

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства**

На правах рукописи

БАРАБОШКИНА

ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ВОДОРАСТВОРИМОГО ФУЛЛЕРЕНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ,
ПОДАВЛЯЮЩИХ АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ**

03.03.03 - иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

Хаитов Муса Рахимович,

доктор медицинских наук, профессор

Андреев Сергей Михайлович,

кандидат химических наук

Москва — 2016

Оглавление

Введение.....	5
1. Обзор литературы.....	9
1.1. Структура молекулы фуллерена	9
1.2. Физико-химические свойства фуллерена	10
1.3. Способы перевода фуллерена в водорастворимую форму	16
1.4. Биологические свойства фуллерена	19
1.4.1. Токсичность фуллерена и его производных	19
1.4.2. Взаимодействие фуллерена с клетками и биологическими мембранами	24
1.4.3. Биологическая активность фуллерена и его производных.....	26
1.4.4. Иммунологические эффекты фуллерена	36
1.5. Потенциальное применение фуллерена в терапии аллергических заболеваний.....	45
1.6. Заключение	49
2. Материалы и методы исследования	50
2.1. Лабораторные животные	50
2.2. Фуллерен, его производные и другие реагенты.....	50
2.3. Оборудование	51
2.4. Получение водорастворимого фуллерена	51
2.5. Синтез фуллерен-L-лизин (C_{60} -Lys)	51
2.6. Получение фуллерен-L-аргинина (C_{60} -Arg)	52
2.7. Получение фуллерен-пиперазина (C_{60} -Pip)	52

2.8. Электронная спектроскопия.....	53
2.9. Инфракрасная Фурье-спектроскопия.....	53
2.10. Масс-спектроскопия	53
2.11. ζ -потенциал и размер наночастиц	53
2.12. Индукция реакции ГЗТ	53
2.13. Оценка гемолитической активности водной дисперсии фуллерена.....	55
2.14. Оценка острой токсичности водной дисперсии фуллерена.....	56
2.15. Некропсия и гистологическое исследование	56
2.16. Моделирование экспериментального атопического дерматита.....	57
2.17. Забор крови и получение сывороток.....	58
2.18. Определение уровней специфических антител.....	58
2.19. Выделение и стимуляция клеток селезенки	59
2.20. Анализ уровня цитокинов	59
2.21. ПЦР в реальном времени.....	59
2.22. Статистический анализ	61
3. Результаты исследований.....	62
3.1. Получение водорастворимого фуллерена и его производных и анализ их физико-химических свойств	62
3.2. Первичный скрининг полученных препаратов на основе фуллерена	73
3.3. Оценка гемолитической активности водной дисперсии фуллерена.....	80
3.4. Оценка токсичности водной дисперсии фуллерена	81
3.5. Изучение противоаллергических эффектов водной дисперсии фуллерена на экспериментальной модели атопического дерматита	86

3.5.1. Оценка иммунного ответа при введении фуллерена dnC_{60}	86
3.6.2. Влияние фуллерена dnC_{60} на экспрессию филаггрина.....	92
3.6.3. Влияние фуллерена dnC_{60} на гистологические изменения кожи у мышей с экспериментальным АД.....	94
4. Обсуждение результатов	100
4.1. Получение водорастворимого фуллерена и его производных	100
4.2. Анализ действия водорастворимого фуллерена и его производных на реакцию гиперчувствительности замедленного типа	102
4.3. Оценка безопасности водной дисперсии фуллерена.....	104
4.4. Изучение противоаллергических эффектов водной дисперсии фуллерена на экспериментальной модели атопического дерматита	105
5. Заключение	111
Выводы	112
Список использованных сокращений	113
Список литературы	114

Введение

Актуальность темы исследования

В настоящее время распространенность аллергических заболеваний в различных регионах России составляет 15-40% [Khaitov et al., 2014] и охватывает 10-30% взрослого и 20-50% – детского населения [Хаитов, 2009; Богова и др., 2008].

Наряду с ростом числа больных бронхиальной астмой, аллергическим ринитом, увеличивается и количество пациентов с аллергическими заболеваниями, протекающими с поражением кожи. В структуре кожных заболеваний частота атопического дерматита (АД) составляет 20-40% [Третьякова, Олейник, 2006]. В течение последних тридцати лет распространенность АД во всем мире увеличилась среди детей в 2 раза и составляет 10-37%, а среди взрослого населения – в 5 раз и составляет 0,2-2% [Bieber, 2008]. В России распространенность АД составляет 5,9%.

Применение фуллерена и его производных для терапии аллергических заболеваний является новым подходом к профилактике и лечению данной патологии. Фуллерен C_{60} - аллотропная форма углерода, идеально сферическая молекула фуллерена с 60-ю атомами углерода имеет размер 0,7 нм. Уникальная форма, малый размер молекулы, а также физические и химические свойства фуллерена открывают огромные возможности его применения во многих биомедицинских областях. В настоящее время синтезировано множество производных фуллерена, обладающих обширным спектром биологической активности: противоопухолевой [Yang X. et al., 2002], противовирусной [Меджидова и др., 2004; Lin Y. et al., 2000], антимикробной [Tsao et al., 2002], антиоксидантной [Wang et al., 1999], нейропротективной [Dugan et al., 1997; Dugan et al. 2001], фотодинамической [Käsermann, Kempf, 1998; Vileno, 2004], мембранотропной [Андреев И. и др., 2002; Kotelnikova et al., 1998].

Одно из самых важных и востребованных свойств фуллерена и его производных – антиоксидантная активность, способность инактивировать синглетный кислород, который, служит первичным маркером воспаления и

развития окислительного стресса, являющегося одной из основных причин аллергических и воспалительных реакций. Это свойство делает фуллерен привлекательным в качестве основы для синтеза противоаллергических средств и перспективным для применения в клинической практике.

Таким образом, актуальность темы определяется возможностью создания новых лекарственных средств, безопасных для введения в организм и обладающих высокой противовоспалительной и противоаллергической активностью, а также изучением их эффектов и механизмов действия по контролю аллергии и воспаления.

Цель исследования – получить водорастворимый фуллерен C_{60} и его производные, изучить безопасность полученных соединений, а также их противовоспалительную и противоаллергическую активность на экспериментальных моделях реакции гиперчувствительности замедленного типа и атопического дерматита для возможного последующего использования в клинической практике.

Задачи исследования:

1. Получить водорастворимый фуллерен C_{60} и его производные, а также провести анализ физико-химических свойств полученных соединений;
2. Провести скрининг соединений на основе фуллерена на экспериментальной модели реакции гиперчувствительности замедленного типа;
3. Оценить безопасность водного раствора фуллерена C_{60} на моделях острой токсичности и гемолитической активности;
4. Изучить противоаллергическую активность водного раствора фуллерена на модели экспериментального атопического дерматита;
5. Изучить влияние водного раствора фуллерена на экспрессию эпидермального белка филаггрина, играющего важную роль в развитии АД.

Научная новизна работы

Разработан новый способ получения водорастворимых производных фуллерена с аминосоединениями, преимуществом которого является физиологичность полученных соединений и исключение применения токсичных растворителей в процессе синтеза. Растворимость в водной среде производных фуллерена увеличивает биодоступность и позволяет вводить их в кровяное русло, без риска развития сосудистой эмболии и повреждения почечных канальцев.

Показана иммуномодулирующее действие водорастворимого фуллерена и его производных на экспериментальной модели реакции ГЗТ. Введение соединений ослабляет внешнее проявление реакции - отек стопы лабораторных животных, и снижает активацию Th1- и Th2-лимфоцитов и Th17-клеток, ответственных за развитие аллергических реакций и воспаления.

Показана безопасность водного раствора фуллерена dnC_{60} . Анализ острой токсичности и гемолитической активности не выявил токсического и раздражающего действия dnC_{60} .

Впервые показана противоаллергическая активность водного раствора фуллерена dnC_{60} на модели экспериментального атопического дерматита. Применение dnC_{60} приводит к переключению иммунного ответа с Th2-типа на Th1-тип.

Впервые на модели экспериментального атопического дерматита исследовано влияние водного раствора фуллерена dnC_{60} на экспрессию филаггрина, которому отводится ключевая роль в формировании эпидермального барьера кожи. Недостаток филаггрина приводит к нарушению барьерной функции кожи, увеличивает проникновение токсичных веществ и аллергенов, что способствует развитию АД. Показано, что при эпидермальном нанесении водного раствора фуллерена наблюдается значительное увеличение экспрессии филаггрина, способствующее восстановлению эпидермального барьера кожи лабораторных животных.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы определяется расширением понимания механизмов действия фуллерена на аллергические реакции и воспаление.

Основным имеющим значением для практики результатом работы является получение водного раствора фуллерена, обладающего значительным противоаллергическим и противовоспалительным действием.

Показана перспективность перехода к клиническому применению водного раствора фуллерена dnC_{60} , с учетом его безопасности и способности стимулировать экспрессию филаггрина.

Результаты диссертационной работы открывают перспективу использования водного раствора фуллерена и его производных в качестве основы новых лекарственных средств для терапии аллергических заболеваний, воспалительных и аутоиммунных патологий.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, 50 рисунков. Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы. Библиография включает 201 источник, в том числе 36 отечественных и 165 зарубежных.

1. Обзор литературы

1.1. Структура молекулы фуллерена

Фуллерен – уникальная симметричная молекула, имеющая сферическую форму с диаметром около 0,7 нм, содержащая 60 атомов углерода, которые расположены в вершинах правильных 12 пятиугольников и 20 шестиугольников на поверхности усеченного икосаэдра (рисунок 1.1) [Елецкий, Смирнов, 1995]. Фуллерен является принципиально новой формой углерода. Он может существовать в виде отдельных молекул, все атомы фуллерена находятся на поверхности при отсутствии свободных валентностей, в отличие от углерода и алмаза [Сидоров и др., 2005].

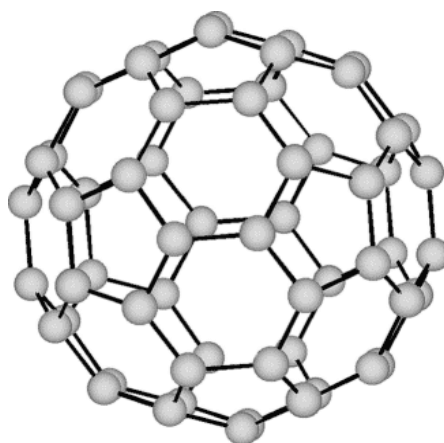


Рисунок 1.1. – Структура молекулы C_{60} .

В фуллерене каждый атом углерода находится в вершинах двух шестиугольников и одного пятиугольника, все атомы в C_{60} эквивалентны. Это подтверждается спектром ядерного магнитного резонанса (ЯМР) изотопа ^{13}C — он содержит всего одну линию. Каждый шестиугольник граничит с тремя шестиугольниками и тремя пятиугольниками, а каждый пятиугольник граничит только с шестиугольниками [Левашов и др., 1997]. Однако связи молекул углерода в фуллерене имеют разную длину. Двойная связь $C=C$, являющаяся общей стороной для двух шестиугольников, составляет 1.39 \AA , а одинарная связь $C-C$, общая для шести- и пятиугольника, длиннее и равна 1.44 \AA [David et al, 1991].

Еще одна необычная структурная особенность фуллерена заключается в

том, что его молекула имеет внутреннюю полость, диаметр которой приблизительно 5 Å. Толщина сферической оболочки фуллерена составляет около 1 Å, а внешний диаметр – около 7 Å.

1.2. Физико-химические свойства фуллерена

В природе фуллерены образуются при горении природного газа, сгорании топлива в автомобилях [Lagally et al., 2012], вулканических извержениях и разрядах молний [Buseck, 2002]. Молекулы фуллерена были найдены в шунгите, природном углеродном минерале, в Карелии [Резников, Полеховский, 2000], в метеоритах и космосе [Evans et al., 2012].

Основные физические свойства фуллерена представлены в таблице 1.1. Кристаллический фуллерен, или фуллерит, приобретает прямоугольную кубическую, объемноцентрированную кубическую или гранецентрированную кубическую кристаллическую структуру в зависимости от изменений внешних условий (температура, давление) [Schur et al., 2012].

Таблица 1.1. Основные физические свойства фуллерена [Diederich, 1997].

Внешний вид	Черный / коричневый порошок
Запах	Без запаха
Плотность	1,65 г / см ³
Показатель преломления	2.2 (600 нм)
Точка кипения	Сублимируется при 800 °К
Кристаллическая форма	Гексагональная кубическая

Между молекулами C₆₀ в кристалле фуллерита существует слабое Ван-дер-Ваальсовское взаимодействие. Кристаллы фуллерита имеют плотность 1,72 г/см³, что значительно меньше плотности графита (2,3 г/см³) и алмаза (3,5 г/см³).

Фуллерен имеет следующие спектральные параметры: масс-спектрометрия – молекулярный ион M=720 Да, инфракрасная спектроскопия – 1429, 1183, 577 и 528 см⁻¹, ¹³C ЯМР – 143 ppm.

При облучении светом проходит окисление фуллерена при комнатной

температуре, поэтому фуллерены необходимо хранить в темноте. Процесс облучения, продолжающийся несколько часов, приводит к разрушению решетки и образованию неупорядоченной структуры, в которой на исходную молекулу C_{60} приходится до 12 атомов кислорода.

Фуллерены участвуют в различных типах химических реакций. Фуллерен является сильным акцептором электронов в присутствии многих органических и неорганических доноров [Singh S., Singh A., 2013]. Это связано с высокой электроотрицательностью фуллерена, в химических реакциях он ведет себя как сильный окислитель и способен присоединять к себе до шести свободных электронов.

Для фуллерена основным типом химических превращений являются реакции по двойной связи – реакции нуклеофильного и радикального присоединения, циклоприсоединения. Такие реакции очень удобны для получения производных фуллерена и создания новых биологически активных веществ. Функционализированные фуллерены делятся на два класса: экзоэдральные - с заместителями за пределами ядра и эндоэдральные - с захваченными молекулами внутри ядра фуллерена [Li F.-B. et al., 1993]. Поскольку фуллерен способен эффективно принимать и отдавать электроны, он может служить хорошим катализатором.

Реакции нуклеофильного присоединения

Электрофильные двойные связи C_{60} легко и охотно присоединяют различные нуклеофилы и радикалы. Примерами нуклеофильного присоединения служат реакции с реактивом Гриньяра и литийорганическими соединениями [Zhang et al., 2006; Izquierdo et al., 2009]. При проведении реакций в органических растворителях на первой стадии процесса образуются нерастворимые соли RC_{60}^- с катионами металлов (MgX^+ , Li^+), последующее протонирование приводит к образованию растворимых (например, в тетрагидрофуране) 1-замещенных 1,2-дигидрофуллеренов (рисунок 1.2) [Юровская, 2000].

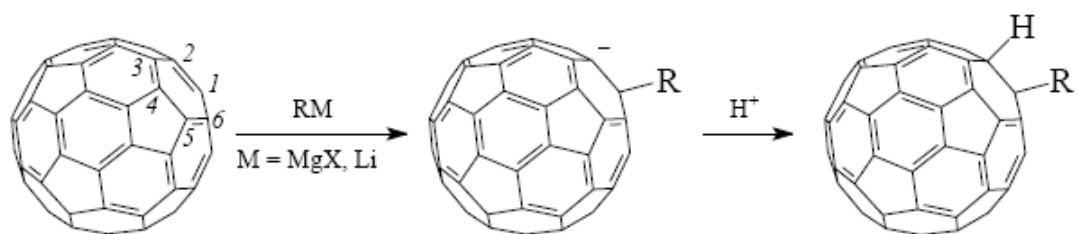


Рисунок 1.2. - Реакция присоединения C-нуклеофилов [Юровская, 2000].

Реакции гидроалкилирования

Радикальное присоединение также ведет к замещенным или полизамещенным дигидро- или полигидрофуллеренам. Для стерически не взаимодействующих присоединяющихся фрагментов предпочтительно 1,2-присоединение, в случае же возможного возникновения стерических препятствий идет 1,4-присоединение. Так фуллерен реагирует с хлорбензолом и хлористым алюминием в реакции алкилирования Фриделя-Крафтса. В такой реакции гидроалкилирования продуктом является аддукт с 1,2-присоединением (Ar-CC-H) [Li Y. et al., 2004; Iwashita et al., 2007].

Циклоприсоединение

Наиболее распространенные реакции в химии фуллерена [Сидоров и др., 2005.] – это реакции циклоприсоединения, известного в органической химии как диеновый синтез Дильса-Альдера, где C_{60} всегда выступает в роли диенофила. Например, процесс присоединения пентадиена выглядит следующим образом (рисунок 1.3):

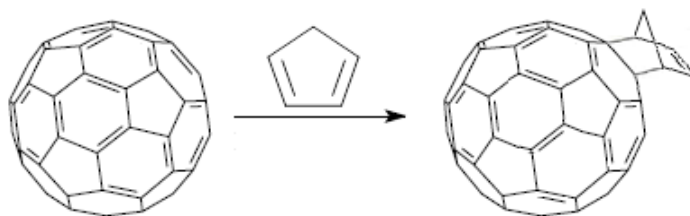


Рисунок 1.3. - Реакции циклоприсоединения пентадиена.

Реакция Прато — пример 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиновых илидов к фуллерену (рисунок 1.4) [Martín et al., 2006]. Эту реакцию

часто используют для модификации фуллерена, она позволяет вводить в ядро C_{60} практически любые функциональные группы.

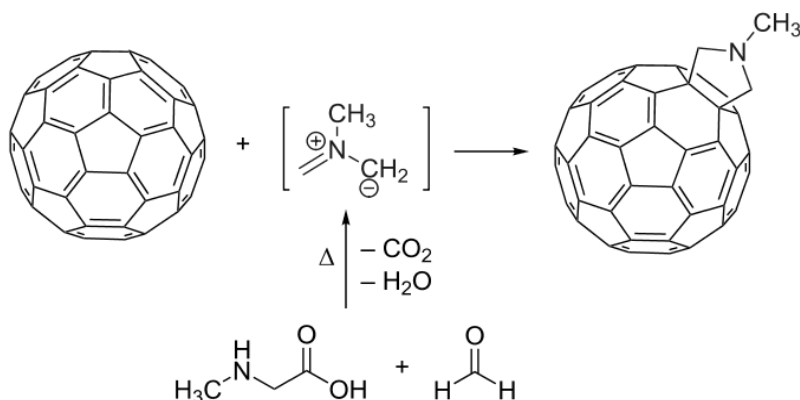


Рисунок 1.4. - Механизм реакции Прато.

Гидрирование

Фуллерены легко гидрируются несколькими методами с получением $C_{60}H_{18}$ и $C_{60}H_{36}$. Получение полностью гидрированного фуллерена $C_{60}H_{60}$ невозможно из-за наличия стерических препятствий. При длительном гидрировании фуллеренов путем прямого взаимодействия с газообразным водородом в условиях высокой температуры происходит распад структуры ядра с образованием полициклических ароматических углеводородов [Talyzin et al., 2006].

Гидроксилирование

Фуллерены могут присоединять гидроксильные группы с образованием фуллеренолов. Растворимость таких соединений в воде зависит от общего количества гидроксильных групп, которые могут быть присоединены. Одним из методов гидроксилирования является реакция фуллерена с разбавленной серной кислотой и нитратом калия с образованием $C_{60}(OH)_{15}$. Другой метод состоит в реакции с NaOH, катализируемой тетрабутиламмоний гидроксидом (Bu_4NOH), с присоединением к фуллерену от 24 до 26 гидроксильных групп [Whitaker, 2011]. Производное $C_{60}(OH)_8$ получали с использованием многостадийной реакции, смешивая фуллерен и перекись [Zhang et al., 2010]. Максимальное количество гидроксильных групп, которые могут быть присоединены к фуллерену (метод с перекисью водорода) составляет 36-40 [Kokubo et al., 2008] (рисунок 1.5). Такая

модификация является очень распространенным способом гидрофилизации фуллерена для перевода его в водную фазу.

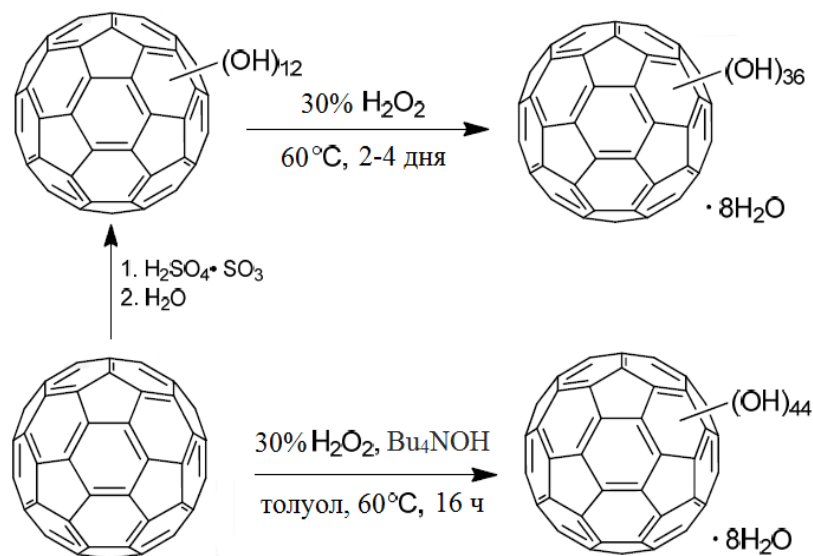


Рисунок 1.5. - Методы получения фуллеренолов [Kokubo et al., 2008].

Реакции электрофильного замещения

Фуллерены проявляют высокую активность в реакциях электрофильного замещения. В реакции с бромом может присоединиться до 24 атомов брома к сфере фуллерена, а с фтором до 48 атомов - C₆₀F₄₈ [Jia J. et al., 2008].

Реакции окисления

Несмотря на то, что окисление фуллерена является более трудным, чем его восстановление, реакция окисления возможна в присутствии кислорода и тетраоксида осмия [Deng et al., 1997].

Реакции присоединения первичных и вторичных аминов

В ходе реакций присоединения аминов происходит необычное изменение окраски реакционного раствора [Hirsch et al., 1991]. Так, при обработке C₆₀ чистым пропиламином в присутствии кислорода воздуха образуется раствор зеленого цвета, который постепенно становится коричневым. Такая яркая окраска характерна для образования анион-радикалов, свидетельствуя о том, что присоединение аминов идет по радикальному механизму. В присутствии кислорода эта реакция сопровождается окислением фуллерена. В случае использования линейных или циклических аминов часто образуются продукты

полиприсоединения (до 12 остатков на одно ядро фуллерена для пропиламина). Следует отметить, что присоединение амина к C_{60} снижает его основность на несколько порядков [Kurcz et al., 1998]. Однако для стерически затрудненных аминов, например, содержащих краун-эфирные группировки, возможно образование моноаддуктов. (рисунок 1.6) [Романова и др., 1994; Вольпин и др., 1998]:

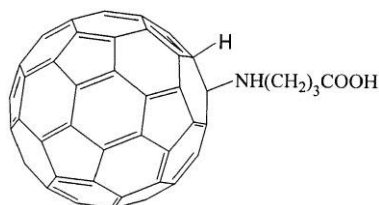


Рисунок 1.6. - Водорастворимый моноаддукт фуллерена с γ -аминомасляной кислотой.

Реакция с избытком вторичного диамин (например, N,N' -диметилэтилендиамина) приводит к устойчивому шестичленному аддукту (рисунок 1.7) за счет присоединения по двойной связи 6—6, что исключает в молекуле образование нежелательных двойных связей 5—6, нарушающих ароматичность шестичленных колец:

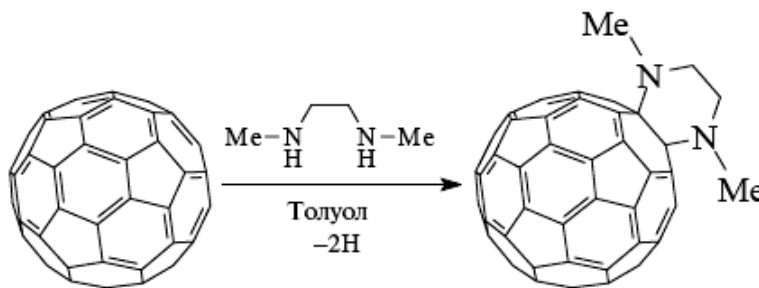


Рисунок 1.7. - Аддукт фуллерена с N,N' -диметилэтилендиаминном.

При окислении кислородом (при УФ-облучении) образуется оксид фуллерена. В связи с этим растворы фуллерена в органических растворителях рекомендуется хранить и работать с ними в инертной атмосфере. Фуллерен, содержащий несколько аминогрупп, водорастворим.

Российские исследователи разработали новый способ синтеза производных фуллерена на основе реакции Фриделя-Крафтса, путем арилирования

хлорофуллерена $C_{60}Cl_6$ с метиловыми эфирами фенилуксусной и бензилмалоновой кислот с последующим гидролизом эфирных групп (рисунок 1.8) [Troshina et al., 2007].

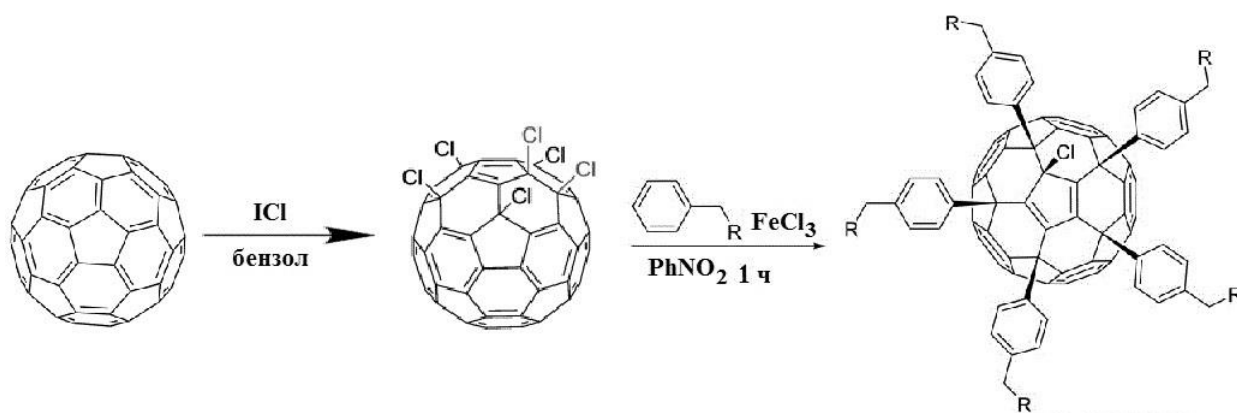


Рисунок 1.8. - Синтез производных фуллерена, хорошо растворимых в воде, с использованием хлорофуллерена $C_{60}Cl_6$ [Troshina et al., 2007].

1.3. Способы перевода фуллерена в водорастворимую форму

Для проведения биохимических и медицинских исследований необходимо располагать стабильными водными растворами фуллеренов. Чрезвычайно высокая гидрофобность фуллерена в сочетании с тенденцией к образованию агрегатов, затрудняет его прямое биомедицинское использование [Bagchi et al., 2012]. В настоящее время имеется множество работ, посвященных этой проблеме, и решают ее, в основном, тремя путями: получением водных дисперсий фуллерена, созданием C_{60} -комплексов с гидрофильными соединениями и ковалентным присоединением к ядру гидрофильных групп.

Первые исследования фуллерена показали, что он плохо растворим в любых растворителях (таблица 1.2). Фуллерены практически нерастворимы в полярных растворителях типа спиртов, в ацетоне, тетрагидрофуране, малорастворимы в нормальных алканах (пентан, гексан, декан) [Ruoff et al., 1993]. Фуллерены достаточно легко растворяются в неполярных растворителях. Наиболее известные растворители образуют следующий ряд в порядке уменьшения растворимости: сероуглерод, толуол, бензол, тетрахлорметан, декан, гексан, пентан [Semenov et al., 2010]. Фуллерен может растворяться в полярных растворителях, если они

способны образовывать комплексы (с переносом заряда), например в N-метилпирролидоне (0,8 мг/мл), пиридине (~0,3 мг/мл). Следует отметить, что специфической особенностью фуллерена является его способность образовывать ассоциаты за счет донорно-акцепторных связей со многими органическими растворителями, в том числе и с водой [Prylutskyu et al., 2013]. Но токсичность органических растворителей и невозможность их введения в организм не позволяет использовать полученные растворы в медицинских целях. В водных средах фуллерен практически нерастворим – $1,3 \times 10^{-11}$ г/л [Безмельницын и др., 1998], и это является главной проблемой в его использовании в биологии и медицине, несмотря на большой биологический потенциал фуллерена.

Таблица 1.2. Растворимость фуллерена в различных растворителях.

Растворитель	Растворимость (мг / мл)
Вода	$1,3 \times 10^{-11}$
Метанол	0.00004
Ацетон	0,001
Гексан	0,043
Хлороформ	0,16
Дихлорметан	0,26
N-метилпирролидон	0,8
Бензол	1,7
Толуол	3,0
Ксилолы	5,2
1-фенилнафталин	50

Фуллерен способен к образованию стабильных водных дисперсий [Deguchi et al., 2010; Chen K. et al., 2010]. Большинство методов их получения основано на переносе фуллерена из органического раствора в водную фазу с применением ультразвука и постепенном удалении органического растворителя с помощью вакуума или продувкой инертным газом. В результате образуется стабильный коллоидный раствор, содержащий гидратированные кластеры из молекул C_{60} ,

размер которых зависит от особенностей метода. Наличие отрицательного заряда на поверхности кластеров играет важную роль в стабилизации водных дисперсий фуллерена. Так, в различных образцах концентрация фуллерена варьирует от 0,001-1,5 мг/мл и такие дисперсии содержат как единичные гидратированные молекулы фуллерена, так и их кластеры с размерами от 2 до 1000 нм [Мchedlov-Петросян, 2010].

