodynamic therapeutic actions. *Small*. 2013;9(4):613-21.
- Sengupta J., Hussain C.M. The emergence of carbon nanomaterials as effective nano-avenues to fight against COVID-19. *Materials (Basel)*. 2023;16(3):1068.
- Panda M., Purohit P., Wang Y., Meher B.R. Functionalized carbon nanotubes as an alternative to traditional anti-HIV-1 protease inhibitors: An understanding towards Nano-medicine development through MD simulations. *J Mol Graph Model*. 2022;117:108280.
- Sridharan R., Monisha B., Kumar P.S., Gayathri K.V. Carbon nanomaterials and its applications in pharmaceuticals: A brief review. *Chemosphere*. 2022;294:133731.
- Katin K.P., Kochaev A.I., Kaya S., El-Hajjaji F., Maslov M.M. Ab initio insight into the interaction of metal-decorated fluorinated carbon fullerenes with Anti-COVID drugs. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2345.
- Křížová I., Dostáková A., Castro E., Prchal J., Hadravová R., Kaufman F., Hrabal, Ruml T., Llano M., Echegoyen L., Rumlová M. Fullerene derivatives prevent packaging of viral genomic RNA into HIV-1 particles by binding nucleocapsid protein. *Viruses*. 2021;13(12):2451.
- Yao C., Xiang F., Xu Z. Metal oxide nanocage as drug delivery systems for Favipiravir, as an effective drug for the treatment of COVID-19: a computational study. *J Mol Model*. 2022;28(3):64.
- Zhu S., Luo F., Zhu B., Ling F., Wang E.L., Liu T.Q., Wang G.X. A nanobody-mediated virus-targeting drug delivery platform for the central nervous system viral disease therapy. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e0148721.
- Friedman S.H., DeCamp D.L., Sijbesma R.P., Srdanov G., Wudl F., Kenyon G.L. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: Model building studies and experimental verification. *J. Am. Chem. Soc.* 1993;115:6506-9.
- Mashino T., Shimotohno K., Ikegami N., et al. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005;15(4):1107-9.
- Tollas S., Bereczki I., Borbás A., Batta G., Vanderlinden E., Naesens L., Herczegh P. Synthesis of a cluster-forming si-allylthio-d-galactose fullerene conjugate and evaluation of its interaction with influenza virus hemagglutinin and neuraminidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2014;24(11):2420-3.
- Muñoz A., Sigwalt D., Illescas B.M., et al. Synthesis of giant globular multivalent glycofullerenes as potent inhibitors in a model of Ebola virus infection. *Nat. Chem.* 2016;8(1):50-7.
- Fedorova N.E., Klimova R.R., Tulenev Y.A., et al. Carboxylic fullerene C<sub>60</sub> derivatives: efficient microbicides against herpes simplex virus and cytomegalovirus infections in vitro. *Mendeleev Commun.* 2012;22:254-6.
- Fiorito S., Serafino A., Andreola F., Togna A., Togna G. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6(3):591-9.

34. Stern S.T., McNeil S.E. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol Sci.* 2008;101(1):4-21.
35. Lehto M., Karilainen T., Róg T., et al. Co-exposure with fullerene may strengthen health effects of organic industrial chemicals. *PLoS One.* 2014;9(12):e114490.
36. Ruan H., Zhang X., Yuan J., Fang X. Effect of water-soluble fullerenes on macrophage surface ultrastructure revealed by scanning ion conductance microscopy. *RSC Adv.* 2022;12(34):22197-22201.
37. Park E.J., Kim H., Kim Y., Yi J., Choi K., Park K. Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 20105;244(2):226-33.
38. Sayes C.M., Gobin A.M., Ausman K.D., Mendez J., West J.L., Colvin V.L. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials.* 2005;26(36):7587-95.
39. Sinegubova E.O., Kraevaya O.A., Volobueva A.S., et al. Water-soluble fullerene C60 derivatives are effective inhibitors of influenza virus reproduction. *Microorganisms.* 2023;11(3):681.
40. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Tabakov V.J., 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.
41. Ershova E.S., Sergeeva V., Chausheva A.I., et al. Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis.* 2016;805:46-57.
42. Kostyuk S.V., Proskurnina E.V., Savinova E.A., et al. Effects of functionalized fullerenes on ROS homeostasis determine their cytoprotective or cytotoxic properties. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(7):1405.
43. Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova E., 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
44. Kostyuk S.V., Proskurnina E.V., Ershova E.S., et al. The phosphonate derivative of C60 fullerene induces differentiation towards the myogenic lineage in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9284.
45. Winterbourn C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 2008;4(5):278-86
46. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020;21(7):363-383.
47. Dinkova-Kostova A.T., Copple I.M. Advances and challenges in therapeutic targeting of NRF2. *Trends Pharmacol Sci.* 2023;44(3):137-149.
48. Innocenzi P., Stagi L. Carbon-based antiviral nanomaterials: graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective. *Chem Sci.* 2020;11(26):6606-6622.
49. Xu T., Lai J., Su J., Chen D., Zhao M., Li Y., Zhu B. Inhibition of H3N2 influenza virus induced apoptosis by selenium nanoparticles with chitosan through ROS-mediated signaling pathways. *ACS Omega.* 2023;8(9):8473-8480.
50. Hasan A., Devi Ms.S., Sharma G., et al. Vathasura Kudineer, an Andrographis based polyherbal formulation exhibits immunomodulation and inhibits chikungunya virus (CHIKV) under invitro conditions. *J Ethnopharmacol.* 2023;302(Pt A):115762.
51. Skariyachan S., Gopal D., Deshpande D., Joshi A., Uttarkar A., Niranjana V. Carbon fullerene and nanotube are probable binders to multiple targets of SARS-CoV-2: Insights from computational modeling and molecular dynamic simulation studies. *Infect Genet Evol.* 2021;96:105155.
52. Kobayashi T., Yasuno T., Takahashi K., Nakamura S., Mashino T., Ohe T. Novel pyridinium-type fullerene derivatives as multitargeting inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, HIV-1 protease, and HCV NS5B polymerase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021;49:128267.
53. Hurmach V.V., Platonov M.O., Prylutska S.V., Scharff P., Prylutsky Y.I., Ritter U. C60 fullerene against SARS-CoV-2 coronavirus: an in silico insight. *Sci Rep.* 2021;11(1):17748.
54. Riley P.R., Narayan R.J. Recent advances in carbon nanomaterials for biomedical applications: A review. *Curr Opin Biomed Eng.* 2021;17:100262.