Существует предположение, что аэробные условия во время диспергирования фуллерена в воде способствуют его растворению, к фуллерену присоединяется кислород, с образованием эпоксида на поверхности C_{60} , что повышает их гидрофильность, но при использовании этого метода концентрация получаемых растворов довольно низкая [Murdianti et al., 2012].

Другой способ перевода фуллерена в водорастворимую форму – образование комплексов с гидрофильными веществами. Чаще всего для этой цели используют поливинилпирролидон и циклодекстрины. Так, фуллерен переходит в раствор при кипячении его кристаллов с водным раствором γ -циклодекстрина. Фуллерен внутри комплекса может находиться в свободной и гидратированной формах. Такой комплекс можно подвергать гель-хроматографии, правда он медленно разлагается при этой операции [Mchedlov-Petrossyan, 2013].

Амфифильные полимеры, в том числе и белки, способны образовывать нековалентные ассоциаты с C_{60} , растворимые в воде. В этом качестве наибольшую популярность приобрел биосовместимый полимер – поливинилпирролидон (ПВП). Он образует коричневый раствор с содержанием фуллерена 0,5-1% в зависимости от молекулярной массы ПВП [Guskova et al., 2014; Yusa et al., 2011]. Другой пример – комплекс с липосомами, они имеют упорядоченную стабильную структуру и привлекательны как средство для доставки препаратов в клетки [De Maria et al., 2006].

Устойчивые водные дисперсии фуллерена C_{60} , не содержащие органических растворителей были получены и другими исследователями [Целуйкин и др., 2012]. К смеси воды и ацетона (1:3) с добавкой додецилсульфата натрия в качестве стабилизатора медленно прикапывали раствор фуллерена C_{60} в C_6H_5Cl

или CCl_4 . При интенсивном перемешивании под слабым вакуумом из раствора отгоняли растворители. Постепенно в процессе отгонки фуллерен диспергируется в воде. Таким способом были получены дисперсии с содержанием C_{60} 0.01—0.20 г/л.

1.4. Биологические свойства фуллерена

1.4.1. Токсичность фуллерена и его производных

В литературе часто обобщают понятие «фуллерен» и «функционализированный фуллерен», но по сути это два разных класса соединений. Модифицированный фуллерен уже не является собственно фуллереном, введение функциональных групп может трансформировать специфическую электроноакцепторную активность фуллерена, и таким образом резко изменить его характерные свойства, его токсичность и его взаимодействие с биологической системой. Поэтому, нельзя обсуждать токсичность фуллерена как вообще некоего вещества, необходимо учитывать много факторов (метод получения, структуру молекул, степень агрегации в процессе хранения, форму введения) и принять, что его различные модификации являются разными препаратами.

Споры о токсичности C_{60} ведутся давно [Jung et al., 2009], вопрос о том, являются ли фуллерены и их производные полезными с точки зрения практической медицины или они представляют собой еще один фактор риска, активно дискутируется в научной литературе [Trpkovic et al., 2012].

Первые работы по исследованию токсичности фуллерена появились уже в 1995-96 гг. [Moussa et al., 1995; Moussa et al., 1996], и в них было показано, что при введении мышам фуллерена в дозе 2,5 г/кг, он не вызывал гибели и нарушений в поведении опытных животных в течение 8 недель. Многочисленные дальнейшие исследования также не показали проявления каких-либо нежелательных или токсических проявлений при действии фуллерена на организм. По токсикологической классификации вещества, проявляющие токсичность в дозах выше 1 г/кг, относятся к классу нетоксичных веществ.

Поэтому данные по введению кристаллического фуллерена в дозе 2,5 г/кг свидетельствуют о том, что он является нетоксичным соединением [Пиотровский, 2007].

Анализ токсического действия фуллерена *in vivo* при различных видах введения (через дыхательную систему, желудочно-кишечный тракт, кожу и слизистые оболочки, а также при парентеральном введении) показал, что при поступлении фуллерена через дыхательную систему развиваются местные незначительные и кратковременные воспалительные эффекты, а серьезные патологические нарушения в тканях легких были обусловлены высокими дозами наночастиц. Показано, что фуллерены не раздражают кожные покровы и слизистую оболочку глаз, не проявляют сенсibiliзирующих свойств и не проникают в глубокие слои кожи. Отсутствуют значимые токсические эффекты при пероральном поступлении фуллерена, что свидетельствует о низкой степени абсорбции фуллерена из желудочно-кишечного тракта и его эффективной экскреции [Hendrickson et al., 2014].

Токсичность C_{60} оценивалась в разных экспериментах на клеточных культурах и экспериментальных животных [Jia G. et al., 2005; Sayes et al., 2007; Baker et al., 2008; Horie et al., 2010]. Фуллерен при взаимодействии с водой способен образовывать агрегаты различного размера и, соответственно, различной токсичности. Поэтому наряду с повышением привлекательности фуллеренов для использования в медицинских целях существует также некоторая неопределенность относительно их токсичности и последствий их применения [Орлова и др., 2012]. Функционализация C_{60} при уменьшении видимой токсичности может существенно влиять на характер взаимодействия фуллеренов с биологическими системами [Gao et al., 2010].

Введение фуллерена может менять токсическое действие других примесей. В клетках, культивируемых с C_{60} и As(III), содержание As(III) было заметно выше, так как благодаря фуллерену не происходило повышения клеточной токсичности [Costa et al., 2012]. В определенных условиях C_{60} способны вызывать лизис эритроцитов человека в зависимости от доз и времени, который мог быть

остановлен внесением N-ацетил-L-цистеина, что указывает на роль АФК в этом процессе [Trpkovic et al., 2010].

В работе [Andrievsky et al., 2005] показано, что фуллерен C_{60} в виде водной коллоидной дисперсии не проявляет токсических свойств, а проявляет только свойства антиоксиданта. Этот вывод основывается на более чем десятилетних биологических испытаниях фуллереновой дисперсии в различных экспериментах *in vitro* и *in vivo*, не выявивших каких-либо токсических эффектов (при концентрациях от 10^{-9} до 10^{-4} моль/л и при суммарных дозах вплоть до 25 мг/кг). Таким образом, приведенные выше данные, полученные разными исследователями на разных моделях *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют, что C_{60} , при местной аппликации и внутривнутрибрюшинном введении, не проявляет острой токсичности.

Длительный эксперимент был проведен на крысах [Vaati et al., 2012], в диету которых добавляли фуллерен в виде раствора в оливковом масле (C_{60} -Olive) (рисунок 1.9).

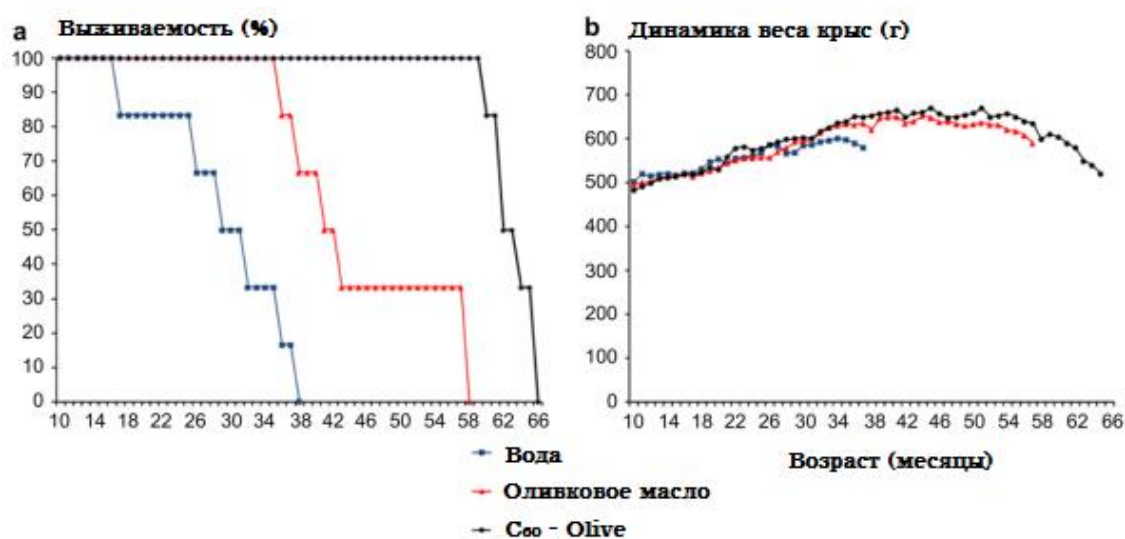


Рисунок 1.9. - Выживаемость и динамика веса крыс с использованием диет (как добавка к основной стандартной диете): фуллерен в оливковом масле (C_{60} -Olive), Оливковое масло и вода [Vaati et al., 2012].

Эксперимент длился 5,5 лет, в качестве контроля использовали диеты с добавлением просто оливкового масла и воды. Фуллерен почти в два раза

увеличивал продолжительность жизни крыс. Различные диеты не влияли на динамику веса животных, что также говорит об отсутствии токсических эффектов у C_{60} . Анализ механизмов действия C_{60} -Olive с использованием экспериментальной модели интоксикации крыс четыреххлористым углеродом (CCl_4), показал, что влияние на продолжительность жизни связано, в основном, с подавлением окислительного стресса.

Токсикология фуллерена была предметом многих дискуссий, но большинство работ показало, что чистый фуллерен в форме водных дисперсий не обладает токсичностью [Венгерович и др., 2012]. Так, водорастворимые производные фуллерена не проявляют острой токсичности *in vivo*, даже в достаточно высоких дозах. Например, величина LD_{50} фуллеренола $C_{60}OH_{18}$ при внутрибрюшинном введении мышам равна 1,2 г/кг [Ueng et al., 1997]. Парентеральное введение мышам аминокислотного производного C_{60} -Ser в дозе 80 мг/кг не оказывало никакого влияния на поведение и жизнеспособность мышей в течение 6 месяцев [Андреев С. и др., 2000]. Более высокую токсичность показал N,N' -(2-гидроксикарбонилэтилкарбонил)- p,p' -бис(2-аминоэтил)-дифенилметано-фуллерен – введение 25 мг/кг внутривенно которого вызывало гибель мышей через 5 мин, но в дозе 15 мг/кг хорошо переносилось животными [Rajagopalan et al., 1996].

Многие исследования по токсичности фуллеренов и его ряда производных (содержащих гидрофильные адденды), показали, что эти вещества обладают низкой токсичностью, а их метаболизм и скорость вывода из организма зависят больше от структуры адденда.

Токсиколого-гигиеническая оценка фуллерена изучалась на крысах при ежедневном внутрижелудочном введении C_{60} на протяжении 28 [Шипелин и др., 2012a] и 92 [Шипелин и др., 2012b] дней. В диапазоне доз от 0.1 до 10 мг/кг массы животного не было выявлено накопление этого вещества в печени, головном мозге, селезенке, жировой ткани и почках, за исключением единичных случайных находок.

В работе [Kuzyma et al., 2015] исследовалось токсическое действие двух водных растворов фуллерена, полученных разными способами, на культуру клеток китайского хомячка линии V79. $C_{60}/H_2O(NMP)$ получали путем растворения фуллерена в N-метилпирролидоне (в течение 6 ч при КТ), с последующим разбавлением дистиллированной водой. Доля N-метилпирролидона в этом растворе составляет 0,005%. Водная система VDF-60 была получена методом замены растворителя. Фуллерен C_{60} растворяли в толуоле. Затем этот раствор смешивали с водой (органическая фаза:водная фаза = 1:5). Смесь подвергали обработке ультразвуком по 12 ч каждый день в течение 23 дней до полного испарения толуола. Полученный раствор нагревали до температуры кипения и отгоняли с помощью обратного холодильника. $C_{60}/H_2O(NMP)$ и VDF-60 не показали токсичности в экспериментах *in vivo* на клетках китайского хомячка линии V79 в исследуемом диапазоне концентраций C_{60} от 0.05 до 5 мкг/мл. N-метилпирролидон не проявлял высокой токсичности при этих концентрациях фуллерена в растворе, что указывает на возможность его использования в качестве растворителя в дальнейших попытках получить биосовместимые водные растворы C_{60} .

Исследование распределения фуллерена по органам и тканям крыс после однократного введения C_{60} в дозе 2000 мг/кг и многократных введений (30 дней) 250 мг/кг показало, что внутрижелудочные инъекции фуллерена не вызывали смерти, изменений веса и существенных отклонений в поведении животных по сравнению с контролем. Тем не менее, фуллерен всасывается из желудочно-кишечного тракта в кровотоки и проникает во вторичные органы (желудок, тонкий кишечник, печень, селезенка, почки и легкие). Фуллерен был обнаружен в органах и тканях с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии после экстракции из проб толуолом. Суммарные массы обнаруженного фуллерена гораздо меньше, чем вводимая доза, что является показателем его эффективного выведения из организма. Не обнаружено статистически значимых различий в гематологических, биохимических показателях контрольных и обработанных

крыс, никаких патоморфологических изменений во внутренних органах не было зарегистрировано [Hendrickson et al., 2015].

Фуллерен C_{60} и его водорастворимые производные не вызывают острых и хронических токсических эффектов *in vitro* и *in vivo* [Kolosnjaj et al., 2007; Aschberger et al., 2010]. Так, через 7 дней после введения фуллерена C_{60} показатель LD50 для мышей составил 0,7 г/кг, а для крыс - 2 г/кг [Yamago, 1995]. Немодифицированный фуллерен C_{60} не влиял на жизнеспособность тимоцитов крысы, на накопление продуктов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени и мозга и устойчивость эритроцитов к гемолизу [Prylutska, 2007].

1.4.2. Взаимодействие фуллерена с клетками и биологическими мембранами

Детали мембранной транслокации фуллерена пока плохо изучены, хотя многие данные, связанные с эффектами фуллерена на клетки, бактерии и целые организмы, указывают на то, что гидрофобный фуллерен способен проникать через биологические мембраны. В 1994 г. появились данные о том, что ^{14}C -меченый фуллерен быстро поглощается кератиноцитами [Scrivens et al., 1994]. В дальнейшем было установлено, что аминокислотные производные C_{60} -Ala и C_{60} -Ala-Ala проникают через бислойные фосфатидил-липосомы (модель биологических мембран) [Kotelnikova et al., 1996]. Позже аналогичные производные, C_{60} -Pro, C_{60} -Arg и C_{60} -ε-аминокапроновая кислота (C_{60} -Acp), были изучены уже на биологическом объекте, на препаратах симбиосом — азотфиксирующих органелл из корневых клубеньков люпина желтого. Кинетику диссипации мембранного потенциала ($\Delta\psi$) или ΔpH под действием соединений фуллерена измеряли с помощью потенциал-чувствительных зондов и pH-индикаторов. Полученные данные позволили заключить, что диссипация потенциала этими соединениями всецело обусловлена их способностью проникать внутрь симбиосом в форме липофильных ионов [Андреев И. и др., 2002].

В 2002 г. появилась работа о локализации внутри клеток дикарбоксифуллерена $C_{60}C(COOH)_2$ [Foley et al., 2002], который представляет

интерес как нейропротективный агент [Dugan et al., 1997]. Эксперименты проводились с линиями HS68 человеческих фибробластов и почки обезьяны COS-7 с использованием флуоресцентной микроскопии и радиоактивной углеродной метки. Дикарбоксифуллерен через 24 часа локализовался, в основном, в митохондриях и плазматической мембране, в цитозольной фракции его было на порядок меньше. Таким образом, эти данные подтверждали, что производные фуллерена могут преодолевать клеточную мембрану и достигать митохондрий.

Позже, в 2006 г., группа исследователей из Китая представила данные по транспорту дикарбоксифуллерена, конденсированного с флуоресцентной меткой, FITC-кадаверином. После инкубации в течение 30 мин с клетками HeLa конъюгат транспортировался через мембрану и локализовался в цитоплазме, что фиксировалось флуоресцентной микроскопией. [Ye et al., 2006]. В последующей работе та же группа [Li W. et al., 2008] с помощью электронной микроскопии привела доказательства, что транслокация частиц дикарбоксифуллерена (размер 100-400 нм) в клетки (фибробласты) идет, по-видимому, через клатрин-опосредованный эндоцитоз по энергозависимому механизму. Интересно, что в этих экспериментах авторы показали, что частицы через 2 часа после инкубации с клетками локализуются, в основном, в лизосомах, но не в митохондриях или ядрах. В другой работе показано, что фуллерены могут транслоцироваться как в цитоплазму, так и в ядро клетки [Yang et al., 2007].

Российские исследования демонстрировали, что аминокислотные, мономалоновые и трималоновые производные фуллерена C_{60} , и даже его немодифицированная коллоидная форма (nC_{60}) способна проходить через клеточные мембраны эритроцитов, тромбоцитов и симбиосом. Причем скорость транспорта таких соединений сравнима со скоростью переноса ионов K^+ и H^+ ионофорами валиномицином и FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметокси-фенилгидразоном). Однако, скорость транспорта немодифицированного фуллерена (nC_{60}) была существенно медленнее [Andreev et al., 2008].

1.4.3. Биологическая активность фуллерена и его производных

Биологическая активность фуллеренов обусловлена его уникальными свойствами. Липофильность определяет мембранотропные свойства фуллерена, электронодефицитность приводит к способности взаимодействовать со свободными радикалами и способность их возбужденного состояния передавать энергию молекуле обычного кислорода и превращать его в синглетный кислород. Именно благодаря последним двум свойствам фуллерены могут проявлять себя как оксиданты и как антиоксиданты [Пиотровский и др., 2007].

Изучение биомедицинских перспектив применения C_{60} и его производных началось сразу после открытия препаративного способа получения C_{60} в 1990 году. Ограничения были связаны только с низкой растворимостью в биологической среде [Singh S., Singh A., 2013].

Так, первые эксперименты указывали на возможность ингибирования ВИЧ-инфекции в присутствии производного C_{60} [Sijbesma et al., , 1993]. Если облучать светом раствор ДНК, то в присутствии фуллерена происходит ее разрыв. В присутствии света C_{60} могут разрушать бислойные мембраны, и это свойство связано с антибактериальной активностью [Jensen et al., 1996]. С другой стороны, поскольку фуллерены являются мощными антиоксидантами, они с высокой скоростью могут реагировать со свободными радикалами, которые часто становятся причиной повреждения клеток [Da Ros et al., 2001]. Установлено, что фуллерены обладают нейропротективным действием, они контролируют неврологические повреждения таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера и болезнь Лу Герига. Группой российских исследователей были синтезированы нитроксидные метанофуллерены, которые в комбинации с препаратом циклофосфамид проявляют противораковую активность при лечении лейкемии [Нуретдинов и др., 2008].

Фуллерен кардинально отличается по структуре от всех известных биогенных молекул. Поэтому, стоит вопрос – может ли организм при контакте с фуллереном генерировать специфический иммунный ответ? Как известно, антитела к простым углеродным материалам, графиту и алмазу, пока не удалось

получить [Pinneo, 1995]. Установлено, что фуллерен в физиологической среде быстро взаимодействует с компонентами физиологической среды, с белками липидами и другими биомолекулами [Belgorodsky et al., 2005]. Исходя из этого, вряд ли потенциальный иммунный ответ будет направлен на чисто углеродную сферу.

Из проявляемых фуллереном биологических свойств сегодня наибольший интерес представляют противовоспалительная и противовирусная активность, нейропротективные и фотодинамические свойства, а также направление по разработке систем доставки физиологически активных молекул в клетки-мишени.

Антивирусная активность

Первым производным, продемонстрировавшим способность ингибировать протеазу вируса ВИЧ-1 был N,N' -(2-гидроксикарбонилэтил-карбонил)- n, n' -бис(2-аминоэтил)дифенилметанофуллерен- C_{60} (MSAD- C_{60}). Установлено, что ингибирование идет путем специфического блокирования субстрат-связывающего центра фермента. В опытах *in vitro* это производное проявляет активность против первичных вариантов ВИЧ-1 и ВИЧ-2, также как и против азотимидин-устойчивых мутантов. При ведении мышам в дозе 50 мг/кг в сутки в течение 6 дней не было выявлено видимых токсических эффектов. В последующих работах предпринимались неоднократные попытки оптимизировать структуру с учетом трехмерного моделирования образуемого комплекса [Bosi et al., 2003; Mashino et al., 2005]. Механизм противовирусного действия производных фуллерена может базироваться на блокировании нормальной сборки вирионов [Ganser-Pornillos et al., 2008].

Карбоксифуллерен (C_{60} -трималонат) в концентрации 10 мкМ при участии светового воздействия подавляет инфекционную активность вируса Денге, очевидно за счет генерации активных форм кислорода (АФК) по фотохимическому механизму. Но при 40 мкМ это соединение способно практически полностью подавить репликацию вируса даже в полной темноте.

Другой пример использования производных фуллерена в медицине – соединение фуллеренов с ПВП (поливинилпирролидоном). Активная доза

C_{60} /ПВП по отношению к вирусу гриппа типа А в 20 раз по сравнению с известным ремантадином при равном эффекте. Комплекс ингибировал репликацию вирусов гриппа А в дозах 250-1000 мкг/мл, не проявляя при этом цитотоксичности. На настоящий момент можно сказать, что C_{60} /ПВП обладает активностью как против ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, в частности вируса простого герпеса. Их противовирусная активность зависит от дозы и от концентрации C_{60} [Пиотровский, 2001].

Изучение гидрата фуллерен-(трис-аминокапроновой кислоты) (ФТАК гидрата) на клетках HEp-2 показало, что соединение в нетоксичных концентрациях (до 100 мкг/мл) обладает противовирусной активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса (РСВ). Ингибирующая концентрация ($ИК_{50}$) ФТАК гидрата составляла $\approx 5,3$ и $\approx 3,2$ мкг/мл при множественности заражения 0,1 и 0,02 соответственно. ФТАК гидрат обладал противовирусной активностью при добавлении за 2 ч до инфицирования или одновременно с вирусом, в то время как его добавление через 2 ч после инфицирования не влияло на размножение РСВ [Фалынскова и др, 2014].

Растворимые в воде производные карбоксифуллерена C_{60} , полученные реакцией ацилирования $C_{60}Cl_6$, обладают низкой цитотоксичностью и высокой противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса и цитомегаловируса человека. Преператы эффективно ингибировали вирусы в клеточных культурах Vero (эпителиальные клетки почки мартышки) и HELF (человеческие эмбриональные диплоидные фибробласты легких) [Fedorova et al., 2012].

Антибактериальная активность

Биологические эффекты карбоксифуллерена были изучены на 20 видах бактерий. Препарат ингибировал все грамположительные виды в дозе 50 мг/л, в то время как рост грамотрицательных бактерий не подавлялся даже в 10 раз большей дозой. За повреждающее действие грамположительных бактерий был ответственен механизм, связанный с нарушением целостности клеточной мембраны [Ширинкин и др., 2009].

Сравнительное исследование антибактериальной активности двух водорастворимых производных фуллерена, аминифуллерен (АФ) и карбоксифуллерен (КФ), все группы были в ионной форме (рисунок 1.10). Изучение показало, что КФ в форме аниона не проявляло существенной антибактериальной активности. В противоположность этому, соединение АФ, в форме катиона показало сильное и частично необратимое связывание с отрицательно заряженными клетками кишечной палочки K12 TG1 и эритроцитами человека, также обладающими отрицательным ξ -потенциалом. С помощью атомно-силовой микроскопии была зафиксирована адсорбция АФ на бактериальной поверхности и установлено образование специфических кластеров (АФ-агрегатов), окружающих бактериальные клетки. Инкубация E.coli K12 TG1 с АФ приводила к дозозависимому бактерицидному эффекту с $LD_{50}=79.1$ мкМ. Наличие эритроцитов человека в среде снижало антибактериальную активность АФ [Deryabin, 2014].

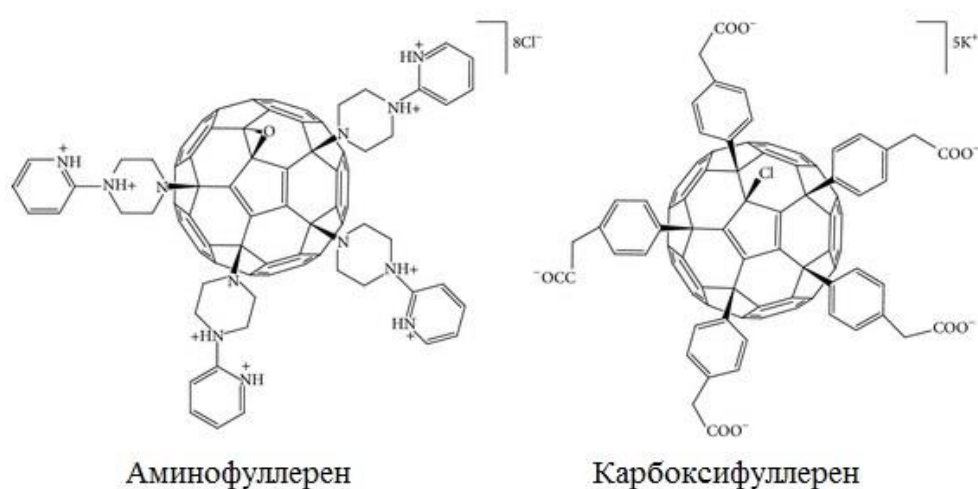


Рисунок 1.10. - Структура производных фуллерена [Deryabin, 2014].

Конъюгаты хиназолинон-фуллерен исследовали на антибактериальную активность в отношении микобактерий туберкулеза (H37Rv) и антимикробную активность против отдельных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Все соединения показали значительную активность, сравнимую с ингибирующими дозами стандартных препаратов. Конъюгат хиназолинон-

фуллерен подавляет рост микобактерий туберкулеза на 98.83% при минимальной ингибирующей концентрации МИК 1.562 мг / мл [Patel et al., 2013].

Показано, что фуллерен-пирролидоны проявляют противомикробную активность против устойчивых к изониазиду и рифампицину штаммов *Mycobacterium tuberculosis* [Krustic et al., 1991].

Нейропротективная активность

Мозг является чувствительным органом в отношении окислительного повреждения, вызываемого свободными радикалами [Halliwell, 1992]. Производные фуллеренов обладают способностью ингибировать цепную реакцию перекисного окисления липидов. В экспериментах на клеточных культурах, карбоксифуллерен защищал корковые нейроны, а также показал надежную нейропротекцию в ряде других клеточных культур на моделях неврологических заболеваний, включая болезнь Паркинсона [Dugan et al., 1997].

В нескольких экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована способность фуллерена предотвращать апоптоз нейронов. В экспериментах на мышах карбоксифуллерены показывали себя как эффективные нейропротекторы при некоторых формах склероза [Lin et al., 2002].

При заболеваниях головного мозга, таких как болезнь Альцгеймера, атеросклероз сосудов мозга, черепно-мозговые травмы нарушается процесс регистрации и хранения информации в долговременной памяти. Для изучения этих вопросов используется модель подавление синтеза белка в головном мозге с помощью ингибиторов, в высоких дозах вызывающих апоптоз нейронов. Для моделирования нарушения памяти у животных часто применяют ингибитор синтеза белка циклогексимид. Предварительное введение за 1 ч до ингибитора комплекса C₆₀/ПВП в дорзальный гиппокамп (микроинъекции) полностью предотвращало нарушение пространственной памяти. Препарат гидратированного фуллерена существенно ускорял навигационное обучение при решении вероятностной задачи. На ультраструктурном уровне в опытах *in vitro* впервые было показано, что гидратированный фуллерен оказывает сильное антиагрегационное действие на β -амилоидные (A β) филаменты, характерные для

болезни Альцгеймера. В опытах на модели острой нейротоксичности, вызванной у взрослых крыс микроинъекцией агрегированного $A\beta_{25-35}$, наблюдалось ослабление нарушения пространственной памяти. Авторы высказывают предположение, что фуллерены улучшают когнитивные процессы в норме и патологии и представляют большой интерес для разработки терапии болезни Альцгеймера [Podolski et al., 2007].

Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y были использованы для оценки эффектов водорастворимого производного фуллерена бис-аддукт транс-3 в качестве потенциального ингибитора гипоксического инсульта [Giust et al., 2014]. Гипоксия связана со многими нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Производное фуллерена способно предотвратить гибель клеток при гипоксии. Кроме того, ПЦР анализ экспрессии генов аденозина A1, A2A и A2B и метаболитных глутаматных 1 и 5-рецепторов показал, что введение производного фуллерена значительно увеличило уровни A1 и mGlu1 в условиях гипоксии и помешало росту экспрессии мРНК A2A. Так фуллерены открывают новые перспективы в качестве нейропротекторных терапевтических средств, способных предотвратить дегенерацию и гибель нейронов, которые связаны с нейродегенеративными заболеваниями.

Антиоксидантные свойства

Результаты многих экспериментов показали, что фуллерены имеют огромный потенциал в качестве биологических антиоксидантов. Их антиоксидантные свойства основаны на том факте, что фуллерены обладают большим объемом сопряженных двойных связей, которые могут легко вовлекать электроны в эту систему. Установлено, что одна молекула фуллерена может принимать до 34 метильных радикалов. Фуллерены эффективно нейтрализуют супероксидные радикалы и даже появился термин «радикальные губки» [Krustic et al., 1991]. Основным преимуществом использования фуллеренов в качестве антиоксидантов является их способность транспортироваться внутрь митохондрий и в другие компартменты клетки, где происходит продукция свободных радикалов [Bakry et al., 2007]. Производные фуллерена с полярными

группами, такие как, фуллеренол и карбоксифуллерен, проникают через клеточную мембрану и локализуются преимущественно в митохондриях [Foley et al., 2002; Youle et al., 2005]. Этот факт может оказаться очень полезным для конструирования специальных препаратов [Tsai et al., 1997; Lotharius et al., 1999; Bisaglia et al., 2000].

Проведенные на крысах эксперименты, доказали эти замечательные свойства фуллерена. Они показали, что водная дисперсия C_{60} приготовленная без использования полярных органических растворителей, не только не имеет острой токсичности у грызунов, но и защищает их печень от повреждения свободными радикалами [Gharbi et al., 2005]. Так, крыс интоксцировали CCl_4 , что приводило к образованию трихлорметильного радикала $CCl_3\bullet$, который вызывал серьезные повреждения печени. При реакции с кислородом указанный радикал формировал высокореакционную перекись, которая приводила к окислению липидов [Slater et al., 1985]. Крысы, предварительно обработанные фуллереном и интоксцированные CCl_4 , не получали повреждения печени. Этот факт подтвердили и гистологические исследования, поэтому фуллерен C_{60} можно рассматривать как эффективное защитное средство против свободных радикалов.

Сравнительный анализ антиоксидантных свойств по отношению к кератиноцитам кожи человека различных производных фуллерена - PEG- C_{60} , PVP- C_{60} , CD- C_{60} , фуллеренол и C_{60} -изостеарат показал, что все они обладают сильным эффектом [Xiao et al., 2005].

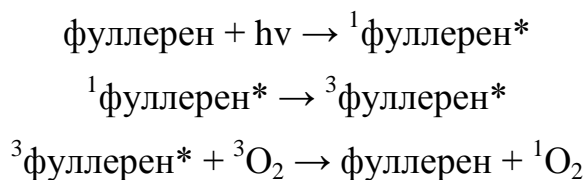
Фуллерены как акцепторы радикалов показали способность защищать клетки от токсинов, которые могут вызвать апоптотические повреждения *in vitro* [Lin A. et al., 1999; Lin A. et al., 2002; Chen Y. et al., 2004] на различных типах клеток, таких как нейронные клетки [Dugan et al. 1997; Bisaglia et al., 2000], клетки гепатомы [Huang et al., 1998], или эпителиальные клетки [Straface et al., 1999].

Защитная активность карбоксифуллерена против окислительного стресса, была изучена на модели индуцированного апоптоза человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), используя 2-дезоксидрибозу (dRib) или ФНО- α с циклогексимидом, которые вызывают изменения

окислительно-восстановительного статуса клетки. При этом установлено, что карбоксифуллерен защищал покоящиеся МКПК от апоптоза, предотвращая окисление липидов митохондриальной мембраны [Monti et al., 2000].

Фуллерены применяются также для защиты клеток против действия УФ-излучения [Xiao et al., 2006]. Ультрафиолетовое излучение (320-400 нм) генерирует активные формы кислорода, которые имеют биологическое воздействие на клетки кожи человека, что приводит к повреждению и гибели клеток. Способность к поглощению радикалов препаратом C₆₀/ПВП была использована для защиты клеток человека или млекопитающих против окислительного стресса.

В триплетном состоянии фуллерен легко реагирует с синглетным кислородом (¹O₂) и другими активными формами кислорода при облучении ультрафиолетовым или видимым светом [Stasheuski et al., 2014]. Передача энергии от возбужденного триплетного состояния фуллерена к основному состоянию кислорода формирует ¹O₂, как показано на схеме:



Синглетный кислород способен необратимо привести к повреждению различных клеточных органелл и биомолекул, в том числе митохондрий, липидов, и ядра, что приводит к повреждению клеток или тканей. Фотосенсибилизатор, генератор синглетного кислорода при облучении светом, является важным фактором в фотодинамической терапии. Сам по себе фуллерен, как генератор синглетного кислорода, почти невозможно использовать для фотодинамической терапии из-за своей чрезвычайно низкой растворимости в воде. А его распространенная гидроксигированная водорастворимая форма C₆₀(ОН)₂₄, имеет низкую эффективность генерации ¹O₂ по сравнению с чистым фуллереном C₆₀ [Zhao et al., 2008].

Влияние карбоксифуллерена на радикалы монооксида азота NO, как

оказалось, не связано с его антиоксидантными способностями, в этом случае эффект обусловлен ингибированием работы фермента синтазы, продуцирующего NO* и ответственного за синтез цитруллина. Еще одно водорастворимое производное C₆₀ с 5 цистиновыми остатками на ядро, CFD, может улавливать как супероксид, так и гидроксильный радикал. Показано, что CFD не проявляет заметной токсичности и способен проникать через клеточную мембрану, блокируя накопление внутриклеточного пероксида [Hu et al., 2007].

Производные фуллерена могут рассматриваться и как перспективные лекарственные средства для профилактики и коррекции ишемических повреждений, например, при реперфузии ишемизированного трансплантата. Поврежденные ишемией митохондрии могут продуцировать большее количество электронов за счет их “утечки” из электронно-транспортной цепи. Эти электроны участвуют в образовании супероксиданион-радикала. Гексасульфобутил-фуллерен (ГСБФ), содержащий 6 сульфобутильных групп, введенный в перфузат изолированного сердца, значительно снижал содержание свободных радикалов по данным ЭПР. ГСБФ был также активен и в случае инфаркта головного мозга. Введение фуллеренола также приводило к снижению тканевого содержания индикаторов окислительного стресса – конъюгированных диенов и малонового диальдегида, определенных через 30 и 60 мин. после реперфузии. Кроме того, фуллеренол-1 предохранял трансплантат от вызванного ишемией-реперфузией истощения тканевых запасов глутатиона [Сыренский и др., 2004].

Противоопухолевая активность

Молекула фуллерена химически стабильна и способна взаимодействовать с биомолекулами, благодаря гидрофобным свойствам проникает сквозь плазматические мембраны и локализуется внутри клетки. Биологические свойства фуллерена зависят от способа его модификации, природы функциональных групп, концентрации в биосредах, условий введения в организм, длительности инкубации, типа клеток и тому подобного.

Поскольку фуллерены C₆₀ способны проникать внутрь клеток различных типов и при определенных условиях вызывать их гибель, они могут быть

использованы как потенциальные противоопухолевые агенты. При поглощении света фуллерены могут генерировать АФК, что делает их возможным агентом при фотодинамической терапии [Орлова и др., 2013]. При действии C_{60} на рост опухолевых клеток меланомы мышей B16 *in vitro* наблюдали оксидативный стресс, митохондриальную деполяризацию и, как результат, активацию каспазного каскада.

Выявлены противоопухолевые эффекты водорастворимого фуллерена C_{60} (в дозе 7,5 мг/кг) *in vivo*, о чем свидетельствовало увеличение продолжительности жизни животных-опухоленосителей с перепрививаемой карциномой Льюиса (рак легких), снижение количества метастаз в легких, уменьшение размера опухоли [Prylutska, 2011]. Для некоторых производных фуллерена описано цитотоксическое влияние на раковые клетки [Bosi и др., 2004; Chen C. et al., 2005].

Фуллеренол $C_{60}(OH)_x$ проявлял противоопухолевую активность *in vivo* в отношении гепатокарциномы H22 у мышей, при внутрибрюшинном введении в дозе 0,2 и 1 мг/кг в день в течение 17 суток, размер опухоли уменьшался на 32% и 38% соответственно [Zhu et al., 2008]. Кроме того, *in vitro* фуллерен стимулировал активацию перитонеальных макрофагов, продукцию ФНО- α , и не вызывал острой токсичности при концентрации 5 мг/кг.

Фуллеренол $C_{60}(OH)_{20}$ в концентрациях 0,08-0,4 мг/мл проявлял противоопухолевую активность в отношении клеток ЕМТ-6 (модель рака молочной железы), о чем свидетельствовало снижение экспрессии факторов ангиогенеза CD-31. Ингибирование роста опухоли и метастаз предположительно может происходить из-за подавления сигнальных путей с участием тирозиновых киназ [Jiao F., 2010]

Изучение противоопухолевого действия фуллерена в концентрации 1 мкг/мл на клетки глиомы человека (линия U251) и клетки глиомы крыс (линия С6), показало индукцию оксидативного стресса, приводящего к некрозу с повреждением мембраны, опосредованному внеклеточной сигнал-регулируемой киназой (ERK), и смерти клеток [Каркищенко, 2009]. Такая же картина наблюдалась в клетках саркомы у мышей. При концентрации C_{60} 0,25 мкг/мл

наблюдали аутофагию и остановку пролиферации в G2/M-фазе. Концентрационно-зависимым образом C₆₀ влияет и на дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши [Nishimura et al., 2006].

1.4.4. Иммунологические эффекты фуллерена

Один из важных аспектов изучения фуллерена связан с иммунореактивностью организма на C₆₀. Являясь мощным антиоксидантом, фуллерен способен непосредственно вмешиваться в клеточные процессы, в частности, связанные с воспалением.

Пока нет точного ответа на вопрос – способна ли иммунная система распознавать чисто углеродный каркас фуллерена. Некоторые исследования показали, что ни фуллерен, ни его производные не способны генерировать C₆₀-специфические антитела и не являются аллергенами.

Многочисленные эксперименты по иммунизации мышей аминокислотными и белковыми производными фуллерена продемонстрировали отсутствие специфического иммунного ответа на фуллерен.

Аллергенность фуллерена была изучена в реакции пассивной кожной анафилаксии на крысах и высвобождения гистамина из базофилов цельной крови здоровых доноров и людей, сенситизированных к аллергенам, результаты указывают на то, что фуллерен и его аминокислотные производные не являются специфическими аллергенами. Таким образом, иммунная система не способна распознавать фуллерен. Ввиду высокой мембранотропной активности и отсутствия антигенной активности производные фуллерена могут быть перспективными носителями для фармацевтических препаратов [Андреев С., 2006].

Антиоксидантная/противовоспалительная активность различных фуллеренов была зарегистрирована многими исследователями [Magoulas et al., 2012]. Фуллерены могут подавлять гиперчувствительность I типа, при инкубировании с C₆₀ человеческих тучных клеток и периферийных базофилов крови. Это подавление связано со снижением уровня активных форм кислорода

(АФК). В модели анафилаксии, фуллерены предотвратили высвобождение гистамина [Ryan et al., 2007]. Наблюдали также подавление продукции фактора некроза опухоли (ФНО- α), и продукции провоспалительных цитокинов, что приводило к ингибированию артрита [Yudoh et al., 2009].

Другие исследования на различных животных моделях также показали эффекты иммуносупрессии фуллеренов. Фуллерен показал подавляющее воздействие на рост опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [Zogovic et al., 2009].

Проводились также исследования по иммуномодулирующим свойствам фуллерена [Park et al., 2010; Chen B. et al., 1998]. После введения C_{60} активирует экспрессию генов различных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α , ИЛ-6) и Th1-цитокинов (ИЛ-12, ИФН- γ) у мышей.

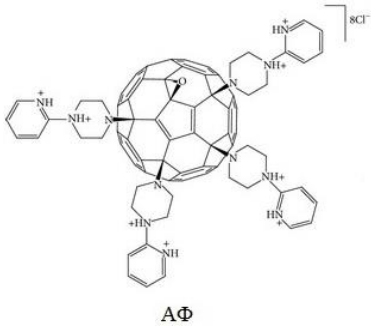
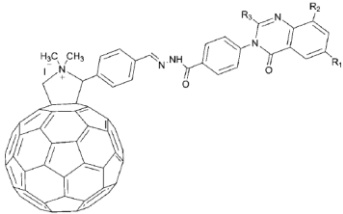


Кроме воспаления, C_{60} может активировать иммунную систему. Были наблюдения, что карбоксифуллерен может продлить бактерицидную активность нейтрофилов [Tsao et al., 2001].

Другие исследования показали, что фуллерен может повысить способность ДК стимулировать Т-клетки и, кроме того, активированные клетки иммунной системы посредством увеличения выработки ИЛ-6 и активацию естественных киллеров (NK-клеток) [Tkach et al., 2013; Bunz et al., 2012].

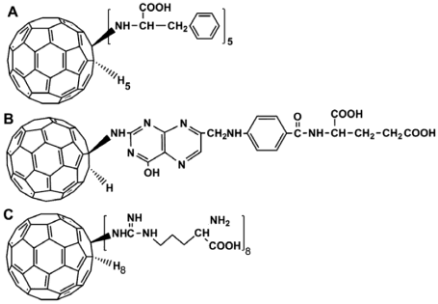
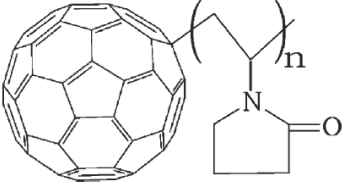
Полигидроксифуллерен ($C_{60}(OH)_n$, $n=18-22$) и N-этил-полиаминофуллерен ($C_{60}(NHCH_2CH_3)_n$, $n=6-18$) ингибировали IgE-зависимую дегрануляцию тучных клеток и секрецию ими цитокинов и простагландинов в ответ на провокацию аллергеном. Водная дисперсия фуллерена проявляла ингибирующий эффект на IgE-опосредованную секрецию гистамина из базофилов периферической крови в системе *in vitro* и подавляла анафилаксию у мышей вызванную введением овальбумина [Babakhin et al., 2009].

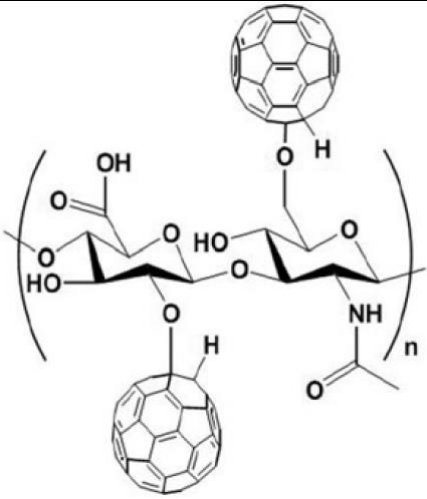
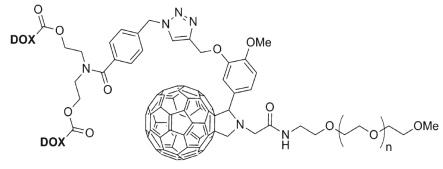
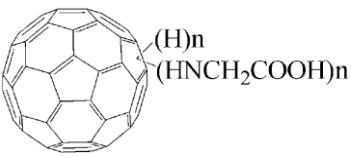
Для большей информативности ниже приведена сводная таблица по биологическим эффектам фуллерена и его производных со ссылками на источники (таблица 1.3).

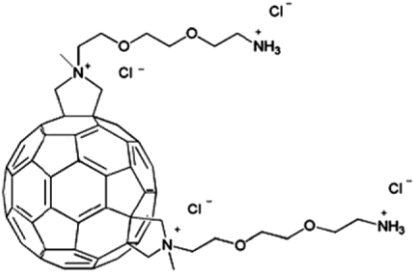

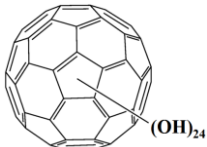

Таблица 1.3. Биологические эффекты фуллерена и его производных.


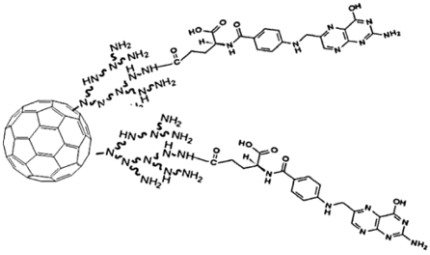
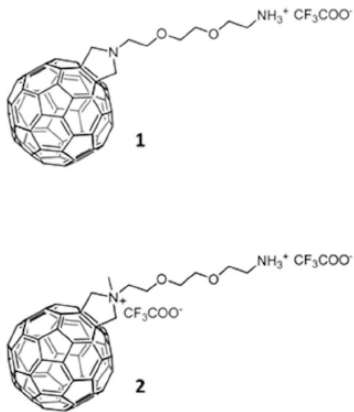
Фуллерен / производное фуллерена. Структура молекулы	Эффект	Источник
<p>Аминопроизводное фуллерена (АФ)</p>  <p style="text-align: center;">АФ</p>	<p>Проявляет антибактериальную активность в отношении отрицательно заряженных клеток кишечной палочки K12 TG1. Инкубация E.coli K12 TG1 с АФ приводила к дозозависимому бактерицидному эффекту с LD₅₀=79.1 мкМ.</p>	<p>Deryabin et al., 2014</p>
<p>Конъюгат хиназолинон-фуллерен</p> 	<p>Проявляет антибактериальную активность в отношении микобактерий туберкулеза (H37Rv). Подавляет рост микобактерий туберкулеза на 98.83%</p>	<p>Patel et al., 2013</p>
<p>Фуллерен C₆₀</p> 	<p>Молекула фуллерена C₆₀ специфически разрушает фибриллы амилоидного пептида Aβ(17-42), ответственного за возникновение болезни Альцгеймера</p>	<p>Huy et al., 2014</p>
<p>Фуллерен C₆₀</p> 	<p>Ингибирование агрегации фибрилл Aβ (16-22) амилоидного пептида</p>	<p>Xie et al., 2014</p>
<p>Гидрат фуллерен (трис-аминокапроновой кислоты)</p>	<p>Противовирусное действие в отношении респираторно-</p>	<p>Фалынскова и др., 2014</p>

	<p>синцитиального вируса</p>	
<p>Поликарбоновое производное фуллерена, несущее остатки фенилуксусной кислоты</p> <p>Фуллеренол C₆₀(OH)₁₈</p>	<p>Проявляют активность в качестве анти-амилоидных агентов путем ингибирования каталитической активности моноаминоксидазы В при болезни Альцгеймера</p>	<p>Kotelnikova et al., 2014</p>
<p>Гибрид фуллерен-сахар</p>	<p>Фотодеградация протеазы ВИЧ-1 и значительная ингибирующая активность в отношении репликации вируса при облучении светом в живых клетках</p>	<p>Tanimoto et al., 2012</p>
<p>Катионное производное фуллерена</p>	<p>Проявляет антибактериальную активность при инкубировании с E.coli (K12 TG1) и Bacillus subtilis (B-10548) in vitro</p>	<p>Kornev et al., 2012</p>

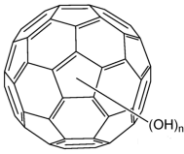

<p>Производные фуллерена:</p> <p>A. фенилаланин-C_{60}</p> <p>B. Фолиевая кислота-C_{60}</p> <p>C. L-аргинин-C_{60}</p> 	<p>Обладают селективностью к опухолевым клеткам HeLa в концентрации 5 $\mu\text{г/мл}$. При облучении видимым светом наблюдалось снижение митохондриального мембранного потенциала, жизнеспособности клеток, активности супероксид-дисмутазы, каталазы, глутатион-пероксидазы, а также увеличение апоптоза за счет повышения активности каспазы-3.</p>	<p>Hu et al., 2012</p>
<p>Сополимер C_{60}-N-винилпирролидон</p> 	<p>Проявляет высокую цитотоксичность по отношению к клеткам HeLa и клеткам остеогенной саркомы мышцы. Апоптоз клеток наблюдался при концентрации сополимера 5 $\mu\text{г/мл}$, а при концентрации 100 $\mu\text{г/мл}$ погибает более 30 % клеток. Мишенью для повреждения являлась клеточная мембрана.</p>	<p>Jiang, Li G., 2012</p>
<p>Конъюгат фуллерена с гиалуроновой кислотой</p>	<p>Потенциально эффективны для фотодинамической терапии и специфическому связыванию с рецептором CD44. Обработка конъюгатом с последующим облучением светом привела к значительному регрессу</p>	<p>Kwag et al., 2013</p>

	<p>опухолевых клеток НСТ-116.</p>	
<p>Конъюгат фуллерена с доксорубицином</p> 	<p>Пролонгированная противоопухолевая активность. DOX-C60-ПЭГ-конъюгаты проявили антипролиферативный эффект по сравнению с неконъюгированным DOX при инкубации с раковыми клетками MCF-7.</p>	<p>Magoulas et al., 2015</p>
<p>Фуллерен-глицин</p> 	<p>Производное фуллерен-глицин проявляет цитотоксичность в отношении клеток HeLa при облучении светом. Гибель и апоптоз клеток увеличивались с увеличением концентрации фуллерена-глицина. В условиях освещения, при концентрации фуллерен-глицина 100 мкг/мл, гибель опухолевых клеток остеогенной саркомы мыши составила 33,56%.</p>	<p>Jiang et al., 2015</p>

<p>Маннозилированный фуллерен («сахарный шар»)</p> 	<p>Проявляет противовирусную активность на инфекционной модели против псевдовируса Эбола. Ингибитор различных гликозидаз.</p>	<p>Nierengarten I., Nierengarten J.F., 2014; Luczkowiak et al., 2013</p>
<p>Водорастворимый бис-аддукт фуллерена</p> 	<p>Производное фуллерена предотвращает гибель клеток при гипоксии. SH-SY5Y клетки нейробластомы человека использовали в качестве модели для гипоксического повреждения.</p>	<p>Giust et al., 2014</p>
<p>Фуллеренол $C_{60}(OH)_{22-24}$</p> 	<p>Лечение деструкции костной ткани с помощью усиления остеогенеза, уменьшения липогенеза и ингибирования воспаления. Противодействует эффекту DEX в линии клеток-предшественников костного мозга D1.</p>	<p>Liu et al., 2012</p>
<p>Фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$</p> 	<p>Блокирование апоптоза, вызванного окислительным стрессом</p>	<p>Ye et al., 2014</p>
<p>Фуллерен C_{60}</p> 	<p>Проявляет иммуномодулирующую активность в отношении анафилаксии. Внутривенное</p>	<p>Ryan, 2007</p>

	<p>введение фуллерена в дозе 50 нг/мышь приводит к снижению гистамина в сыворотке, снижению АФК в клетках.</p>	
<p>Фуллерен C₆₀</p> 	<p>Проявляет иммуномодулирующую активность на модели артрита на крысах. Интра-артикулярное введение фуллерена 10.0 μM/нед. x 8 недель снижало TNF-α и IL-1β.</p>	<p>Yudoh, 2009</p>
<p>Конъюгат полиэтиленимин фуллерена с доцетакселом C₆₀-PEI/DTX</p> 	<p>Производное полиэтиленимин-фуллерена с доцетакселом может быть использовано в качестве средства доставки лекарств для подавления роста опухолей. Обладает высокой противоопухолевой активностью на культуре клеток PC3 in vitro, а также на модели рака S180 in vivo на мышах без явных токсических эффектов. PC3 - клеточная линия рака предстательной железы человека</p>	<p>Shi et al., 2013</p>
<p>Аминоалкилфуллерены</p> 	<p>Проведен анализ молекулярного механизма цитотоксичности</p>	<p>Lucafò et al., 2013</p>

<p>Фуллерен</p> 	<p>Анализ иммунных эффектов Иммуносупрессивные и противовоспалительные свойства наноматериалов</p>	<p>Plinskaya, Dobrovolskai a, 2014; Jiao Q. et al., 2014</p>
<p>Фуллеренол</p> 	<p>Моделирование взаимодействия с белками</p>	<p>Radic et al., 2014</p>
<p>Фуллерен и фуллеренол</p> 	<p>Механизмы взаимодействия с биологической мембраной митохондрий</p>	<p>Santos et al., 2014</p>
<p>Водная дисперсия фуллерена</p> 	<p>Снижение токсичности лекарств с ароматическими ядрами</p>	<p>Skamrova et al., 2014</p>
<p>Водная дисперсия фуллерена</p> 	<p>Изучение взаимодействия с АТФ скелетных мышц и эффектов на их функцию</p>	<p>Andreichenk o et al., 2013</p>
<p>Фуллереновые липосомы</p> 	<p>Изучение антиоксидантной активности и применение в качестве контрастирующих агентов для МРТ</p>	<p>Zhou, 2013</p>

Фуллеренол, полиамино-фуллерен 	N-этил- Изучение эффектов на секрецию цитокинов в системе <i>in vitro</i>	Bunz et al., 2012
Водная дисперсия фуллерена 	Модуляция активности Ca(2+)/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II	Miao et al., 2014

1.5. Потенциальное применение фуллерена в терапии аллергических заболеваний

Аллергические заболевания с каждым годом привлекают все более пристальное внимание врачей разных специальностей [Федоскова и др., 2004]. В настоящее время около 30% населения планеты страдает аллергическими заболеваниями, в России – от 17,5% до 30% (данные Института Иммунологии, 2015 г.), что значительно выше данных официальной статистики в России, по которым распространенность аллергических заболеваний на порядок ниже действительных, объективных данных.

Существует достаточно доказательств того, что аллергические заболевания, такие как астма, ринит и атопический дерматит, опосредованы окислительным стрессом. Чрезмерное воздействие активных форм кислорода и азота является признаком окислительного стресса и приводит к повреждению белков, липидов и ДНК. Терапевтические вмешательства, которые снижают воздействие активных форм кислорода, могут быть полезными в качестве терапии при аллергических заболеваниях. Антиоксидантная защита может осуществляться, во-первых, за счет непосредственного удаления активных форм кислорода, а во-вторых, за счет нейтрализации активного кислорода/азота путем взаимодействия с их неспаренными электронами [Ji, Li, 2016].

Фуллерен является привлекательным агентом в качестве основы для конструирования противоаллергических средств и перспективным для применения в клинической практике за счет своего значительного антиоксидантного действия.

Атопический дерматит – одно из самых распространенных и тяжелых аллергических заболеваний и самое частое аллергическое поражение кожи (рисунок 1.11). Распространенность атопического дерматита среди детей в развитых странах составляет 12–37 %, среди взрослого населения 0,2–2 %. В России этот показатель составляет около 5,9 % [Хаитов, Ильина, 2009].

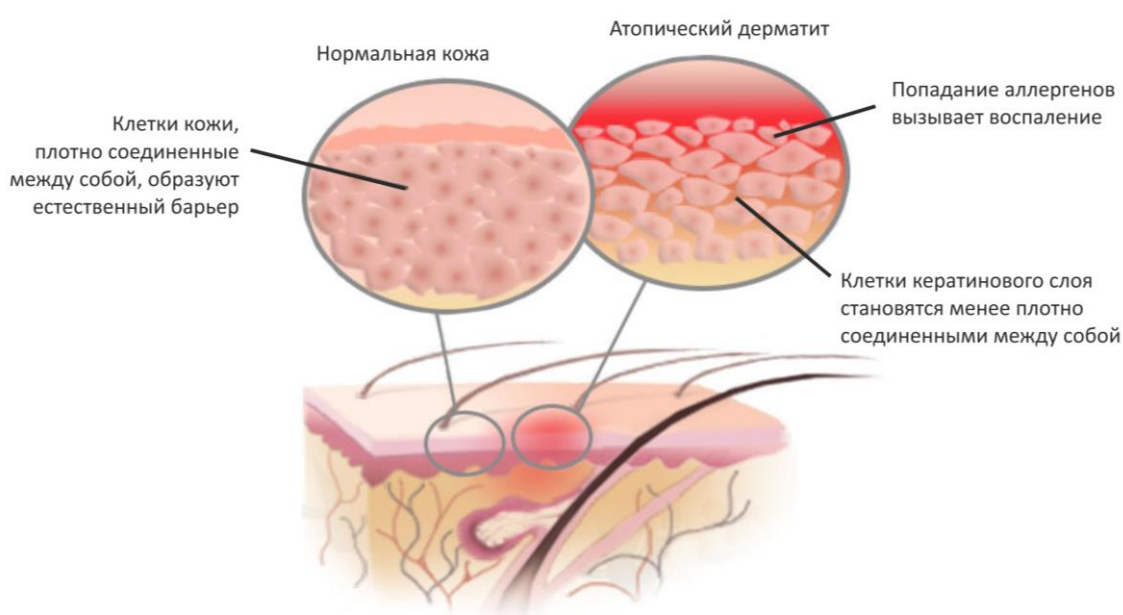


Рисунок 1.11. – Воспалительный процесс при атопическом дерматите.

Дефект эпидермального барьера и воспаление кожи являются двумя отличительными чертами атопического дерматита.

Воспаление в коже обусловлено Т-клеточным иммунным ответом, в результате которого высвобождаются провоспалительные цитокины, которые приводят к повышению продукции IgE-антител и системному воспалительному ответу, ведущему к зудящему воспалению кожи [Krakowsky et al., 2009; Watson et al., 2011].

Нарушения кожного барьера ассоциируют с мутациями гена филаггрина [Barnes, 2010]. Этот ген кодирует синтез важнейшего структурного протеина, необходимого для формирования кожного барьера, нарушение которого ведет к

усилению проникновения в кожу аллергенов, в результате чего развивается иммунная реакция, характерная для атопического дерматита.

В терапии атопического дерматита в настоящее время используют различные терапевтические воздействия, направленные на контроль основных симптомов заболевания. Для восстановления кожи используют эмоллиенты, увлажняющие и барьерные средства, которые увлажняют сухую кожу и восстанавливают дефектный кожный барьер. Для борьбы с иммунной дисфункцией необходимо исключение триггеров, что помогает предупредить выявленные аллергические реакции и воспалительный ответ; и применение топических кортикостероидов (широкий спектр противовоспалительной активности), топических ингибиторов кальциневрина (мишеневидная противовоспалительная активность), а также оральных противовоспалительных средств - азатиоприн, циклоспорин, микофенолат и др. (системная противовоспалительная активность). Инфекции кожи подавляют с помощью топических или оральных антиинфекционных средств, для лечения кожной бактериальной, грибковой или вирусной инфекции. Также применяют антигистаминные препараты, оказывающие седативный эффект, опосредованно уменьшают кожный зуд [Жерносек, 2013].

Лечение атопического дерматита является достаточно сложной проблемой и требует поиска новых подходов к терапии заболевания.

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) лежит в основе развития ряда заболеваний, таких как туберкулез, дифтерия, герпес, корь, грибковые инфекции, а также играет определенную роль в реакциях трансплантационного иммунитета, противоопухолевого иммунитета, аутоиммунных заболеваний и контактного дерматита [Чеснокова и др., 2014].

В механизмах индукции ГЗТ важная роль отводится антигенпрезентирующим макрофагам, дендритным и другим клеткам. Главным цитокином в реакциях ГЗТ является ИФН- γ , продуцируемый Th1-клетками, который вызывает активацию макрофагов и вовлечение их в иммунный ответ, также особый вклад в патогенез дают клетки с фенотипом Th17 (рисунок 1.12).

Невозможность элиминации антигена приводит к скоплению в ткани макрофагов, в результате чего образуются характерные гранулемы [Гущин, 1998].

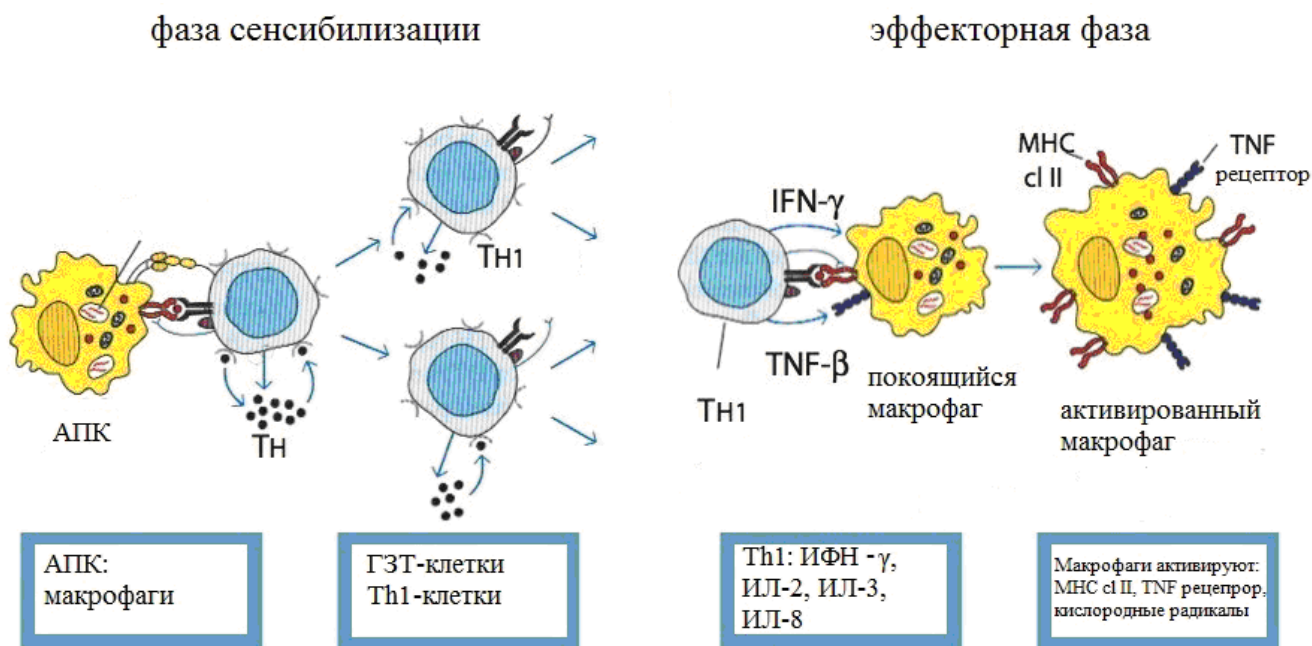


Рисунок 1.12. – Патогенез реакции ГЗТ [Goldsby et al., 2003].

Реакции ГЗТ часто используются для изучения клеточного иммунитета при доклинических исследованиях новых фармакологических соединений. Оценку влияния препарата осуществляют как на стадии сенсibilизации, так и разрешения, что позволяет сделать вывод о действии вещества на разные стадии клеточного иммунного ответа. Интенсивность секреции лимфоцитами факторов клеточного иммунитета соответствует степени выраженности воспалительной реакции в месте введения разрешающей дозы антигена и характеризует активность клеток, ответственных за проявление реакции ГЗТ. Исследуемый препарат может влиять на показатели реакции в ту или иную сторону в зависимости от своих свойств [Семенова и др., 2015].

Для подавления воспалительной реакции ГЗТ используют иммунодепрессанты, например циклоспорин, кортикостероиды, цитостатики, а также стабилизаторы клеточных мембран, препятствующие секреции литических факторов, антиоксиданты. Циклоспорин ингибирует продукцию цитокинов, индуцирующих активацию и дифференцировку Т-клеток. Кортикостероиды индуцируют лизис некоторых подтипов Т-клеток и блокируют транскрипцию

генов ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α в макрофагах. Недавно установлено, что водная наносuspension свободного кристаллического фуллерена способна частично подавлять ГЗТ-опосредованное воспаление на экспериментальной модели на мышцах, при этом выявлено снижение секреции ИЛ-6 и ИЛ-17, и относительный рост популяции T_{reg}-клеток [Yamashita et al., 2009].

1.6. Заключение

Анализ данных научной литературы последнего десятилетия показал существенное расширение сферы практического применения фуллеренов. Химическая стабильность структуры и низкая токсичность фуллеренов и их производных позволили перейти к новым технологиям в сфере медицинской химии, фармакологии и косметологии, создать на базе углеродных наноматериалов высокоэффективные сорбенты, стимулирующие антиоксиданты, а также противовирусные и противораковые препараты.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Лабораторные животные

Собственные экспериментальные данные были получены с использованием самок мышей линии BALB/c весом 18-20 г., в возрасте 8-12 недель, полученных из питомника «Столбовая» ГУНЦБМТ РАМН. В опытах использовали мышей, прошедших карантинный режим вивария. Вся работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации». Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н г. Москва «Об утверждении правил лабораторной практики».

2.2. Фуллерен, его производные и другие реагенты

Кристаллический фуллерен C₆₀ имел чистоту 99,9% (Sigma). Структуры, использованных в работе производных фуллерена, приведены на рисунке 3.4.

Другие использованные реагенты: яичный альбумин (Serva), диметилсульфоксид (ДМСО, Merck), N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (БТСА, Fluka) трифторуксусный ангидрид (ТФА, Merck), N-метилморфолин (FisherBiotech), диэтиловый эфир (Медхимпром), толуол (Panreac), дихлорметан (Panreac), этилацетат (Panreac), N-метил-пирролидон (Sigma), L-лизин (Fluka), L-аргинин (Fluka), 1-Вос-пиперазин (Aldrich), L-аланин (L-Ala, Sigma), биоклюзив (Johnson and Johnson Medical Limited).

В качестве антигена для ГЗТ использовали гемоцианин морского моллюска *Megathura crenulata* (KLH, Sigma), в виде раствора, 6 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с pH 7.2, содержащем также 1 мМ CaCl₂ и 0.5 мМ MgCl₂, а также полный адъювант Фрейнда (ПАФ, Calbiochem). Как позитивный контроль для ингибирования реакции ГЗТ использовали циклоспорин А (CsA, Сандиммун-Неорал, Novartis).

2.3. Оборудование

Фотометрический сканер MPR1 (SCO Diagnostic); магнитные мешалки IKA, Heidolph; весы электронные Pioneer (Ohaus); вакуумный сублиматор VaCo 5-II (Zirbus); роторный испаритель Rotavapor RE-111 (Buchi); pH-метр SevenEasy (Mettler Toledo). УФ-спектрофотометрию проводили на электронном спектрофотометре Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies); ИК-Фурье спектроскопию на приборе Bruker; размеры частиц определяли на приборе Photocor Compact-Z («Фотокор», Россия), масс-спектрометры снимали на MALDI Bruker Microflex LT. Деионизованную воду получали с помощью системы очистки воды Millipore.

2.4. Получение водорастворимого фуллерена

Получение водорастворимого фуллерена C₆₀ осуществлялось по следующей схеме [Андреев С. и др., 2014]. 20 мг кристаллического C₆₀ растворяли в 25 мл N-метил-пирролидона, используя магнитную мешалку, и полученный коричнево-фиолетовый раствор смешивали с раствором стабилизирующего агента (40 мг L-Ala в 100 мл дистиллированной воды). Полученный темно-красный прозрачный раствор перемешивали 1 ч и затем подвергали исчерпывающему диализу против деионизованной воды. Для диализа применяли трубки SpectraPor, 6–8 кДа (Spectrum Laboratories, Inc.) Диализат пропускали через 0.45 мкм фильтр и в результате получали прозрачный коричневатого-желтый раствор. Раствор хранили при температуре не выше 10 °С, в защищенном от света месте.

2.5. Синтез фуллерен-L-лизин (C₆₀-Lys)

К суспензии 1,82 мг (10 ммоль) Lys·HCl в 20 мл ДМСО добавляли 2,2 мл (20 ммоль) N-метилморфолина, перемешивали 20 минут и затем добавляли 8,8 мл (36 ммоль) N,O-бис(триметилсилил)ацетамида (БТСА), полученную смесь перемешивали в течение порядка 2-х часов до получения прозрачного раствора, затем в него вносили 50 мг (0.07 ммоль) фуллерена C₆₀ и перемешивали полученную суспензию 18 часов при комнатной температуре. Фуллерен при этом переходил в раствор, по истечении первого часа цвет суспензии менялся с

желтоватого на коричневый. На следующем этапе к смеси добавляли 50 мл дистиллированной воды, смесь тщательно перемешивали. Чтобы удалить верхний слой добавляли 30 мл диэтилового эфира и 30 мл этилацетата, перемешивали и отделяют органический слой, содержащий побочный гексаметилдисилоксан (ГМДС) с помощью делительной воронки. Полученный водный раствор диализовали против дистиллированной воды, диализат фильтровали через фильтр 0,45 μm и раствор лиофилизировали. Выход коричневого порошка составил 53 мг.

2.6. Получение фуллерен-L-аргинина (C₆₀-Arg)

К суспензии 1,74 г (10 ммоль) L-аргинина к 20 мл МП добавляли 8,8 мл (36 ммоль) БТСА, полученную смесь перемешивали до получения желтоватого раствора (примерно 3 часа). Затем в реакционную смесь вносили 144 мг (0,2 ммоль) фуллерена C₆₀ и перемешивали 18 часов при комнатной температуре. На следующем этапе к смеси добавляли 50 мл дистиллированной воды, после чего подвергали диализу против воды. Водную фазу подкисляли до pH=3, и далее раствор упаривали под вакуумом на роторном испарителе при температуре 40°C для удаления гексаметилдисилоксана. Затем раствор пропускали через фильтр размером 0,45 μm и лиофилизировали. Выход темно-коричневого порошка составил 370 мг.

2.7. Получение фуллерен-пиперазина (C₆₀-Pip)

50 мг фуллерена (0,0694 ммоль) растворяли в 4 мл толуола, затем добавляли 1 мл ДМСО и 129 мг Вос-пиперазина (0,694 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 1,5 часов на магнитной мешалке, при этом раствор фиолетового цвета становился коричневым. Через сутки раствор обрабатывали 2 мл смеси CH₂Cl₂ и ТФА в соотношении 1:1 в течение 15 минут. Затем раствор упаривали под вакуумом. Для удаления избытка ТФА полученный осадок несколько раз обрабатывали серным эфиром, и затем высушивали. Выход препарата составил 162 мг. Водный раствор полученного препарата имеет оранжевый оттенок.

2.8. Электронная спектроскопия

Электронный спектр поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies) в диапазоне от 200 до 800 нм, используя кварцевую кювету толщиной 1 см.

2.9. Инфракрасная Фурье-спектроскопия

ИК-спектры регистрировали на приборе Bruker Alpha-IR (условия нарушенного полного внутреннего отражения) с использованием лиофилизированных или высушенных в вакууме образцов.

2.10. Масс-спектроскопия

Масс-спектры регистрировали на приборе Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics), образцы брали в виде водных растворов.

2.11. ζ -потенциал и размер наночастиц

Измерение ζ -потенциала и размеров наночастиц методом динамического светорассеяния проводили на приборе Photocor Compact-Z («Фотокор», Россия).

2.12. Индукция реакции ГЗТ

Реакцию ГЗТ у мышей индуцировали путем подкожной инъекции KLH между лопаток: животным вводили 100 мкг белка в 200 мкл (100 мкл стерильного ФСБ и 100 мкл ПАФ) и 200 мкл стерильного ФСБ – группа отрицательного контроля.

Через 2 недели проводилась повторная инъекция: в подушечку стопы правой задней лапки вводили 20 мкг KLH в 50 мкл раствора стерильного ФСБ (разрешающая доза), а в подушечку левой – 50 мкл раствора стерильного ФСБ (контроль).

Развитие реакции ГЗТ оценивали по интенсивности воспалительной реакции через 24, 48 и 72 часа после введения разрешающей дозы антигена, измеряя толщину контрольной и сенсibilизированной лапы с помощью электронного микрометра МКЦ (ООО НПП ЧИЗ, Россия). Степень воспаления оценивали по формулам:

[Отек подушечки стопы, Δ (мм)] = [толщина подушечки правой стопы, получавшей инъекцию КЛН (мм)] – [толщина подушечки левой стопы, получавшей инъекцию ФСБ (мм)].

[Индекс реакции, %] = [Отек подушечки стопы Δ (мм)] / [Среднее значение утолщения подушечки левой стопы контрольной группы (ФСБ) (мм)] $\times 100\%$ [Yamashitaa et al., 2009].

Измерения проводились в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

Группа позитивного контроля получала две последовательные ежедневные инъекции 100 мг/кг циклоспорина А (CsA) в изотоническом растворе хлорида натрия, внутривенно в объеме 400 мкл, после первой сенсibilизации КЛН.

Водорастворимый фуллерен C_{60} и его производные – C_{60} -Arg, C_{60} -Lys и C_{60} -Pip были приготовлены на основе стерильного ФСБ (рН=7,4). Конечная концентрация препаратов составила 10 мкг/мл. Затем растворы фуллерена и его производных были пропущены через нейлоновый фильтр (Millipore) размером 0,22 μ m. Животные получали препараты в одинаковой дозе внутривенно, в объеме 200 мкл, за день до первой иммунизации КЛН.

Схема эксперимента показана на рисунке 2.1. Было сформировано 8 групп мышей (таблица 2.1).

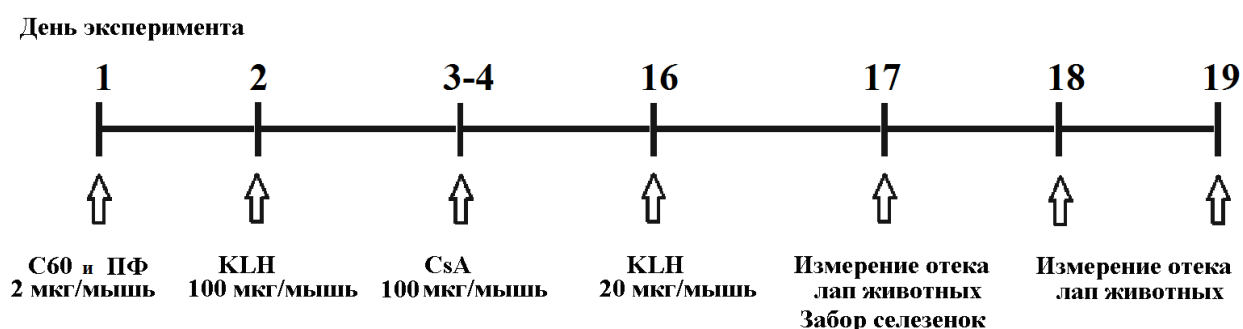


Рисунок 2.1. - Схема эксперимента оценки активности фуллерена и его производных на реакцию ГЗТ.

Таблица 2.1. Группы, сформированные в ходе эксперимента.

Группа	Доза препарата, мкг/мышь	Сенсибилизация, 100 мкг/мышь	Разрешающая инъекция, 20 мкг/мышь
ГЗТ	-	KLH	KLH
C ₆₀	2	KLH	KLH
C ₆₀ -Arg	2	KLH	KLH
C ₆₀ -Lys	2	KLH	KLH
C ₆₀ -Pip	2	KLH	KLH
CsA	100	KLH	KLH
Отрицательный контроль	-	PBS	KLH
Интактные	-	-	-

2.13. Оценка гемолитической активности фуллерена

Свежевзятую пробу крови от здорового донора (с гепарином) разбавляли изотоническим буфером, эритроциты осаждали центрифугированием при 1500 об/мин, после чего отмывали три раза этим же раствором. Суспензию эритроцитов смешивали с дисперсией фуллерена C₆₀ в ФСБ в концентрациях: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 мкг/мл. После 30-минутной инкубации при 37 °С смесь центрифугировали 5 мин. (1500 об/мин) и измеряли оптическую плотность (ОП) супернатанта при 392/630 нм. Процент лизиса рассчитывали относительно ОП положительного контроля, где эритроциты инкубировали в дистиллированной воде в течение 30 мин.

$$\% \text{ лизиса} = (E - C) / (M - C) * 100,$$

где E – ОП тестируемого образца фуллерена C₆₀, C – ОП отрицательного контроля (ФСБ), M – ОП положительного контроля (вода).

2.14. Оценка острой токсичности фуллерена

Изучение токсических свойств фуллерена C_{60} при в/в введении осуществлялось по следующей схеме. Мыши были разделены на 5 групп по 6 в каждой. Первой, второй, третьей и четвертой группам вводили фуллерен C_{60} в дозах 2, 8, 40 и 200 мкг, соответственно, в объеме 200 мкл. Группа 5 являлась контрольной, где мыши получали ФСБ в том же объеме. Наблюдение за поведением животных и оценка их веса проводилась в течение 7 дней после введения фуллерена C_{60} .

В эксперименте по изучению токсичности при в/б введении C_{60} , мыши были разделены на 9 групп по 6 в каждой. Мышам вводили фуллерен C_{60} в дозах 40, 80, 160, 200, 320, 500, 1000 и 2700 мкг (1-8 группы, соответственно) в объеме 500 мкл. Раствор, содержащий 500 мкг и более фуллерена, представлял собой суспензию с видимыми частицами препарата. Животные девятой группы получали ФСБ. Наблюдение за поведением животных и оценка их веса проводилась в течение 7 дней после введения фуллерена C_{60} .

Для изучения токсического эффекта при и/г введении препарат был взят в дозе 1000 мкг в объеме 300 мкл, содержащей как растворимую форму C_{60} , так и нерастворимые частицы C_{60} . Контрольным животным вводили ФСБ в том же объеме. В течение 16 суток после введения фуллерена за животными проводили наблюдение и оценивали изменение массы тела.

2.15. Некропсия и гистологическое исследование

Через 7/16 суток от момента введения суспензии фуллерена проводили наркотизирование мышей в CO_2 -камере с последующим обескровливанием через вскрытие грудной полости и рассечение аорты. Процедура некропсии была проведена с каждым животным, при этом отмечали состояние внутренних полостей тела и органов, а также забирали кусочки органов и тканей на гистологическое исследование (желудочно-кишечный тракт, печень, поджелудочная железа, почки, матка, яичники).

Образцы органов фиксировали в 10% растворе забуференного формалина (pH 6,8-7,2). Обезвоживание, проводку образцов и пропитывание парафином производили в гистопроцессоре автоматического типа SLEE MAINZ (Германия), заливку в парафин проводили с использованием заливочной станции SLEE MAINZ (Германия). Микротомирование парафиновых блоков для получения срезов толщиной 4 мкм осуществляли с помощью автоматизированного ротационного микротома Finesse E+ (Финляндия), окрашенные по общепринятой методике гематоксилином и эозином гистологические срезы, заключали в монтирующую среду под покровные стекла для получения постоянных микропрепаратов. Микроскопический анализ гистологических препаратов кожи мышей разных групп проводили на микроскопе Leica DM2000 (Германия).

2.16. Моделирование экспериментального атопического дерматита

Сенсибилизацию мышей проводили модельным аллергеном овальбумином (ОА). На предварительно выбритый участок спины мышей накладывали стерильную марлю размером 1×1 см, пропитанную 0,1 % раствором ОА, закрепляя ее специальным материалом (Биоклюзив, Johnson and Johnson Medical Limited), который предохраняет от высыхания. Аллерген наносили на 7 дней, после чего повязки снимали.

Через две недели 7 дневную аппликацию 0,1 % ОА повторяли еще два раза с двух недельным интервалом - группа «АД». Учет результатов проводили в конце периода третьей аппликации. Отрицательным контролем являлись мыши, эпидермально получавшие ФСБ - группа «интактные».

Эпидермальные (накожные) аппликации C_{60} в дозе 1 мг/кг (« C_{60} -ЭД») и подкожные введения фуллерена C_{60} в дозе 0,1 мг/кг (« C_{60} -ПК») осуществлялись между аппликациями с ОА по схеме (рисунок 2.2).

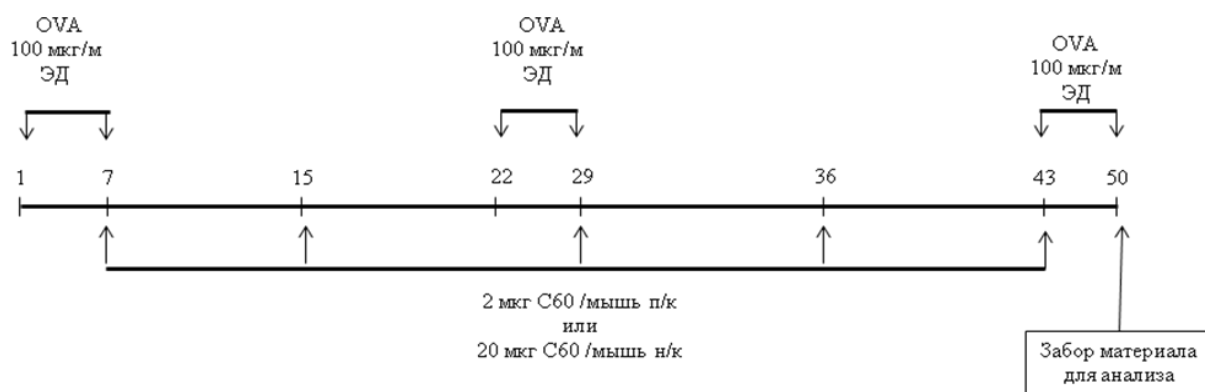


Рисунок 2.2. - Схема эпидермальной сенсibilизации овальбумином и введения фуллерена C_{60} .

По окончании эксперимента проводили забор материала для ИФА, ПЦР и гистологического анализа.

2.17. Забор крови и получение сывороток

Забор крови для дальнейших иммуноферментных и других исследований проводили из ретроорбитально синуса глаза животных при помощи капилляра. После 30 мин. инкубации при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, сыворотки получали путем осаждения форменных элементов крови при 1500 об/мин в течение 20 мин. Сыворотки для отрицательного контроля получали от интактных животных.

2.18. Определение уровней специфических антител

Определение уровней специфических IgE-, IgG1- и IgG2a-антител в индивидуальных сыворотках крови мышей проводили иммуноферментным методом согласно инструкции производителя («BD», США). Для сорбции использовали высокосорбционные микропланшеты Costar, ОА сорбировали в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ. Для детекции связавшихся меченых антител использовали проявляющий реагент ТМБ (Sigma). Реакцию останавливали 2N H_2SO_4 , и оптическую плотность в лунках измеряли при 450 нм, используя планшетный спектрофотометр. Уровни анти-ОА-IgE-антител в сыворотках крови мышей определяли по калибровочной кривой (Serotec, Великобритания).

2.19. Выделение и стимуляция клеток селезенки

Селезенку извлекали в асептических условиях и помещали в охлажденную «полную» среду RPMI 1640 (10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 25 mM HEPES, 24 mM Na₂CO₃, 0,3 мг/мл глутамина, 0,08 мг/мл гентамицина, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола). Изолированную селезенку дезинтегрировали и полученную взвесь клеток фильтровали через стерильное ситечко (диаметр пор 40 мкм). Клетки осаждали центрифугированием (10 мин., 150 g, +4°C), а затем дважды промывали свежей средой. Спленциты высевали в 12-луночный планшет в концентрации 5×10^6 клеток/лунку, в 2-х параллелях и стимулировали KLN (2 мкг/мл) или OA (4 мкг/мл) при 37° C, во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Сбор супернатантов для последующего анализа осуществляли через 72 часа после стимуляции. После центрифугирования супернатанты аликвотировали и хранили при -70 °C.

2.20. Анализ уровня цитокинов

Количественное определение цитокинов в супернатантах стимулированных спленцитов проводили методом ИФА с использованием наборов, для анализа ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-12, ИЛ-17 (BD Biosciences) и ИФН-γ, ФНО-α (R&D Systems) согласно методическим рекомендациям производителей. Регистрацию результатов проводили на фотометрическом сканере MPR1 (SCO Diagnostic) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочной кривой, полученной при титровании входящих в состав наборов стандартных образцов цитокинов мыши.

2.21. ПЦР в реальном времени

Для определения уровня экспрессии мРНК был выбран метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Выделение общей РНК проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Для постановки реакции обратной транскрипции использовали комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «Реверта-L» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Комплект

реагентов для получения кДНК на матрице РНК содержала RT-G-mix-1, RT-mix – 0,125 мл, ревертазу (MMLv) и ДНК-буфер. Постановку реакции проводили согласно инструкции производителя. Полученная кДНК в последствие использовалась для постановки ПЦР в реальном времени. ПЦР проводили с использованием реакционной смеси, праймеров и флуоресцирующих зондов (НПК “Синтол”, Россия). Реакции проводили в объёме 20 мкл в стандартных 96-луночных стрипах в амплификаторе IQ5 Bio-Rad (США) и PCRMix Комплект (Sintol, Россия). Реакционная смесь включала в себя ПЦР-буфер, дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ), MgCl₂, деионизованную воду и Taq-ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, праймеры, зонд и матрицу (кДНК). Температурный профиль реакции: 95°C – 2 минуты, 95°C – 20 секунд, 58°C – 40 секунд (45 циклов). В таблице 2.2 представлены последовательности праймеров и зондов, которые необходимы для проведения исследовательских испытаний. Учет и анализ результатов проводили при помощи программного обеспечения к прибору IQ5 Bio-Rad согласно инструкциям производителя. Результаты представлены в виде условных единиц.

Таблица 2.2. Последовательности праймеров и зонда.

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-3')	Ген-мишень
Обратный праймер (mFLG-r)	ATTCATATCCTCCCTGACCACT	FLG
Прямой праймер (mFLG-f)	GCTCAGGAGGAAGAGGACAG	FLG
FLG-FAM (mFLG-z)	FAM- CAAGTCCATTCTGGAGTCCAGGTCG- BHQ1	FLG
Обратный праймер (mFoxp3-r)	TTCTGAAGTAGGCGAACATG	Foxp3
Прямой праймер (mFoxp3-f)	TCACSTATGCCACCCTTATC	Foxp3
Foxp3-FAM (mFoxp3-z)	FAM- CGGAGAGGCAGAGGACACTCAATG- BHQ1	Foxp3

2.22. Статистический анализ

Для статистической обработки результатов применяли программу Statistica 8.0. Отклонения, представленные на графиках, соответствуют значениям стандартной ошибки. Статистическую значимость различий устанавливали при помощи t-критерия Стьюдента. Достоверными считались различия при $p \leq 0,05$.

3. Результаты исследований

3.1. Получение водорастворимого фуллера и его производных и анализ их физико-химических свойств

В процессе выполнения данной работы был разработан новый способ синтеза водорастворимых соединений фуллера C_{60} общей формулой $H_nC_{60}(X)_n$, где H – атом водорода, а X – любое гидрофильное соединение, содержащее первичную аминогруппу (рисунок 3.1). В качестве соединения X может использоваться аминокислота, пептиды, аминсахара, алифатические, ароматические и гетероциклические амины, гидроксилламины и даже белки.

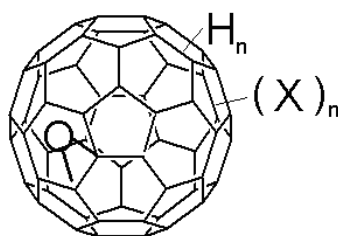


Рисунок 3.1. - Общая формула ПФ.

Принцип способа заключался в том, что соединение X предварительно переводили в триметилсилильное (ТМС) производное, используя силилирующий агент, (N,O-бис(триметилсилил)-ацетамид в среде полярного апротонного растворителя. В результате образуется раствор ТМС- X , который затем вводят в реакцию с дисперсией фуллера в том же растворителе (рисунок 3.2).

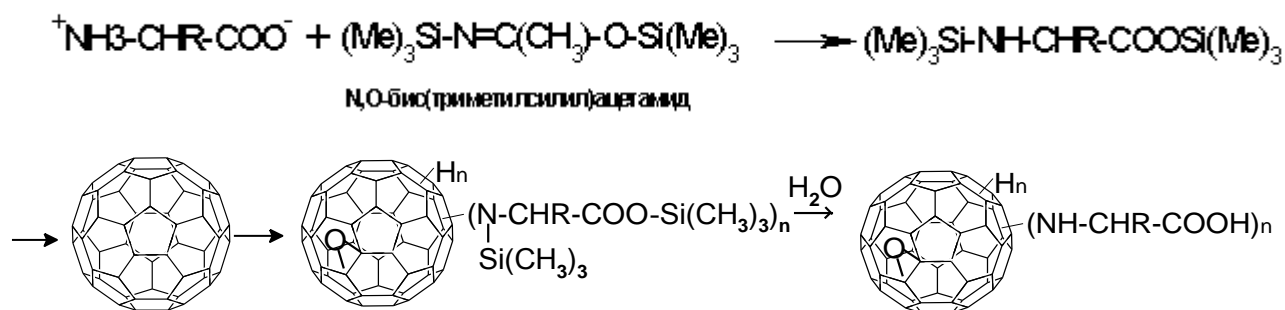


Рисунок 3.2. - Схема синтеза аддуктов фуллера с аминокислотой.

Реакция протекает в течение нескольких часов и идет в гомогенной среде. Используемый апротонный растворитель должен иметь высокую диэлектрическую проницаемость, например, N-метил-пирролидон (МП) или диметилсульфоксид (ДМСО). Раствор после диализа высушивали лиофильно и получали конечный продукт в виде сухого светло-коричневого порошка (рисунок 3.3).

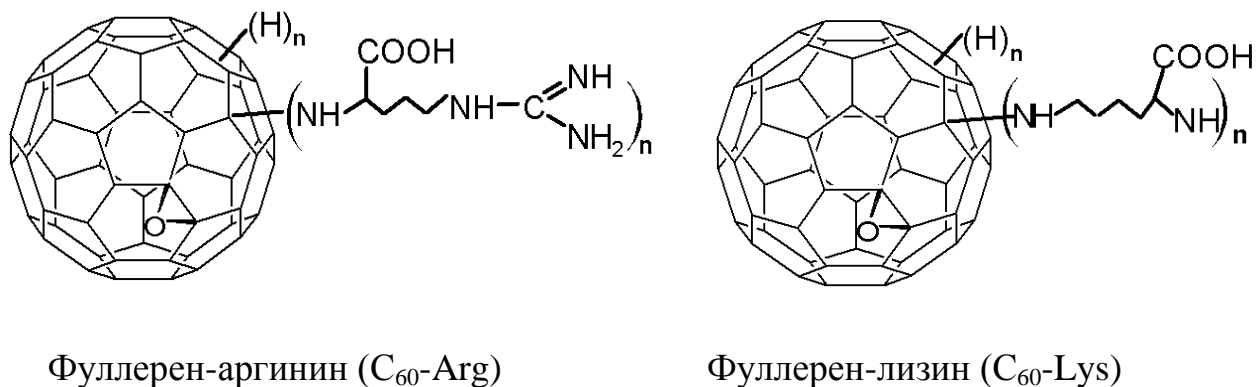


Рисунок 3.3. – Схематическая структура C₆₀-аминокислотных аддуктов.

Полученные соединения умеренно растворимы при нейтральном pH и хорошо при низком pH. В сухом виде после лиофильной сушки представляют собой темно-коричневые порошки, их растворимость в воде очень высокая, более 100 мг/мл. Масс-спектр (MALDI) C₆₀-Arg показывал наличие моно- и бис-присоединения аминокислоты в небольшой пропорции относительно пика иона C₆₀ (720 Да). Однако известно, что многие фуллереновые аддукты являются термически неустойчивыми, поэтому при анализе даже с применением мягкого метода ионизации в масс-спектре часто присутствует только пик с m/z 720. Число присоединенных аддендов редко удается установить, по-видимому, из-за распада молекул под воздействием лазерного удара. Например, на рисунке 3.4 наблюдаются ионы с m/z 895 – к ядру фуллерена присоединилась 1 молекула аргинина, пик 1060 m/z – 2 молекулы аргинина.

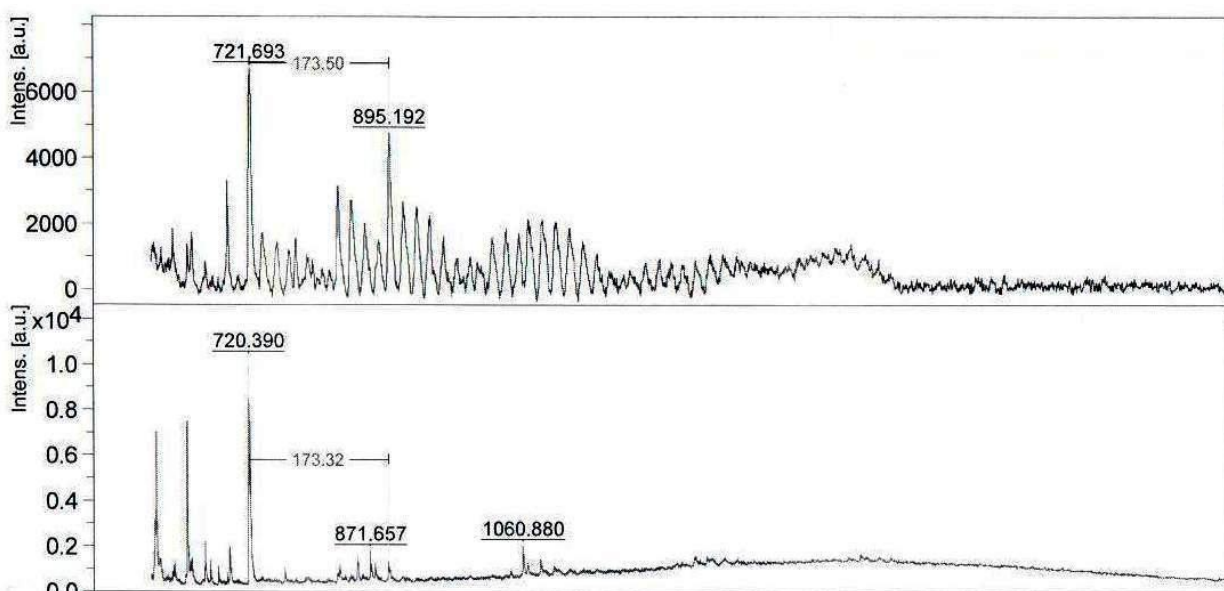


Рисунок 3.4. - Масс-спектр C_{60} -Arg.

Получение другого катионного производного, фуллерен-пиперазина, проводили по следующей схеме (рисунок 3.5).

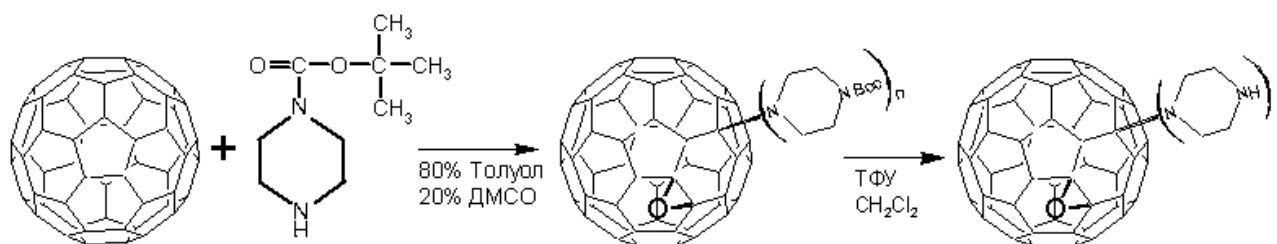


Рисунок 3.5. - Схема присоединения пиперазина к фуллерену.

С целью снижения побочных продуктов одна из вторичных аминогрупп присоединяемого пиперазина была блокирована трет-бутоксикарбонильной (Вос) группой. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1,5-2 ч в смеси толуола и ДМСО. После окончания реакции Вос-защиту удаляли трифторуксусной кислотой (ТФК) в метиленхлориде, и после удаления ТФК продукт реакции очищали переосаждением в системе метанол-серный эфир. Конечный продукт C_{60} -Pip очень хорошо растворим в воде, и в сухом виде (лиофилизированный) он имеет оранжевую окраску (рисунок 3.6).

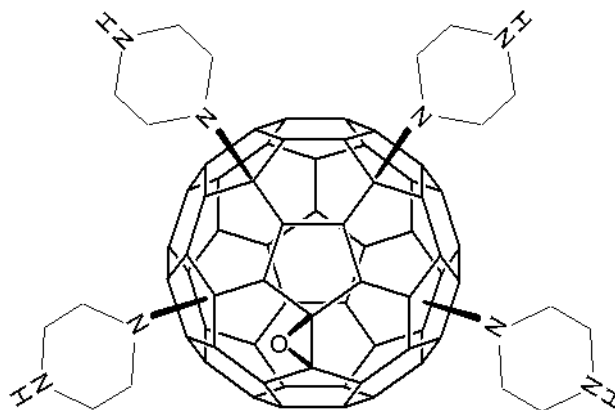


Рисунок 3.6. – Фуллерен-тетрапиперазин (C₆₀-Pip).

Элементный анализ дает более надежные данные при расчете числа присоединения адденда по азоту (N) (таблица 3.1) .

Таблица 3.1. Данные элементного анализа производных фуллерена.

Элементы	C ₆₀ -Arg	C ₆₀ -Lys	C ₆₀ -Pip
N%	12.96	4.8	10.83
C%	51.69	44.6	46.84
H%	3.71	3.3	3.11
Число аддендов	2.8	1.7	4.2

Профили электронных спектров аминокислотных производных представлены на рисунке 3.7, они не имеют выраженных максимумов, что характерно для многих продуктов присоединения к C₆₀.

Электронный спектр C₆₀-Pip, также как и у аминокислотных производных фуллерена, практически не имеет характерных максимумов.

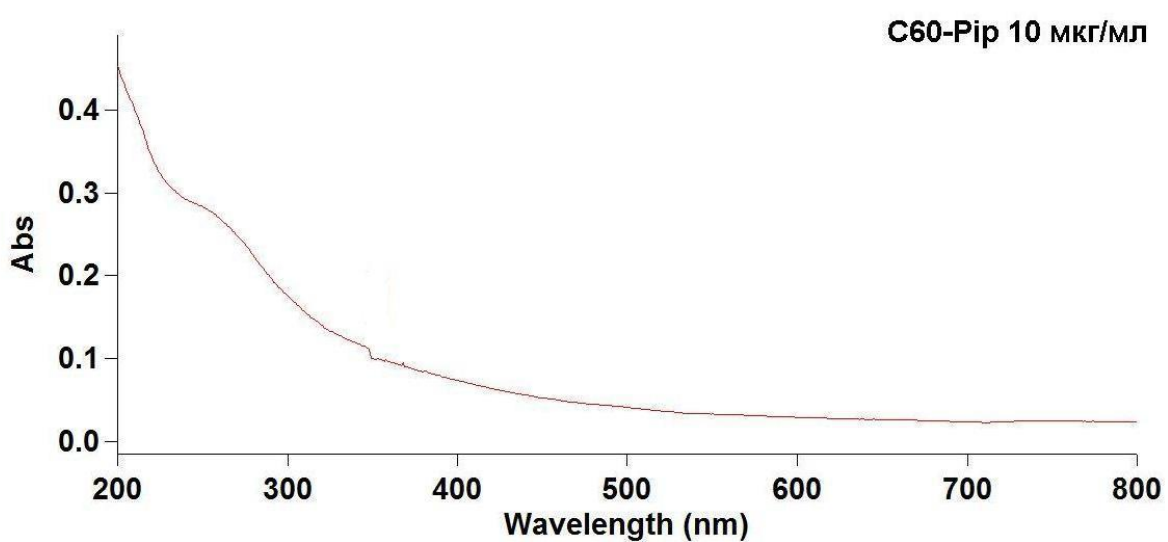
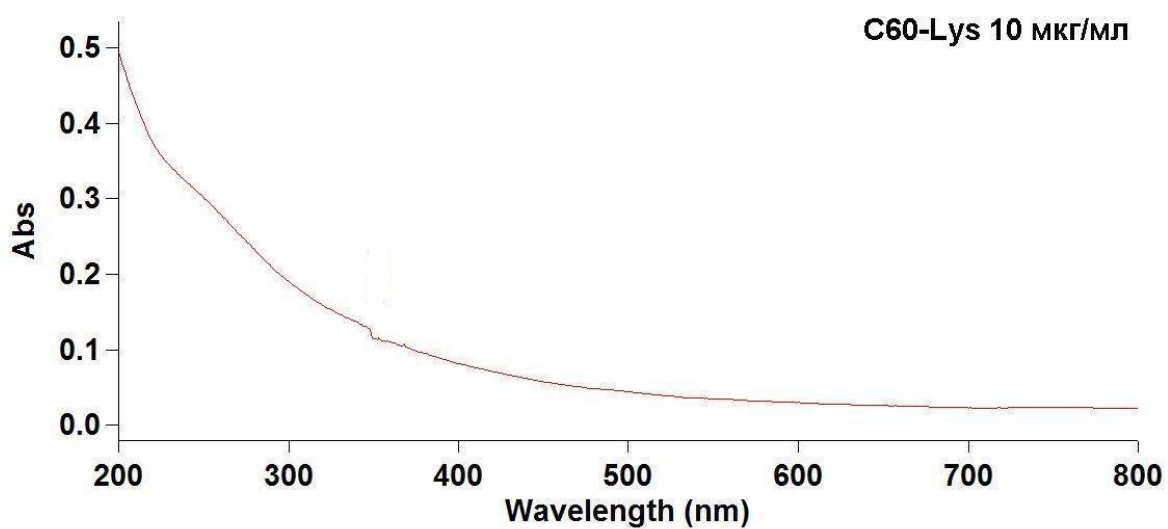
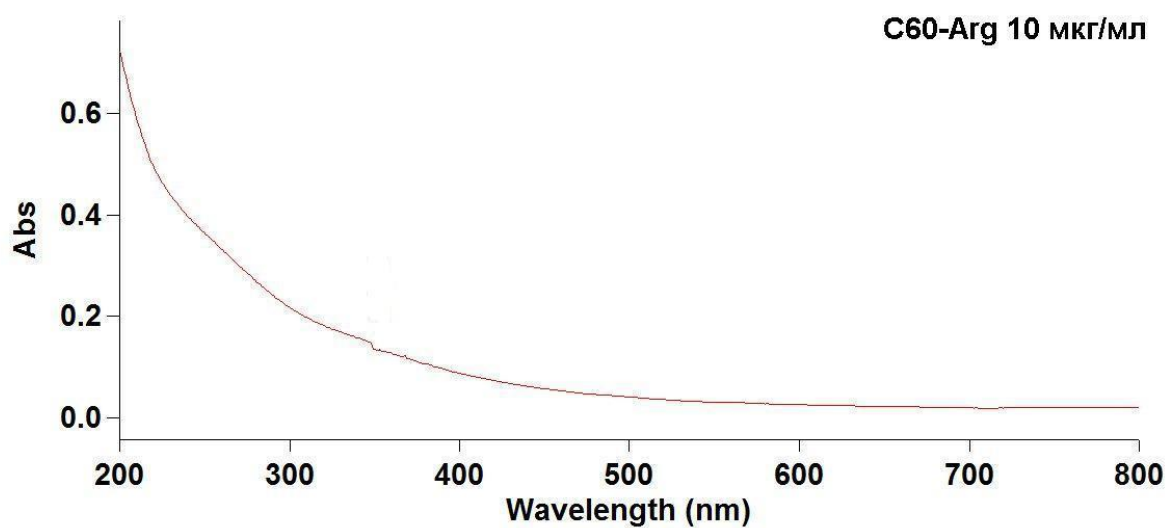


Рисунок 3.7. – Спектры поглощения аминокислотных производных фуллерена.

Гидродинамический размер частиц C_{60} -Arg, C_{60} -Lys и C_{60} -Pip в водном растворе представлен на рисунке 3.8.

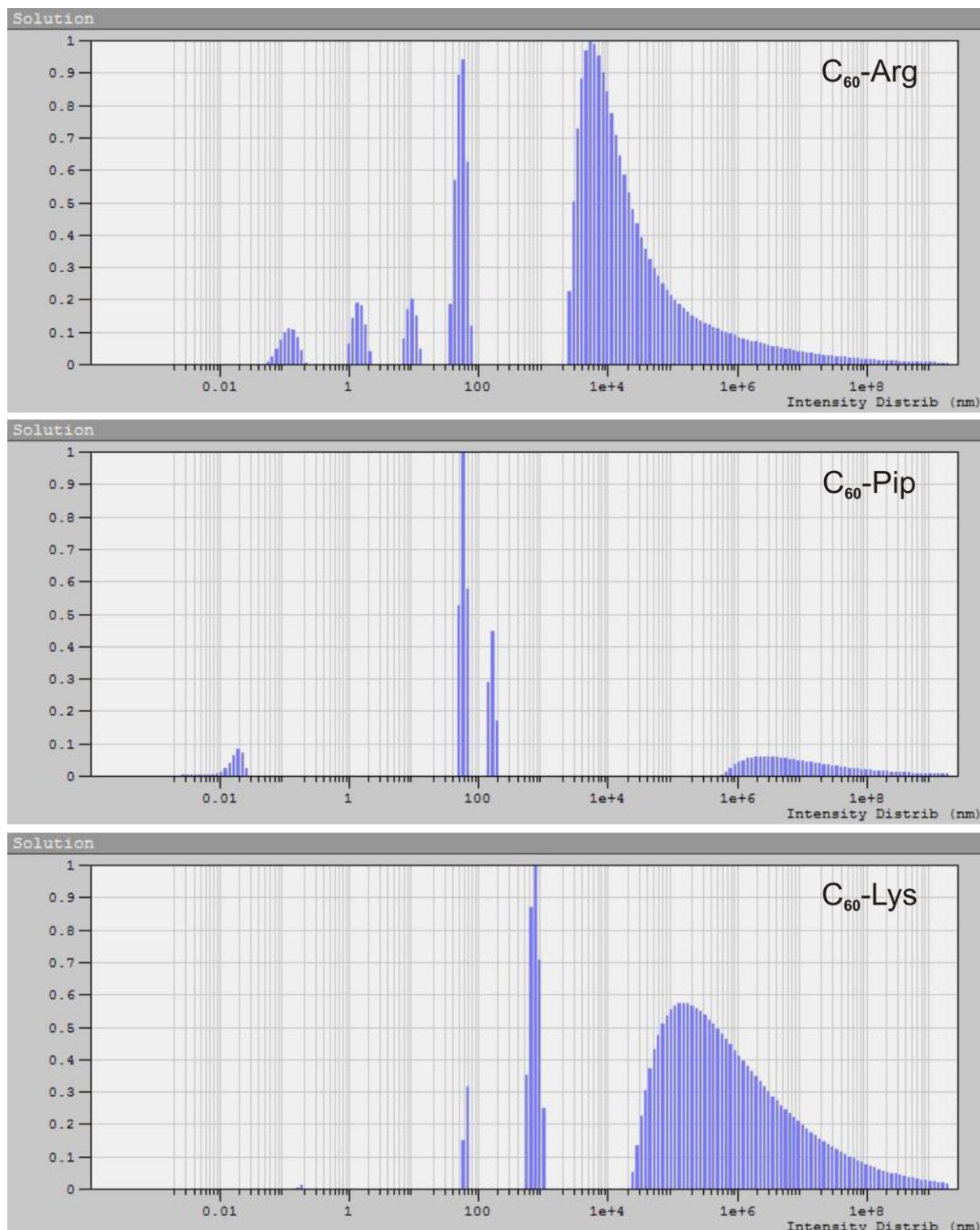


Рисунок 3.8. - Объемное распределение размеров частиц производных фуллерена.

Измерения гидродинамического размера частиц в разбавленных водных растворах C₆₀-Arg и C₆₀-Lys методом динамического светорассеяния показали, что их размер лежит в районе 10-60 нм. Наночастицы, собранные из C₆₀-Arg, имеют несколько меньший размер по сравнению с C₆₀-Lys, что возможно связано с большим их зарядом. Поверхностный заряд (ζ -потенциал) у обоих производных имеет положительный знак, что свидетельствует о катионных свойствах частиц, обусловленных присутствием связанных с фуллереном катионных аминокислот. Свойства C₆₀-Pip во многом сходны с аминокислотными производными, однако его ζ -потенциал намного выше, достигая 60 mV, что объясняет его высокую водную растворимость. Гидродинамический размер частиц C₆₀-Pip в водном растворе находится в диапазоне 50–150 нм (таблица 3.2).

Таблица 3.2. Размеры частиц и ζ -потенциал образцов производных фуллерена в водных растворах с концентрацией 10 мкг/мл.

Производные фуллерена	C ₆₀ -Arg	C ₆₀ -Lys	C ₆₀ -Pip
ξ , mV	22.0 ± 4.31	16 ± 4.00	60.6 ± 8.23
Размер частиц, нм	10 - 53	65 - 740	56 - 160

Поскольку фуллерен обладает сильными антиоксидантными свойствами, обусловленными его уникальной электронной структурой, отсутствием свободных валентностей, введение аддендов в его молекулу может нарушать эту структуру и сильно снижать его активность. Поэтому много работ и усилий было направлено на исследование немодифицированного фуллерена, как перспективного фармпрепарата. Проблема заключалась лишь в переводе его в водную среду. Еще в 90-х годах 20-го века было обнаружено, что фуллерен C₆₀ можно перевести воду в виде коллоидного раствора с помощью ультразвука или очень длительным перемешиванием. Были созданы различные модификации этой процедуры, однако, до сих пор такая технология не воплотилась в коммерческую реализацию, и такие растворы и сейчас недоступны. Один из главных недостатков

такой технологии – плохая воспроизводимость, низкий выход по фуллерену и в результате очень высокая стоимость конечного раствора C_{60} .

Для получения водорастворимого немодифицированного фуллерена использовался совершенно другой подход, основанный на использовании биосовместимых компонентов, без применения токсичных растворителей, ультразвуковой обработки и нагревания. Он основан на исчерпывающем диализе раствора фуллерена в смеси N-метилпирролидона с водой [Андреев и др. 2014], на рисунке 3.9 приведена общая схема его получения.

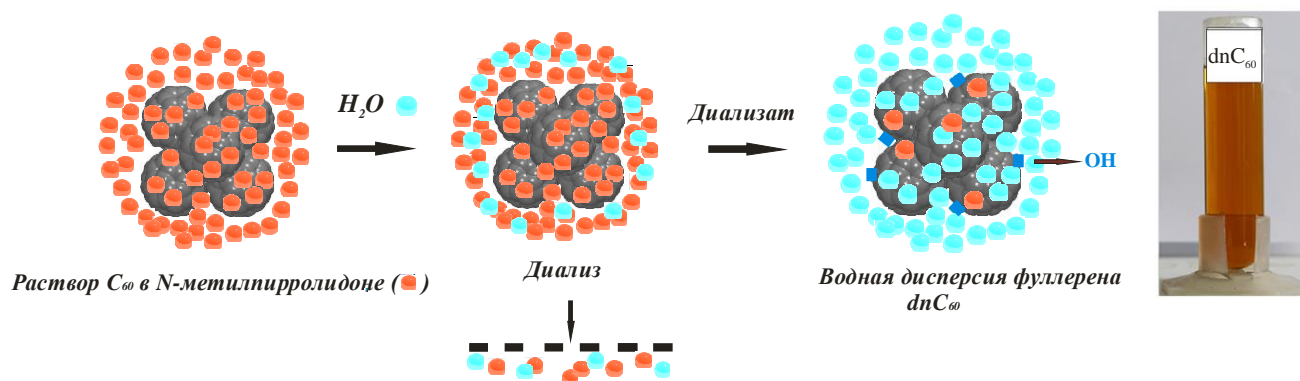


Рисунок 3.9. - Схема получения водного раствора фуллерена dnC_{60} диализным методом.

В результате диализа такой смеси в растворе остается только фуллерен в форме кластеров, не способных проходить через поры мембраны. Для стабилизации такого коллоидного раствора были применены природные нейтральные L-аминокислоты. Эффективность трансформации фуллерена из кристаллического состояния в раствор приближается к количественной, при этом можно получать растворы с концентрацией C_{60} до 250 мг/л, также дисперсию можно концентрировать упариванием под вакуумом. Устойчивость к нагреванию позволяет стерилизовать такие растворы.

Полученная дисперсия фуллерена dnC_{60} представляет собой прозрачный раствор с рН 5–6, цвет которого в зависимости от концентрации варьируется от светло-желтого до коричневатого-оранжевого с легкой опалесценцией, что указывает на его коллоидную природу. Он имеет три интенсивных максимума в

области 200-225, 260-270 и 335-355 и широкую полосу поглощения между 400 и 600 нм (рисунок 3.10). Эти значения характерны только для растворов C_{60} в воде, где происходит агрегация его молекул. Например, спектр раствора C_{60} в гексане, где присутствуют, как считается, только одиночные молекулы, имеет характерные максимумы при 213, 257, 328 и 407 нм [Bensasson et al., 1994]. Электронные спектры поглощения полученного раствора C_{60} являются более широкими, менее интенсивными, и практически не отличались от спектров, описанных ранее для дисперсий фуллерена, полученных путем замены растворителей или путем диспергирования в воде [Mchedlov-Petrosyan, 2013].

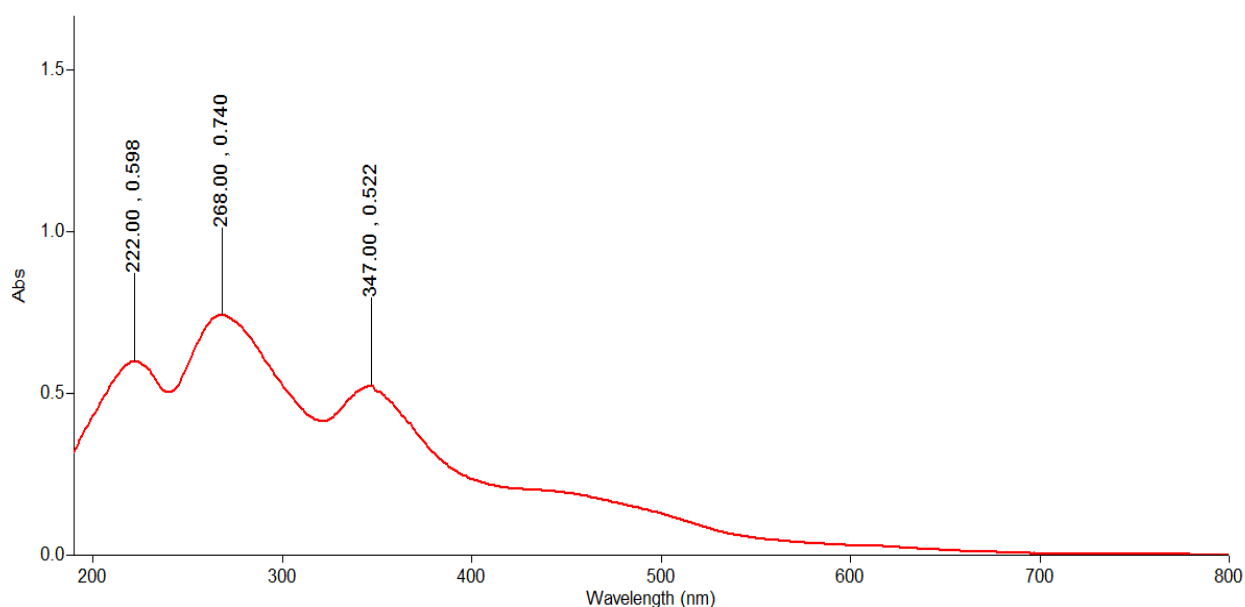


Рисунок 3.10. – УФ- спектр поглощения dnC_{60} .

Измерения размеров наночастиц методом фотонной корреляционной спектроскопии с использованием диодного лазера с длиной волны 650 нм (Photocor Compact-Z, Россия), показали, что средний гидродинамический диаметр фуллереновых наночастиц составляет 80 нм (рисунок 3.11), причем с достаточно узким распределением. Их ζ -потенциалы имели отрицательное $-25-30$ mV. Найденные значения размера частиц и ζ -потенциала для dnC_{60} очень близки к значениям водных дисперсий, полученных другими способами [Мчедлов-Петросян и др., 2010].

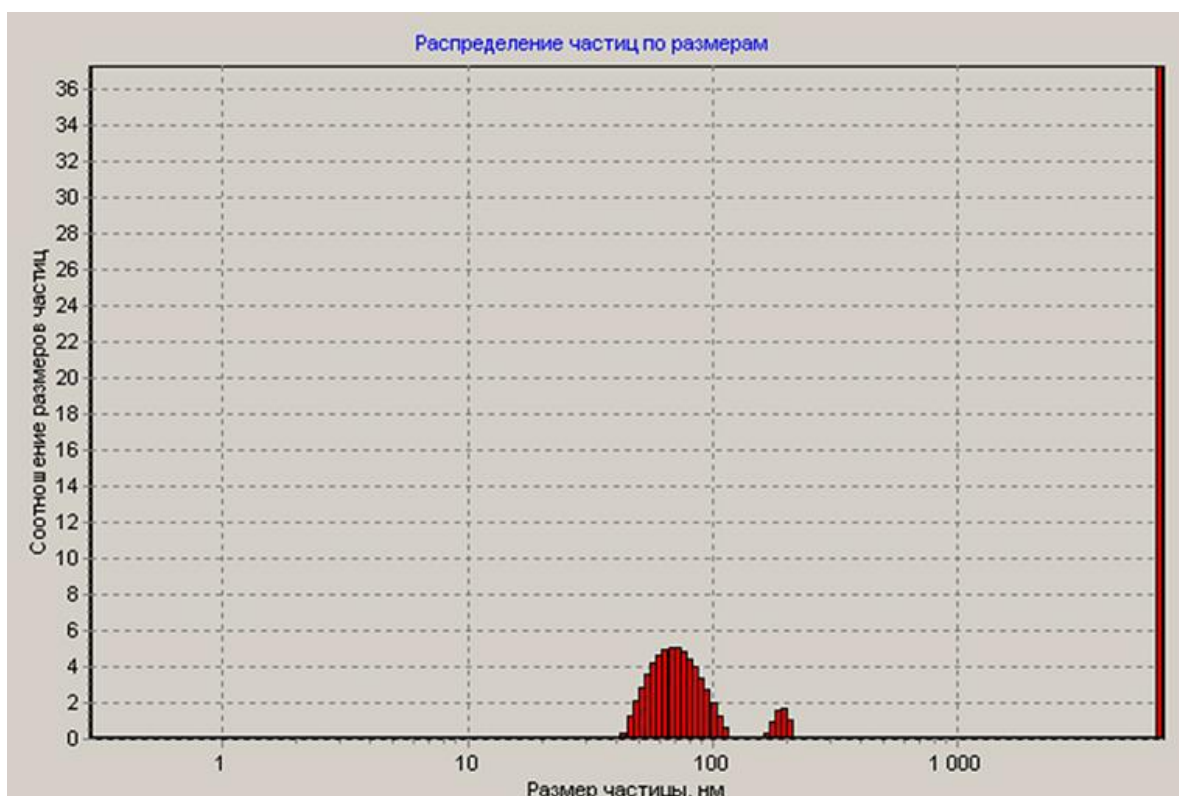


Рисунок 3.11 – Объемное распределение размеров частиц dnC₆₀

ИК-спектр дисперсии dnC₆₀ представлен на рисунке 3.12.

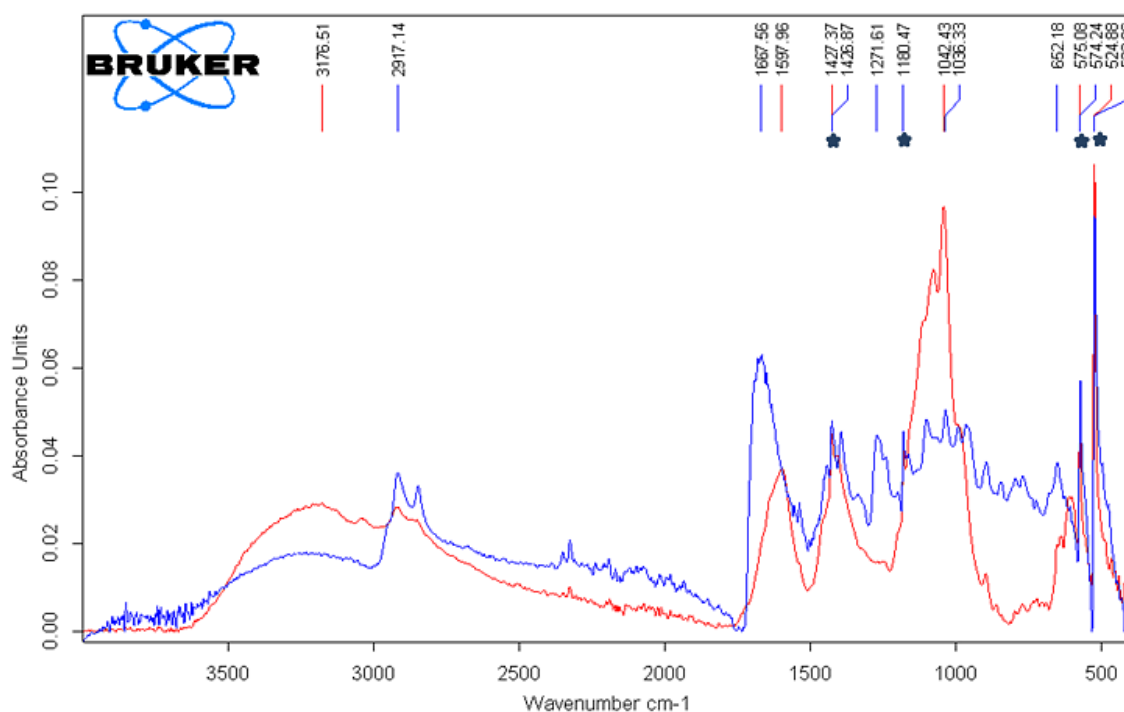


Рисунок 3.12 – ИК-Фурье спектр поглощения высушенного dnC₆₀ (красный) и высушенный раствор C₆₀/NMP (синий). Полосы характерные для скелета C₆₀ указаны звездочками.

Основным отличием дисперсии dnC_{60} является присутствие в наночастицах МП, образующий донорно-акцепторные комплексы с фуллереном, что может повышать гидрофильность наночастиц и способствовать стабилизации дисперсии. Кроме того, основываясь на спектральных данных (ИК- и масс-спектры), можно предположить, что фуллерен в водной дисперсии может также подвергаться частичному гидроксигированию, что может повышать стабильность коллоидной системы.

Масс-спектр (MALDI) раствора dnC_{60} показывает преимущественно молекулярный ион с $m/z = 720 \pm 1$, предполагая отсутствие существенных ковалентных модификаций фуллерена (рисунок 3.13).

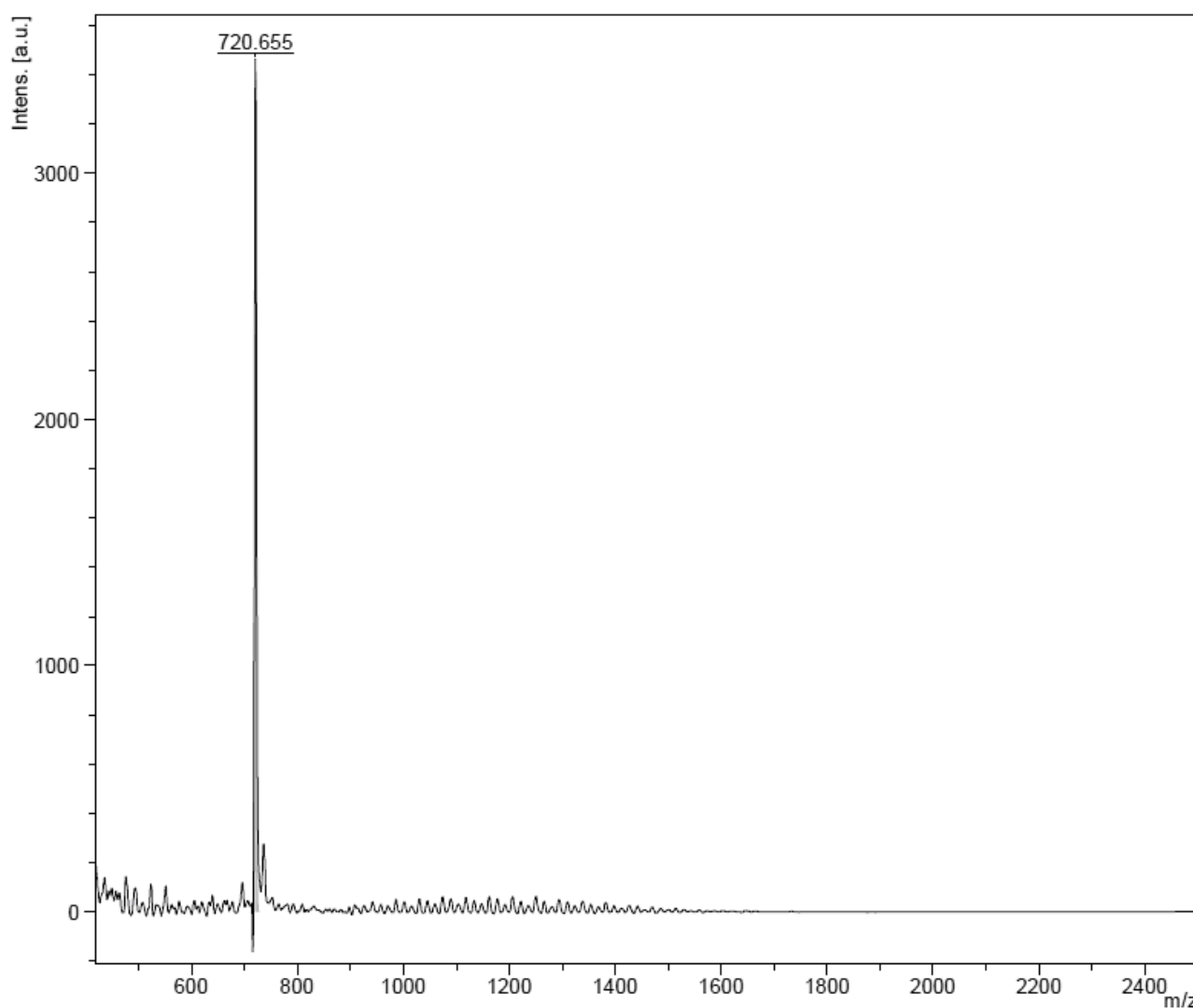


Рисунок 3.13. - Масс-спектр (MALDI) раствора dnC_{60} .

В результате был получен ряд водорастворимых производных фуллерена в форме наночастиц с различным зарядом и размером частиц. Полученные препараты на основе фуллерена были далее изучены на противовоспалительную активность в экспериментальной модели ГЗТ.

3.2. Первичный скрининг полученных препаратов на основе фуллерена

Анализ биологической активности фуллерена и его производных проводился на модели реакции ГЗТ *in vivo*. Животные модели ГЗТ часто используют в качестве доклинических тестов для оценки противовоспалительной активности препаратов. В данном исследовании реакция ГЗТ была индуцирована у самок мышей Balb/c путем введения модельного белка KLH. Введение фуллерена и его производных осуществляли до стадии сенсibilизации мышей путем инъекции растворов препаратов в хвостовую вену. Развитие воспаления оценивали визуально, по разнице (Δ) в толщине задних стоп мышей, и по антиген-специфической продукции клетками цитокинов.

Динамика и уровень воспалительной реакции в группе контроля заболевания был типичен для моделей ГЗТ (рисунок 3.14) [Black et al., 1999; Engstrom et al., 2009].

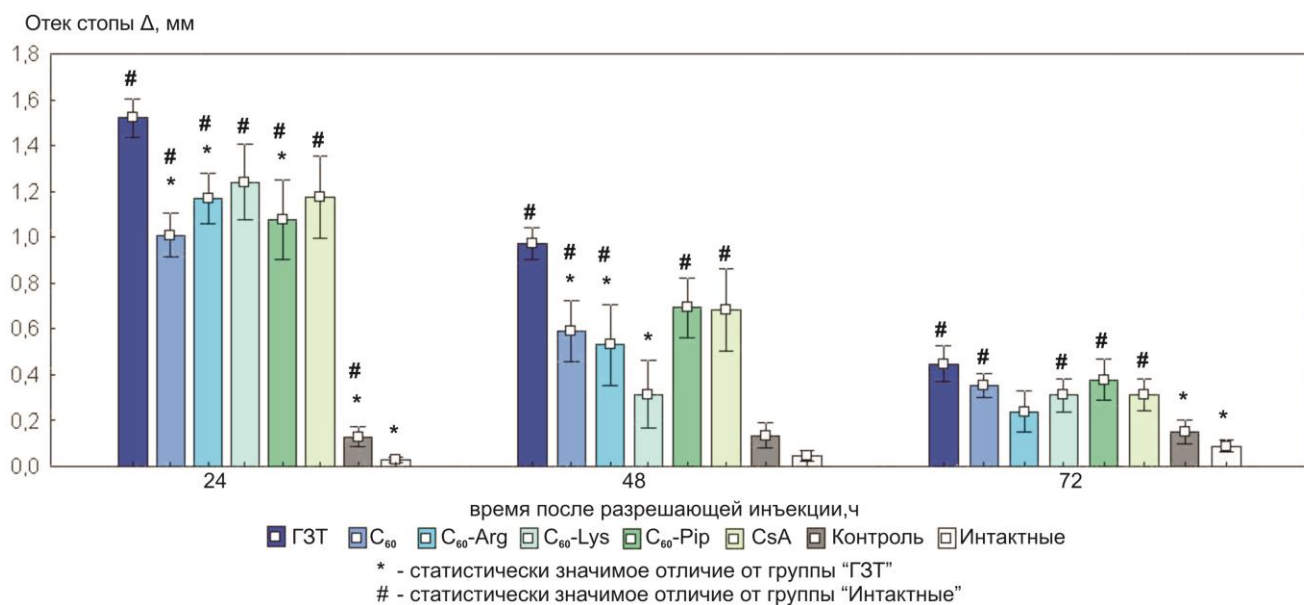


Рисунок 3.14. - Динамика и уровень воспалительной реакции ГЗТ.

Воспалительный отек стопы достигал максимума через 24 часа после разрешающей инъекции, затем наблюдался постепенный его спад в течение 72 часов.

На графике видно, что введение разрешающей дозы КЛН не сенсбилизированным контрольным животным не приводило к воспалению ($\Delta < 0,1$ мм).

Через 24 ч после разрешающей инъекции было выявлено незначительное различие в размере отека между группами, получавшими инъекции C_{60} -Arg, C_{60} -Lys, и группой «ГЗТ», степень ингибирования для указанных ПФ составляла 14.9 % и 18.3 %, соответственно (рисунок 3.15).

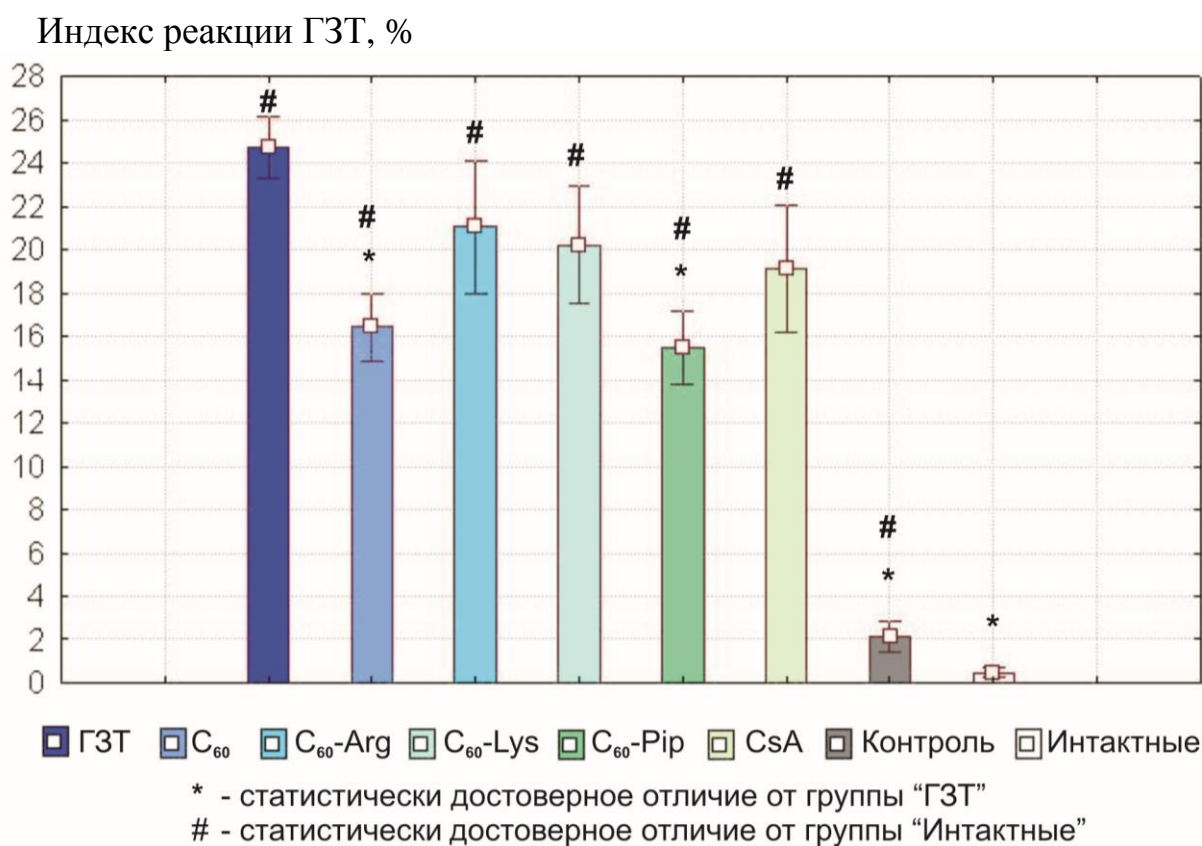


Рисунок 3.15. - Гистограмма сравнения индекса реакции ГЗТ через 24 часа после разрешающей инъекции аллергена.

Между тем, уровень воспалительной реакции у животных, получавших C_{60} и C_{60} -Pip, был заметно снижен, степень ингибирования составляла 33.7 % и 37.4%, соответственно по сравнению с группой «ГЗТ». Через 48 ч в группах « C_{60} -Arg»,

«C₆₀-Lys» воспалительная реакция была на 45.4 % и 67.7 % слабее по сравнению с группой «ГЗТ», а в группах «C₆₀» и «C₆₀-Pip» – на 39.4 % и 28.7 %, соответственно (рисунок 3.16).

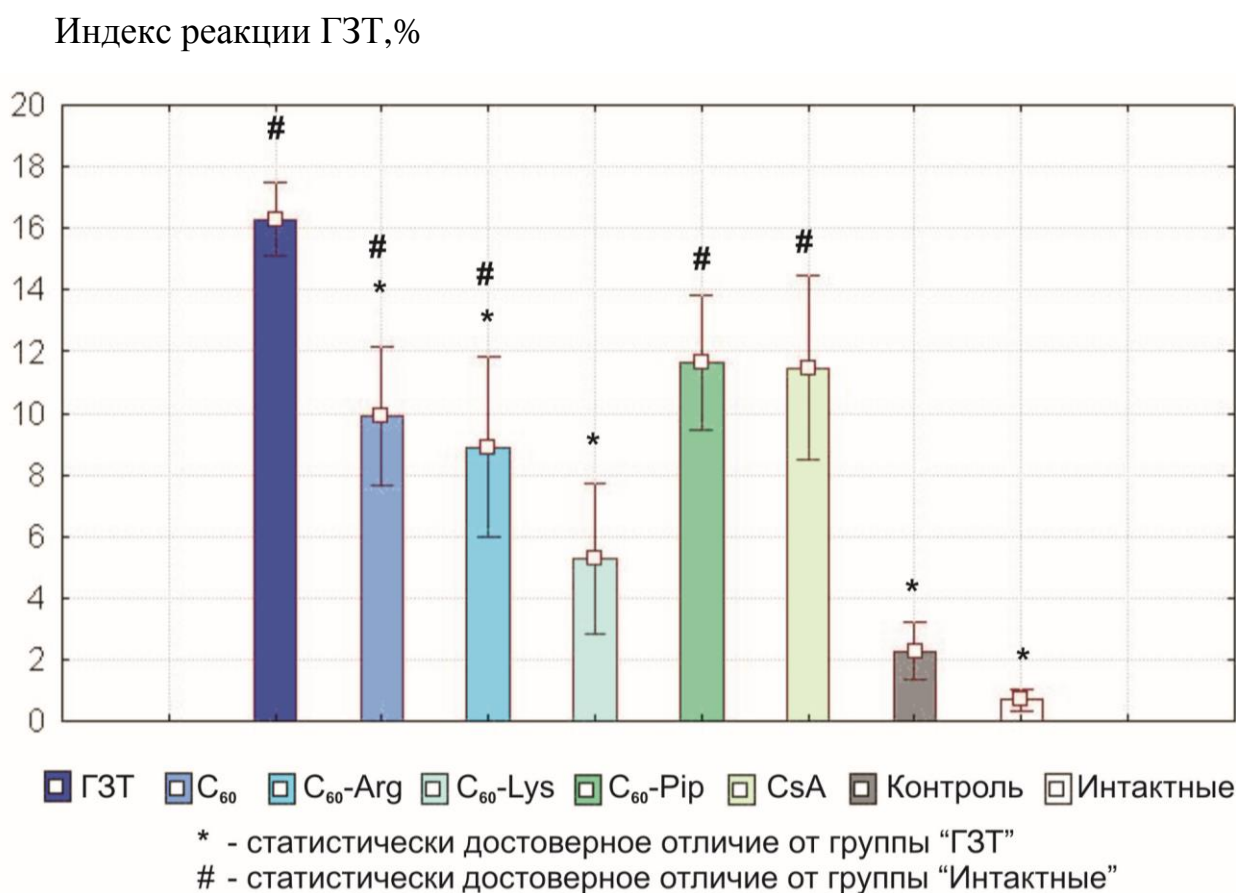


Рисунок 3.16. - Гистограмма сравнения индекса реакции ГЗТ через 48 часов после разрешающей инъекции.

Циклоспорин А, взятый как известный ингибитор Т-клеточного иммунного ответа (положительный контроль) в используемых дозах (100 мг/кг), показал, в рамках данного эксперимента, довольно слабый подавляющий эффект на реакцию ГЗТ: через 24 ч – 22.7 %, через 48 ч – 29.6 % и через 72 ч – 30 % ингибирования по сравнению с модельной группой.

Антиген-специфическую продукцию цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-17 и ИФН- γ , ФНО- α) анализировали методом ИФА.

Было показано, что уровни ИЛ-4 у мышей, получавших инъекции C₆₀-Arg и C₆₀-Lys, практически не отличались от уровней в группе «ГЗТ». Однако, в группах

«С₆₀», «С₆₀-Pip» и «CsA» продукция ИЛ-4 была значительно снижена по сравнению с группой модельных животных («ГЗТ») (рисунок 3.17).

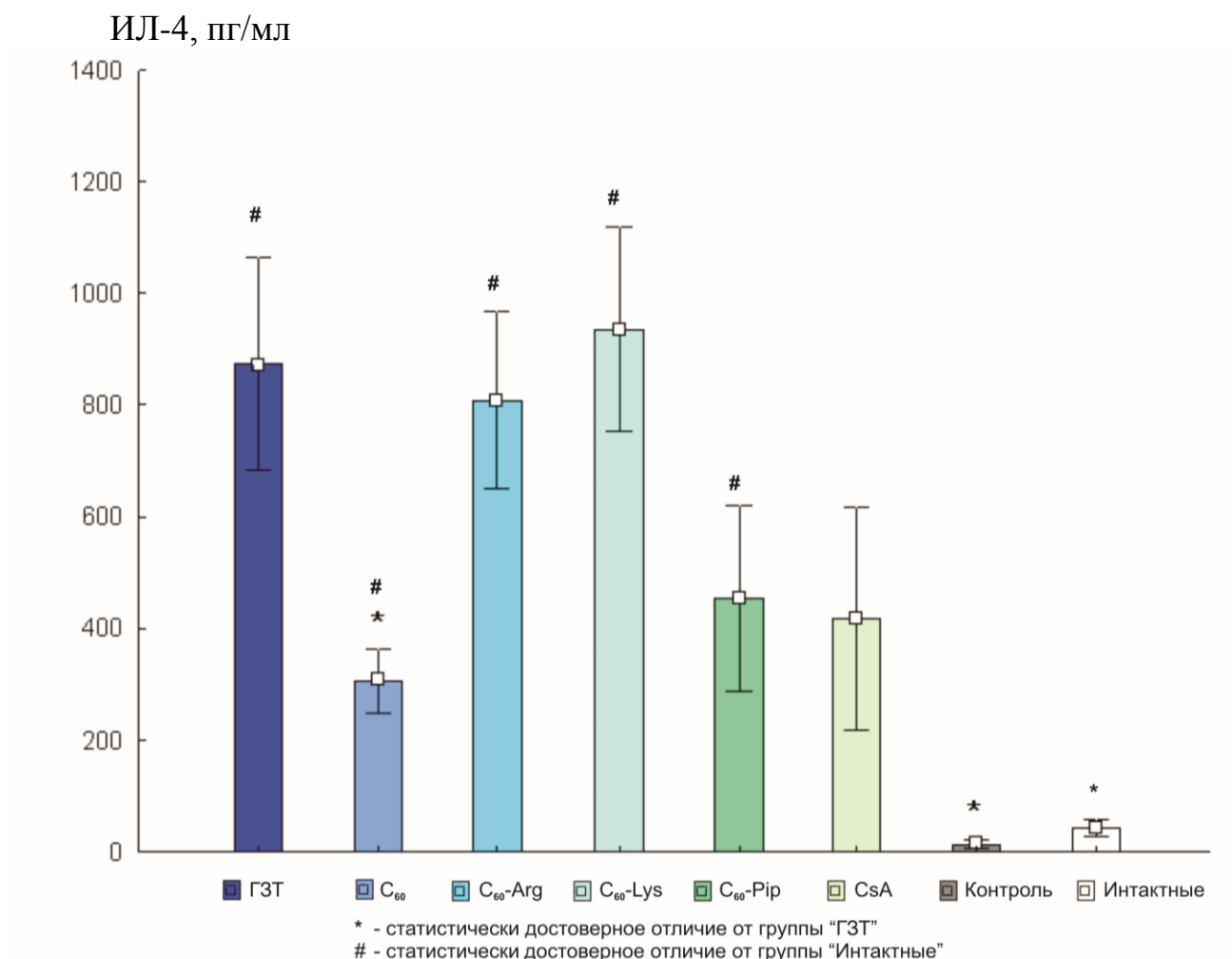


Рисунок 3.17. - Концентрации ИЛ-4 в супернатантах клеток селезенки мышей, собранных через 24 ч после разрешающей инъекции КЛН. Клетки стимулировали 2 мкг/мл КЛН.

Так, введение С₆₀ снижало антиген-специфическую продукцию ИЛ-4 в 3 раза, а С₆₀-Pip – почти в 2 раза, что сопоставимо с группой положительного контроля («CsA»).

Далее, было выявлено, что антиген-специфическая продукция ИЛ-5 в группах «С₆₀-Arg» и «С₆₀-Lys» была выражена также, как и в контрольной группе «ГЗТ». У мышей, получавших С₆₀, С₆₀-Pip и CsA наблюдался эффект ингибирования продукции ИЛ-5. А группа мышей, получавших инъекцию С₆₀, практически не отличалась от контролей (рисунок 3.18).

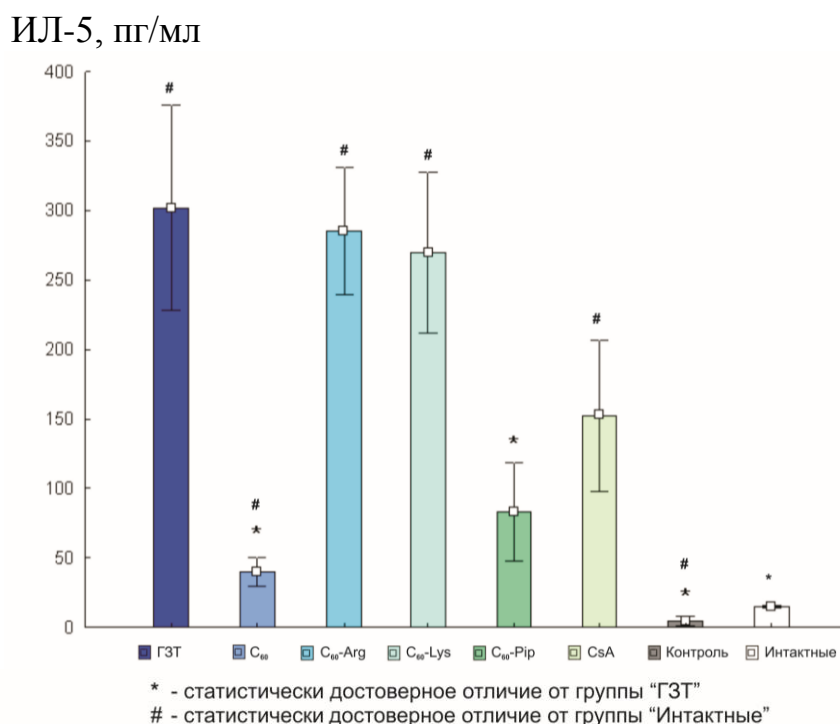


Рисунок 3.18. - Концентрации ИЛ-5 в супернатантах клеток селезенок мышей, собранных через 24 ч после разрешающей инъекции КЛН. Клетки стимулировали 2 мкг/мл КЛН.

Антиген-специфическая продукция ИЛ-17 представлена на рисунке 3.19.

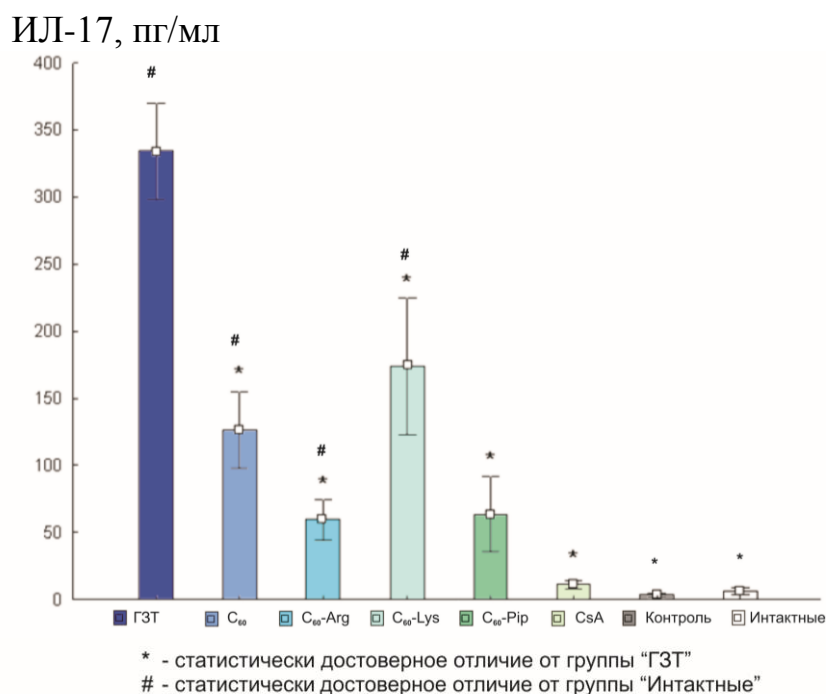


Рисунок 3.19. - Уровни ИЛ-17 в супернатантах клеток селезенок мышей, собранных 24 ч после разрешающей инъекции КЛН. Клетки стимулировали 2 мкг/мл КЛН.

Уровни ИЛ-17 мышей, представленные на рисунке, демонстрируют значительное снижение антиген-специфической продукции указанного цитокина во всех группах, получавших фуллерен или его производные по сравнению с группой «ГЗТ».

Таким образом, в группах «C₆₀-Arg» и «C₆₀-Pip» уровень выработки ИЛ-17 снизился в 5 раз, у животных получавших C₆₀-Lys и C₆₀ – в 2-2,5 раза, а в группе CsA до контрольного уровня.

Оценка уровня ИФН-γ показала понижение специфической продукции цитокина во всех группах, кроме «C₆₀-Lys», в которой уровень ИФН-γ соответствовал таковому в группе «ГЗТ» (рисунок 3.20).

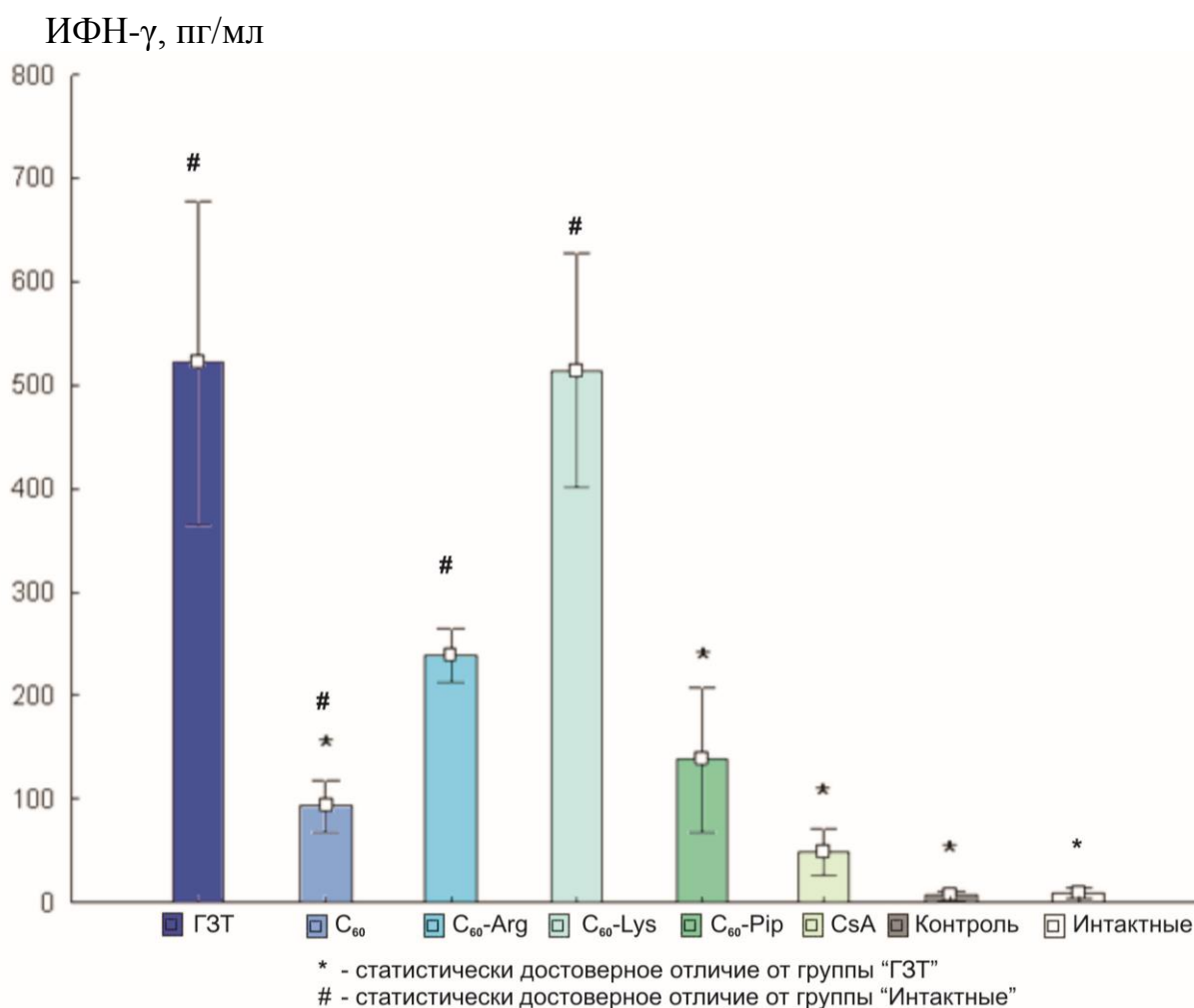


Рисунок 3.20. - Уровни ИФН-γ в супернатантах клеток селезенки мышей, собранных 24 ч после разрешающей инъекции КЛН. Клетки стимулировали 2 мкг/мл КЛН.

Так, продукция ИФН- γ была снижена в группе «C₆₀» в 5 раз, «C₆₀-Arg» – в 2 раза и «C₆₀-Pip» – в 3 раза по сравнению с группой, не получавшей терапию.

Далее, было показано, что при введении C₆₀ и C₆₀-Pip снижалась специфическая продукция ФНО- α примерно в 3 раза до уровня положительного контроля «CsA». Введение других производных фуллерена не влияло на продукцию данного цитокина (рисунок 3.21).

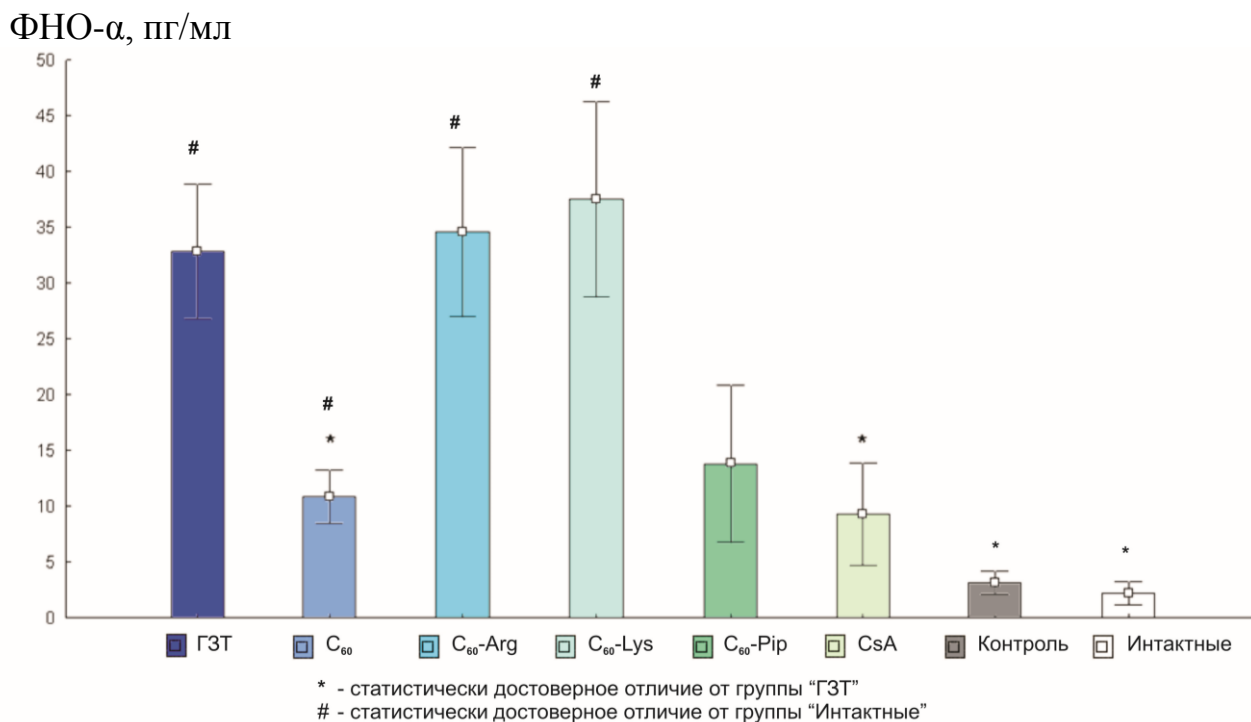


Рисунок 3.21. – Концентрации ФНО- α в супернатантах клеток селезенки мышей, собранных 24 ч после разрешающей инъекции КЛН. Клетки стимулировали 2 мкг/мл КЛН.

На основе полученных данных, можно сделать заключение о том, что некоторые полученные на основе фуллерена C₆₀ соединения, по-видимому, способны ингибировать Th1-, Th2- и Th17-тип иммунного ответа. При этом наибольшая степень ингибирования воспалительной реакции и иммунного ответа наблюдалась при введении водной дисперсии фуллерена. Таким образом, было принято решение подробнее изучить это соединение, в том числе оценить его безопасность и изучить противоаллергическую активность.

3.3 Оценка гемолитической активности водной дисперсии фуллерена

На первом этапе исследований водной дисперсии фуллерена было решено оценить его гемолитическую активность. Было показано, что изменение концентрации водной дисперсии фуллерена dnC_{60} коррелирует со степенью гемолиза эритроцитов (рисунок 3.22).

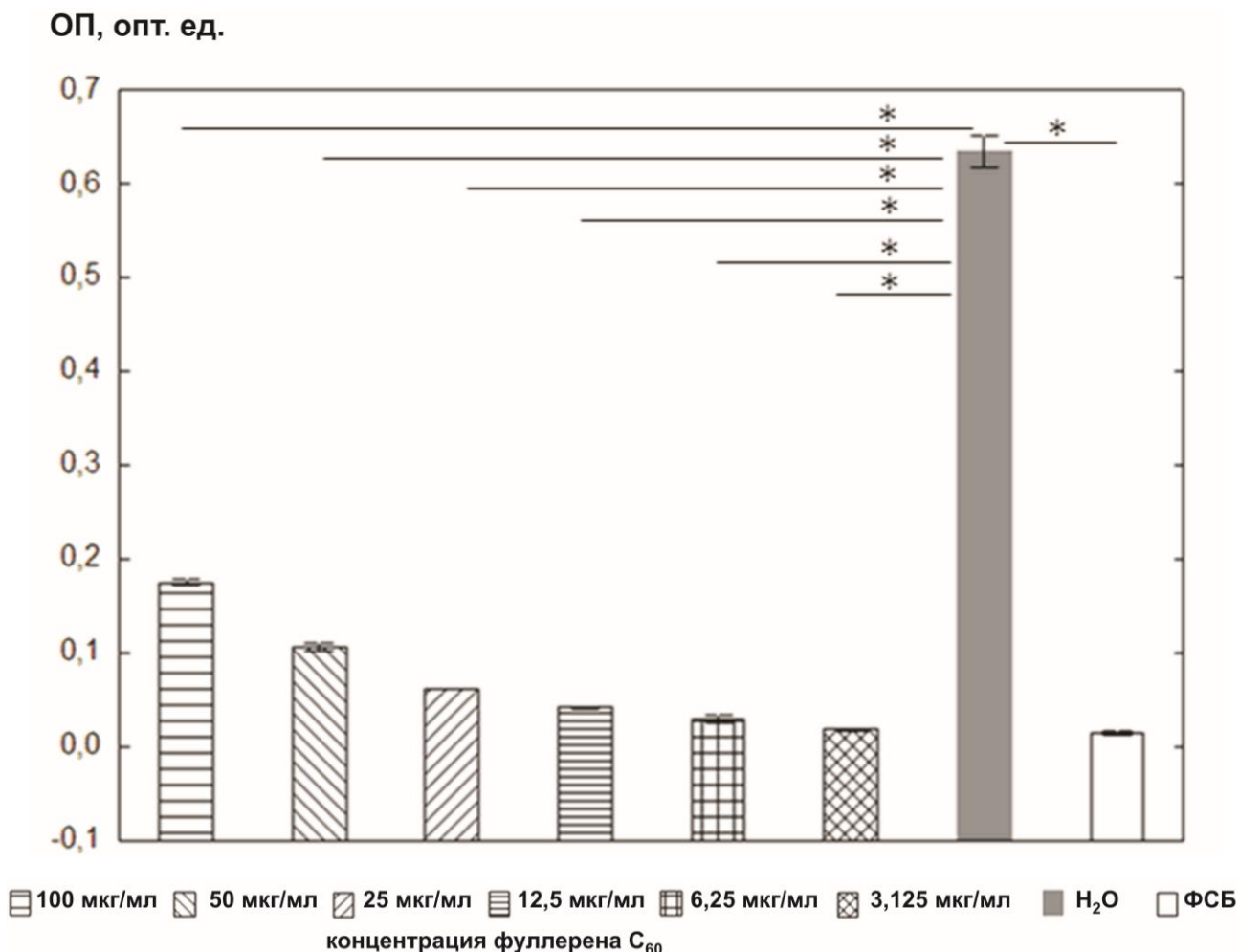


Рисунок 3.22. - Изменение степени гемолиза эритроцитов в зависимости от концентрации dnC_{60} .

В таблице 3.3 представлен процент гемолиза эритроцитов в зависимости от концентрации водной дисперсии фуллерена dnC_{60} . При внесении даже максимальной концентрации 100 мкг/мл гемолиз эритроцитов почти не наблюдался.

Таблица 3.3. Степень гемолиза эритроцитов в зависимости от концентрации dnC_{60} .

№	Концентрация C_{60} , мкг/мл	% гемолиза
1	100	25,8
2	50	14,6
3	25	7,6
4	12,5	4,4
5	6,25	2,3
6	3,12	0,5
7	H_2O	100

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии у водной дисперсии фуллерена гемолитической активности.

3.4. Оценка токсичности водной дисперсии фуллерена

Токсическое действие водного раствора фуллерена было изучено при однократном внутривенном (в/в), внутрибрюшинном (в/б) и интрагастральном (и/г) введениях водного раствора фуллерена dnC_{60} . После введения dnC_{60} проводился мониторинг веса и поведенческих реакций лабораторных животных на протяжении 7/16 дней.

После однократного внутривенного введения различных доз препарата падежа мышей зафиксировано не было. Кроме того, за 7 дней наблюдения никаких изменений в поведении животных выявлено не было.

Изменение веса мышей в течение недели после однократного в/в введения dnC_{60} представлено на рисунке 3.23. Видно, что потери массы тела у мышей в целом не наблюдается.

Таким образом, при внутривенном введении фуллерена dnC_{60} токсических проявлений и изменения поведения животных выявлено не было. Потери веса у мышей тоже не наблюдалось.

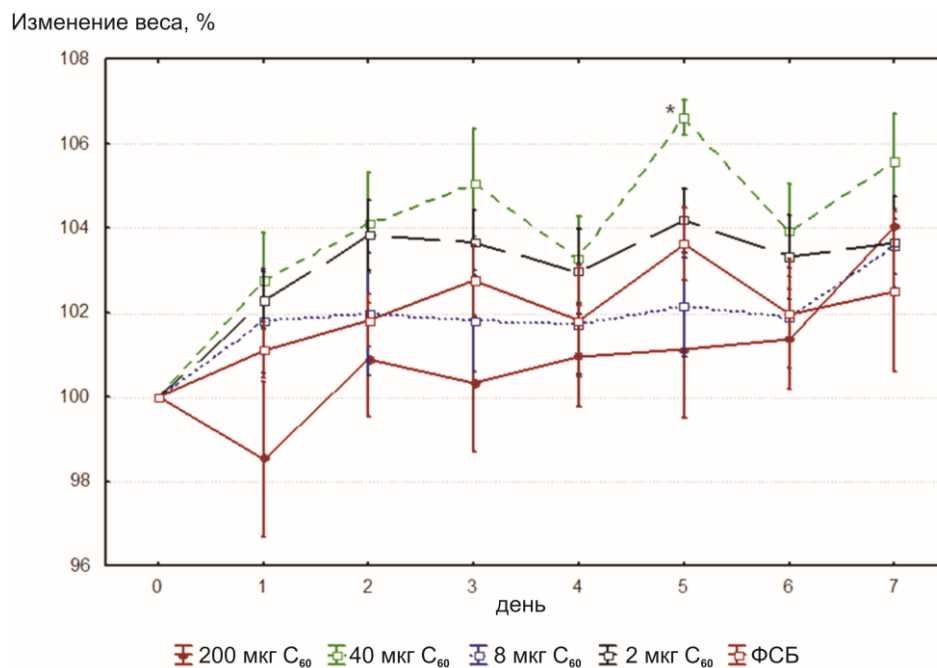


Рисунок 3.23. - Изменение веса мышей при в/в введении различных доз водного раствора фуллерена C₆₀. * - достоверное отличие от группы «ФСБ».

Далее, было изучено токсическое действие различных доз водного раствора фуллерена dnC₆₀ при внутрибрюшинном введении. Изменение массы тела животных представлено на рисунке 3.24.

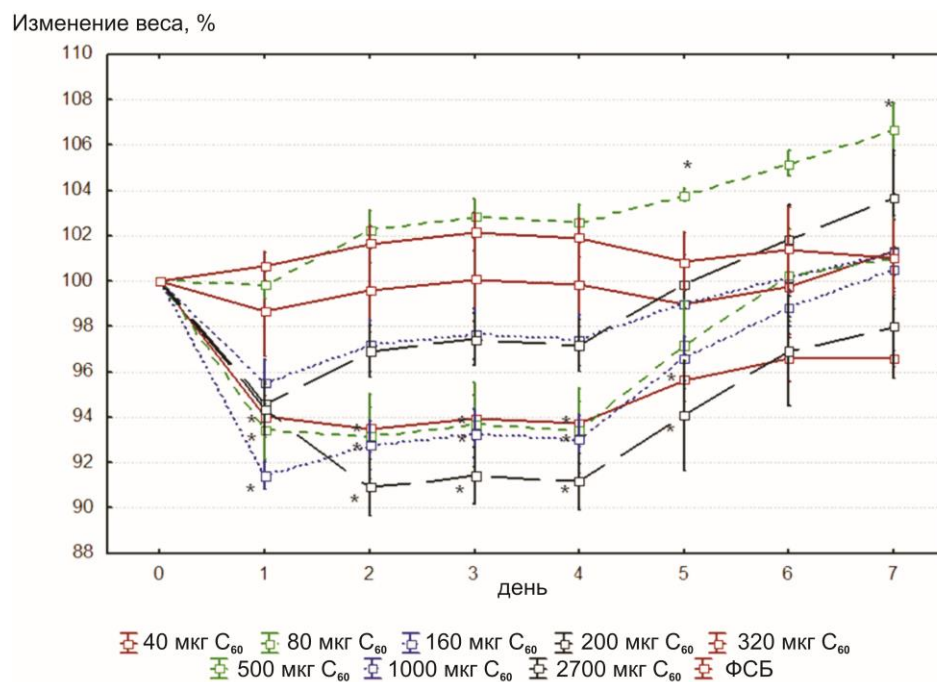


Рисунок 3.24. - Изменение веса мышей при в/б введении различных доз водного раствора фуллерена C₆₀. * - достоверное отличие от группы «ФСБ».

Было показано, что однократное в/б введение фуллерена dnC_{60} не приводит к падежу животных, а также не влияет на поведенческие реакции мышей в течение 7 дней наблюдения.

Для изучения токсического эффекта водной дисперсии фуллерена dnC_{60} при интрагастральном введении препарат вводили в дозе 1000 мкг. Было показано, что при однократном и/г введении фуллерена dnC_{60} гибели животных не происходило. Поведенческие реакции у животных контрольной и опытной групп не отличались за все время наблюдения (16 дней). В процессе внешнего клинического осмотра не было обнаружено никаких патологических изменений шерсти и кожи мышей, не наблюдалось процессов экссудации, кровоизлияний, пролиферативных процессов; дефекация и мочеиспускание были регулярными и без патологических особенностей, кал и моча обычного цвета. Изменение массы животных показано на рисунке 3.25.

Изменение веса, %

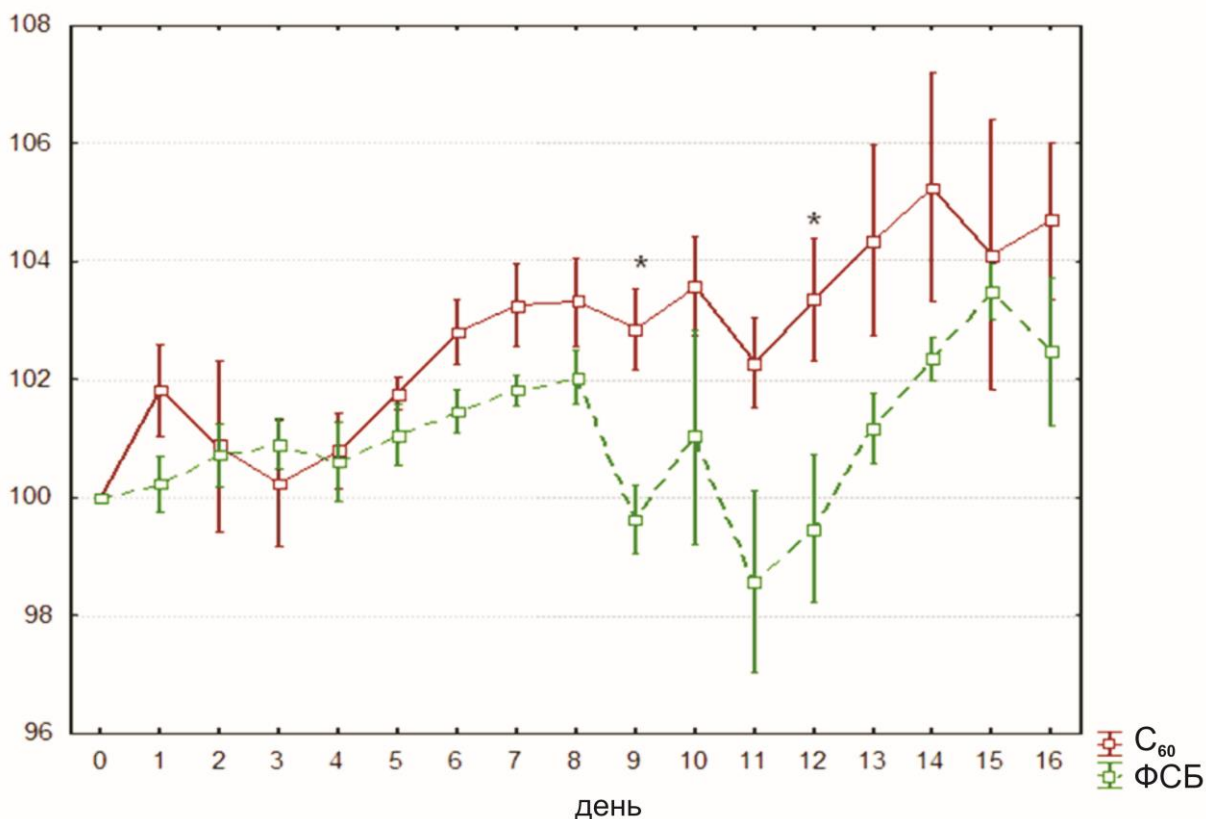


Рисунок 3.25. - Изменение веса мышей при и/г введении фуллерена C_{60} . * - достоверное отличие от контрольной группы «ФСБ».

Средняя масса тела мышей в опытной группе статистически не отличалась от средней массы в контрольной группе. Ни у одного животного не отмечалось снижения массы тела относительно исходных значений.

Таким образом, по совокупности полученных данных по изменению веса мышей и их поведения при однократном введении водного раствора фуллерена dnC_{60} , можно сделать вывод о том, что независимо от пути введения препарат не обладает токсическим эффектом.

Проведение некропсии (проводилось сотрудником ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России Камышниковым О. О.) показало отсутствие патологических признаков воспаления, некроза, геморрагии, отека во внутренних органах, внутренние полости тела не содержали свободной или осумкованной жидкости у животных в опытной и контрольной группе. Не отмечалось раздражающего действия исследуемого вещества и растворителя на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта.

На всём протяжении желудочно-кишечного тракта не было обнаружено явлений непроходимости, стенка его была нормальной толщины, слизистая оболочка была обычного вида. Исследовались также и пищеварительные железы: печень и поджелудочная железа, в которых внешних патологических изменений не было обнаружено.

Было проведено гистологическое исследование вышеперечисленных органов и их фрагментов. При этом не было выявлено никаких патологических изменений, свидетельствующих за воспалительные, некробиотические, гипопластические или гиперпластические процессы, дистрофии и атрофии, кровоизлияния и новообразования в органах и тканях мышей, как в опытной, так и в контрольной группе.

Пищевод в гистологических препаратах был представлен полый гладкомышечной трубкой (рисунок 3.26 А). Стенка желудка состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоя. Железы желудка не атрофированы (рисунок 3.26 Б). Тонкий кишечник представлен трубчатым мышечным органом, который состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоя (рисунок 3.26

В). Толстый кишечник также представлен трубчатым мышечным органом, который состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоя. Но, в отличие от тонкого отдела кишечника, в толстом кишечнике кишечные ворсинки отсутствуют (рисунок 3.26 Г).

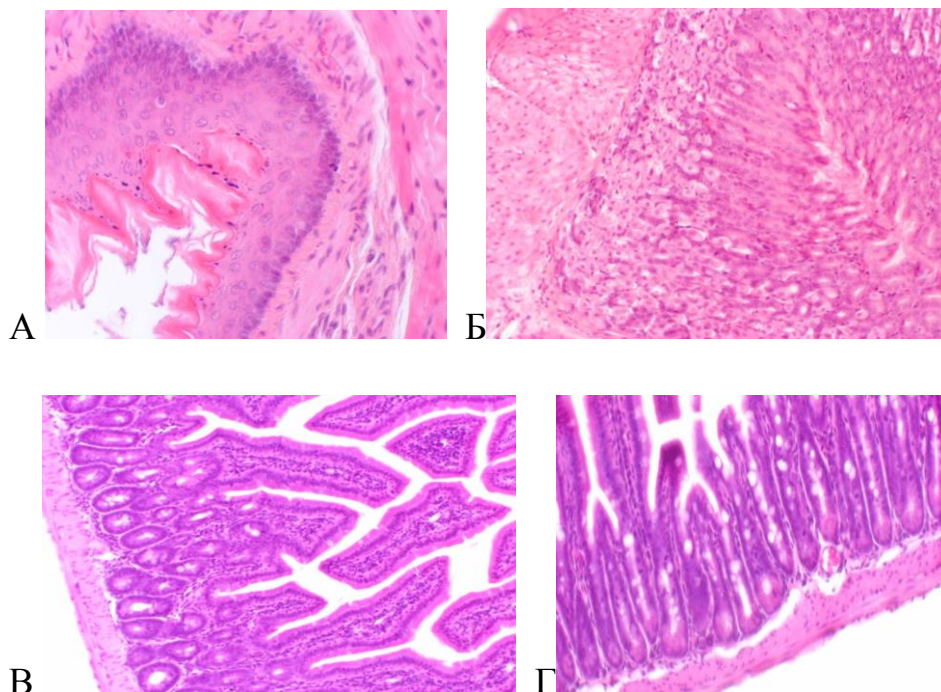


Рисунок 3.26. - Гистологическое исследование желудочно-кишечного тракта после интрагастрального введения суспензии фуллеренов, окраска гематоксилин-эозин. А. Пищевод мыши, увеличение 400. Б. Желудок мыши, увеличение 400. В. Тощая кишка мыши, увеличение 200. Г. Ободочная кишка мыши, увеличение 200.

При микроскопическом исследовании печени отмечено сохранение балочно-радиарного расположения гепатоцитов, перипортальные и централобулярные зоны без патологических особенностей (рисунок 3.27 А). Микроскопическое строение поджелудочной железы характеризует её нормальное развитие и функционирование (рисунок 3.27 Б). Матка состоит из трёх слоев: серозного, мышечного и эпителиального. Эпителий матки и маточные железы в неактивном состоянии (рисунок 3.27 В). Яичники имеют фолликулы всех стадий созревания и единичные жёлтые тела (рисунок 3.27 Г). В почках

клубочки, каналы и собирательные трубочки без видимой патологии (рисунок 3.27 Д).

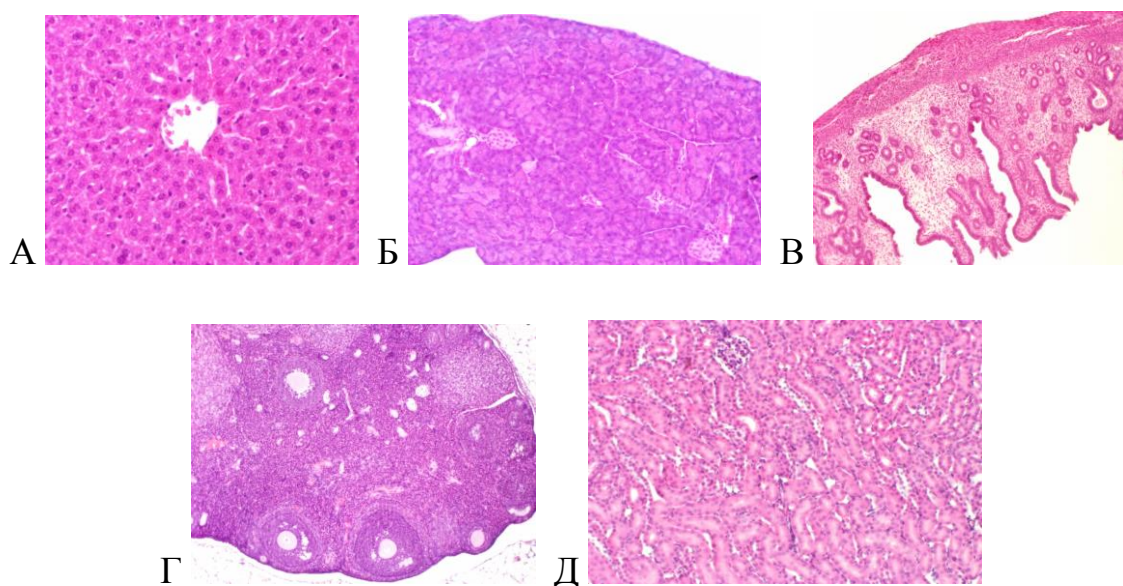


Рисунок 3.27. - Гистологическое исследование печени, почек, поджелудочной железы, матки и яичников после интрагастрального введения суспензии фуллеренов, окраска гематоксилин-эозин. А. Печень мыши, увеличение 400. Б. Поджелудочная железа мыши, увеличение 200. В. Матка мыши, увеличение 100. Г. Яичник мыши, увеличение 100. Д. Почка мыши, увеличение 200.

Таким образом, макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов и тканей у подопытных животных показало отсутствие токсического и раздражающего действия водной дисперсии фуллерена dnC_{60} .

3.5. Изучение противоаллергических эффектов водной дисперсии фуллерена на экспериментальной модели атопического дерматита

3.5.1. Оценка иммунного ответа при введении водной дисперсии фуллерена dnC_{60}

Для оценки противоаллергических эффектов водной дисперсии фуллерена и его влияния на иммунный ответ использовали проверенную нами модель экспериментального атопического дерматита (АД) на мышах [Шершакова и др., 2011]. Сенсibilизацию мышей проводили модельным аллергеном овальбумином

(Sigma). Аллерген наносили на 7 дней в виде аппликации. Через две недели 7 дневную аппликацию 0,1 % ОА повторяли еще два раза с двух недельным интервалом (группа «АД»). Учет результатов проводили в конце периода третьей аппликации. Отрицательным контролем являлись мыши, эпидермально получавшие вместо ОА фосфатно-солевой буфер (группа «Интактные»). Фуллерен dnC_{60} вводили подкожно и эпидермально между аппликациями с ОА.

Следует отметить, что в научной литературе данных по изучению противоаллергического действия фуллерена в отношении АД не описано.

Интенсивность развития у мышей иммунного ответа на ОА оценивали, в первую очередь, по уровню специфических IgE в сыворотке крови, взятой после 2 и 3 этапа сенсibilизации (рисунок 3.28).

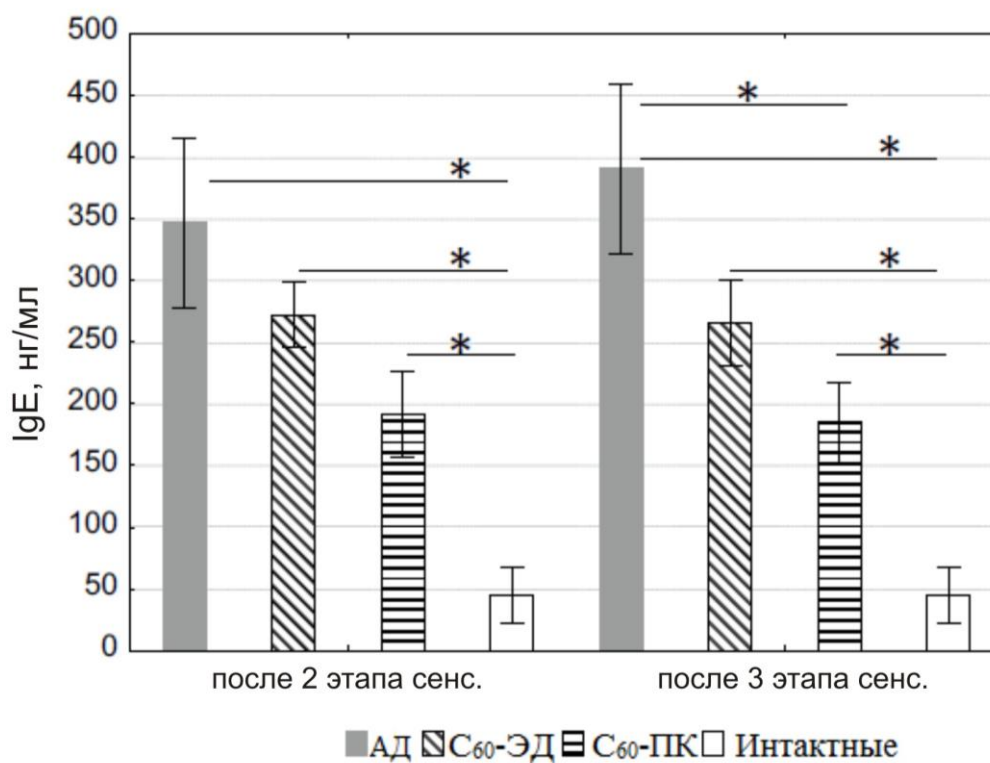


Рисунок 3.28. - Уровни анти-ОА-IgE-антител в индивидуальных сыворотках мышей сенсibilизации ОА. * - достоверные отличия от группы «Интактные».

Наибольший уровень анти-ОА-IgE-антител был выявлен в группе «АД». Это свидетельствует о доминировании Th2-типа иммунного ответа, что является

характерным признаком аллергических состояний. У мышей групп «С₆₀-ЭД» и «С₆₀-ПК» анти-ОА IgE-ответ был выражен слабее, чем у модельных животных.

Косвенной характеристикой перестройки иммунного ответа к аллергену после терапии служило соотношение уровней специфических IgG1- и IgG2a-антител, которые являются маркерами Th2- и Th1-типов иммунного ответа, соответственно. Индекс анти-ОА-IgG1/IgG2a был рассчитан по данным оптических плотностей итоговых уровней антител после третьей ЭД аппликации ОА (рисунок 3.29).

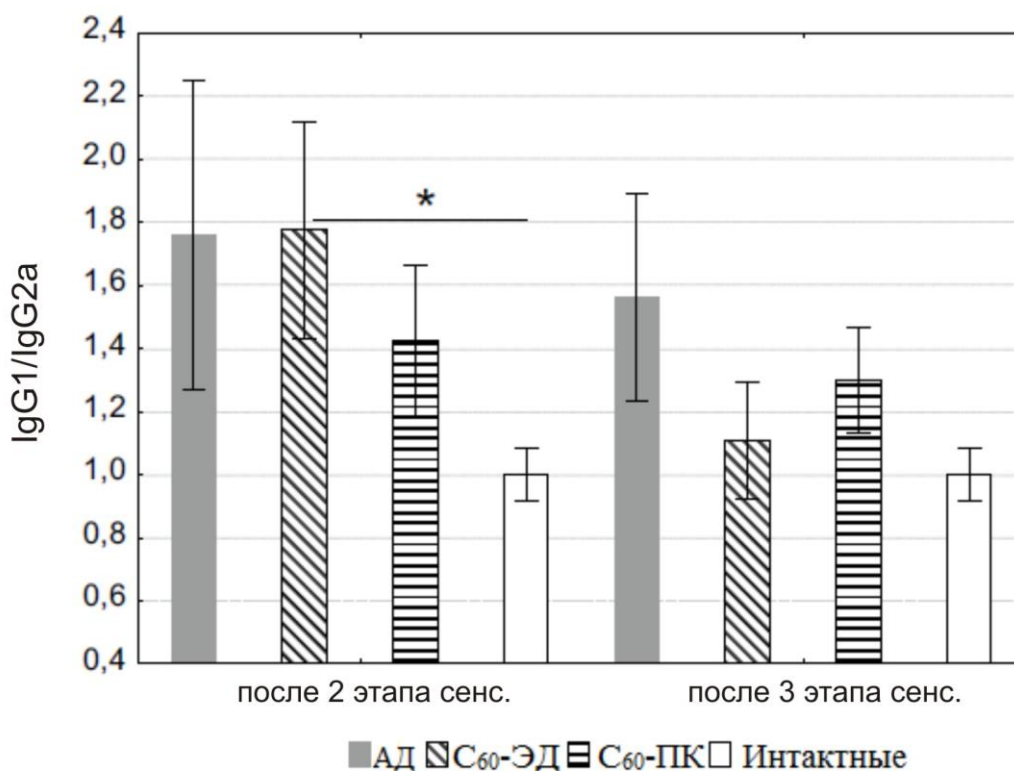


Рисунок 3.29. - Соотношение уровней анти-ОА-IgG1/IgG2a-антител по единицам ОП в каждой группе после 3-й ЭД аппликации ОА. * - достоверные отличия от группы «Интактные».

Увеличение индекса IgG1/IgG2a свидетельствует о Th2-направленности иммунного ответа, а уменьшение – о преобладании иммунного ответа с участием Th1-клеток. На графике видно, что после итоговой сенсibilизации в группах «АД» и «С₆₀-ПК» индекс IgG1/IgG2a наибольший и составляет 1,75, а у мышей, получавших С₆₀ эпидермально он значительно ниже. В группе «Интактные» этот

индекс был равен 1,0. Следует отметить, что наибольший сдвиг профиля иммунного ответа в сторону Th1-типа наблюдался у мышей, получавших фуллерен dnC_{60} накожно.

Кроме антительного ответа, были проанализированы показатели антиген-специфической активации клеток: ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-12 и ИФН- γ , ФНО- α .

Показано, что уровень ИЛ-4 в супернатантах стимулированных спленоцитов мышей в группах « C_{60} -ЭД» и « C_{60} -ПК» был достоверно ниже по сравнению с модельной группой «АД», что свидетельствует о пониженной активации клеток Th2-типа (рисунок 3.30). Причем, уменьшение концентрации ИЛ-4 наблюдалось независимо от способа введения фуллерена.

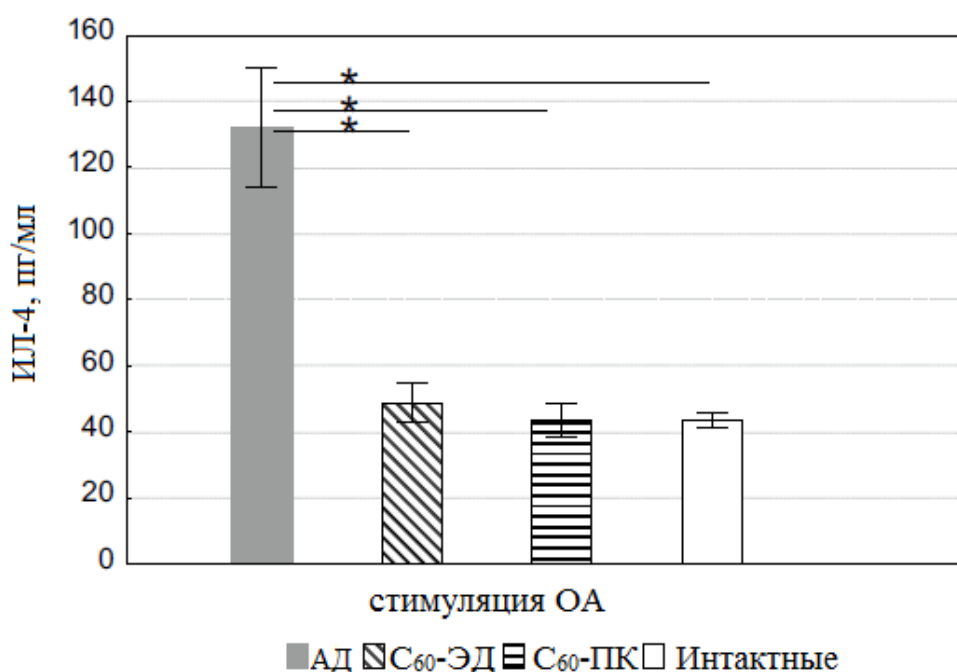


Рисунок 3.30. - Концентрация ИЛ-4 в супернатантах стимулированных спленоцитов мышей. * - достоверно отличается от группы «АД».

Уровень ИЛ-5 в супернатантах ОА-стимулированных спленоцитов мышей, получавших фуллерен, был существенно ниже по сравнению с уровнем в группе «АД» (рисунок 3.31). Следует отметить, что достоверное снижение ИЛ-5 наблюдалось при накожных аппликациях фуллерена, что свидетельствует об подавлении активации Th2-клеток.

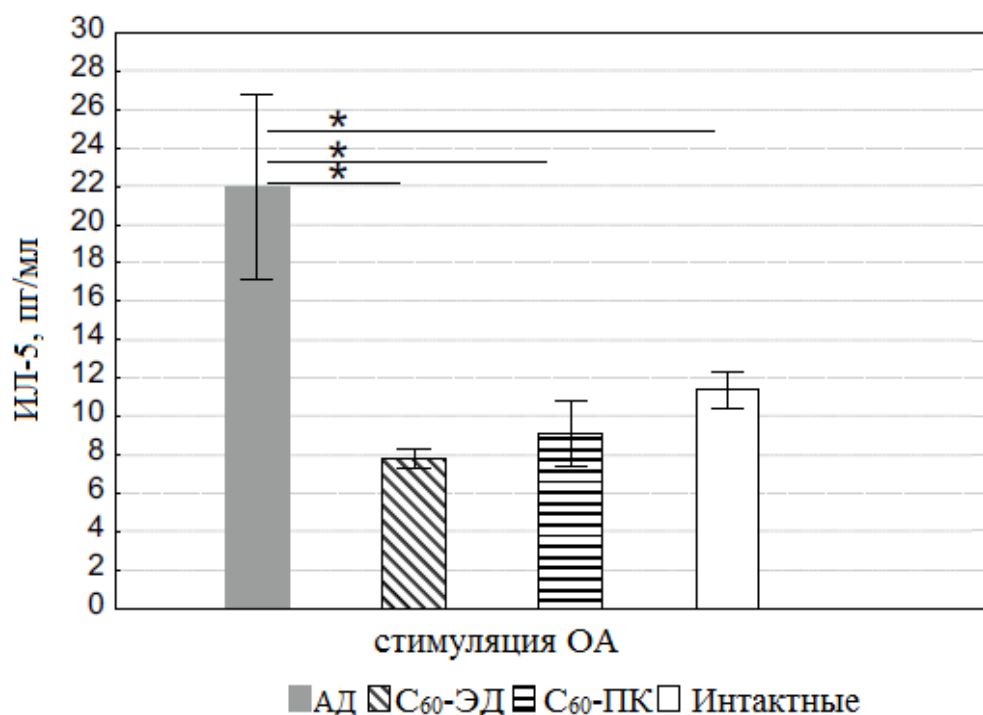


Рисунок 3.31. - Концентрация ИЛ-5 в супернатантах стимулированных спленоцитов мышей. * - достоверно отличается от группы «АД».

Что касается ИЛ-12, то его концентрация в супернатантах стимулированных ОА спленоцитов мышей в группе «С₆₀-ЭД» была выше такового в модельной группе (рисунок 3.32).

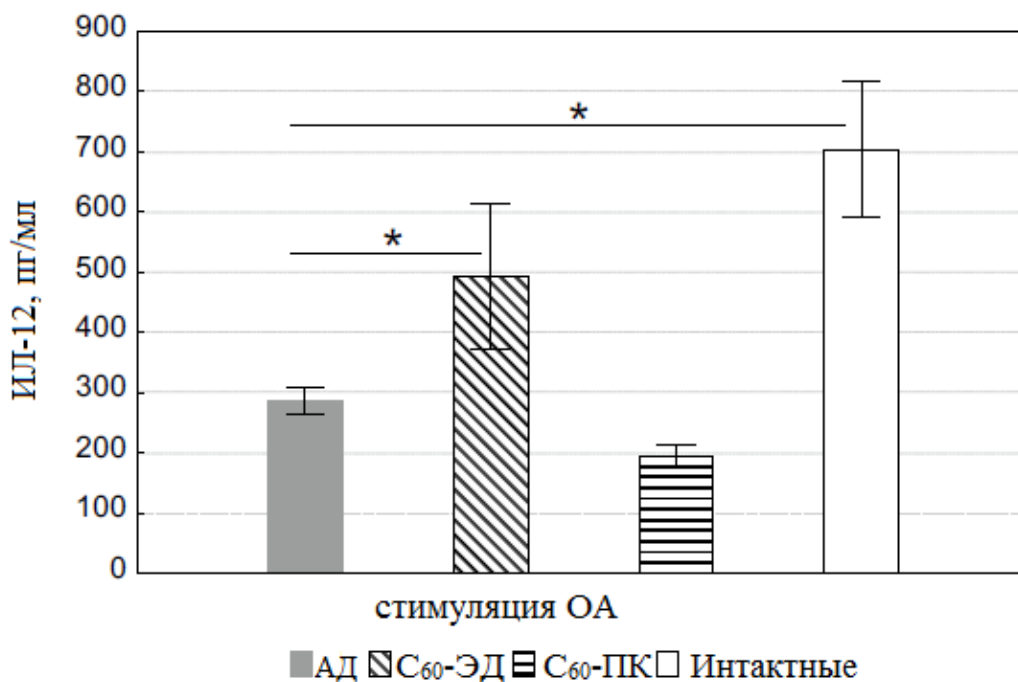


Рисунок 3.32. - Концентрация ИЛ-12 в супернатантах стимулированных спленоцитов мышей. * - достоверно отличается от группы «АД».

На графике видно, что уровень ИЛ-12 у мышей, получавших фуллерен на кожу, стремится к уровню интактных животных, чего не наблюдается в группе «С₆₀-ПК».

Известно, что ИЛ-12 является цитокином Th1-профиля, который способствует дифференциации Т-клеток в Th1-клетки, поэтому его выработка свидетельствует в данном случае о сдвиге иммунного ответа именно в сторону Th1-типа. Кроме того, ИЛ-12 ингибирует выработку ИЛ-4, а также стимулирует продукцию ФНО-α и ИФН-γ.

Анализ продукции ИФН-γ показан на рисунке 3.33.

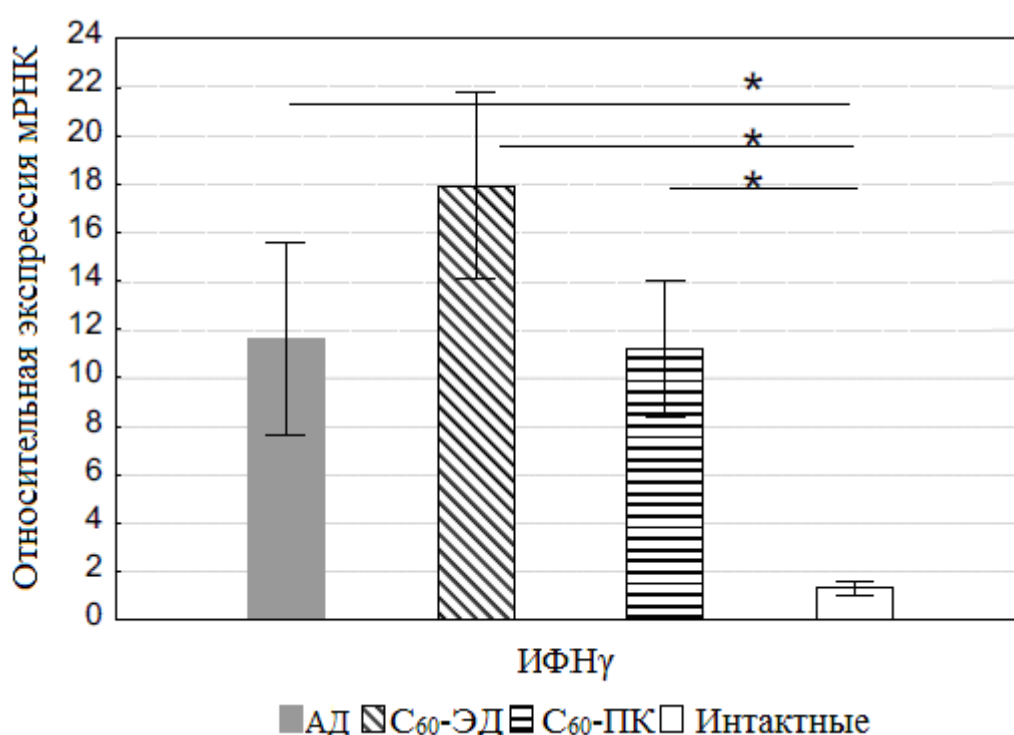


Рисунок 3.33. - Концентрация ИФН-γ в супернатантах стимулированных спленоцитов. * - достоверно отличается от группы «АД».

Повышенный уровень экспрессии ИФН-γ отмечен у мышей, получавших фуллерен эпидермально, что косвенно свидетельствует о повышенной активации Th1-клеток. При подкожном введении фуллерена повышение экспрессии цитокина не наблюдалось.

Далее, была проанализирована экспрессия маркера активации Т-регуляторных клеток Foxp3, который может влиять на характер иммунного ответа (рисунок 3.34).

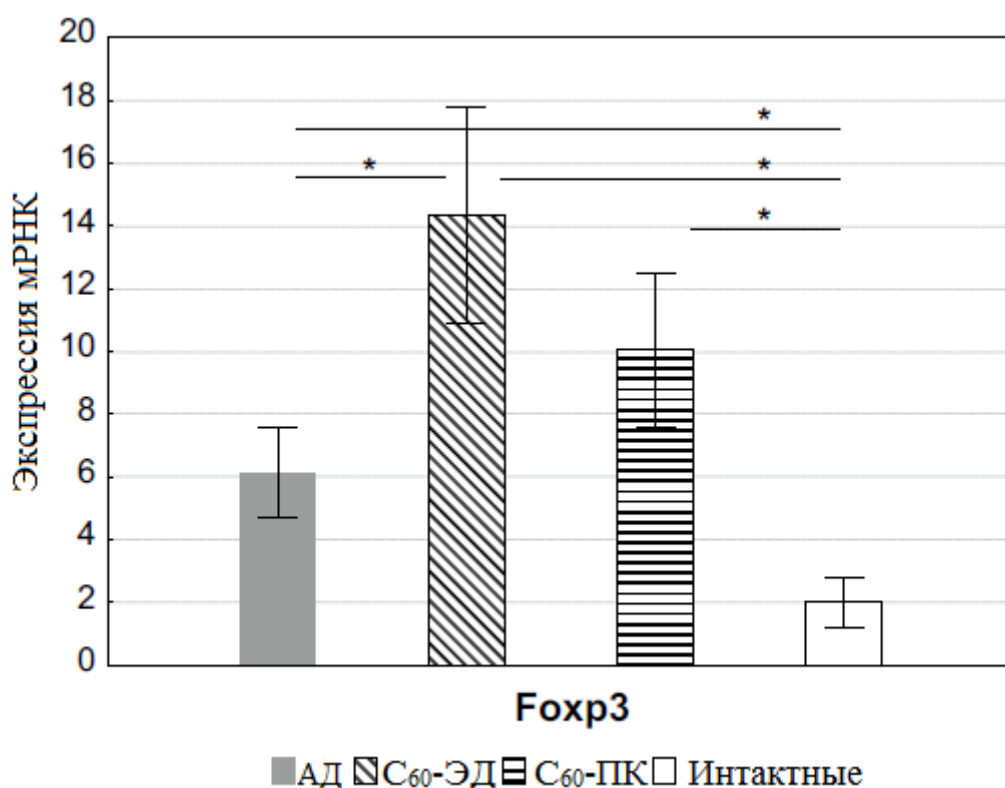


Рисунок 3.34. - Концентрация Foxp3 в супернатантах стимулированных спленоцитов. * - достоверно отличается от группы «АД».

На графике показано, что в группах, получавших фуллерен, уровень экспрессии Foxp3 повышен по сравнению с группой контроля заболевания. А в группе «С₆₀-ЭД» было зафиксировано статистически достоверное увеличение экспрессии Foxp3.

3.6.2. Влияние фуллерена dnC60 на экспрессию филаггрина

Филаггрин является важнейшим компонентом эпидермального барьера кожи. Его присутствие, вероятно, мешает аллергенам взаимодействовать с клетками иммунной системы и аллергическая реакция не развивается. Кроме того, известно, что мутации в гене, кодирующем филаггрин, вызывают явную

склонность к развитию АД. Таким образом, по анализу уровня филаггрина можно судить о состоянии нарушенной барьерной функции кожи.

Определение уровня экспрессии филаггрина проводили методом количественного анализа ПЦР в реальном времени. Влияние фуллерена dnC_{60} на экспрессию филаггрина у мышей с АД представлено на рисунке 3.35.

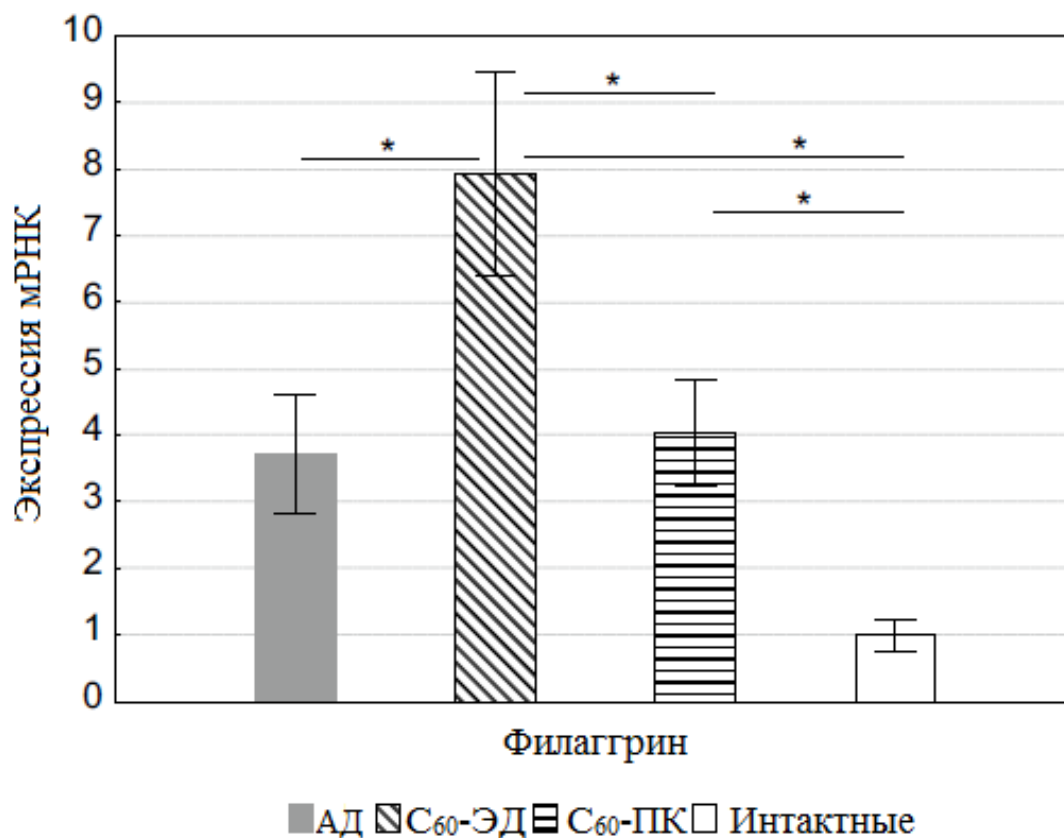


Рисунок 3.35. - Концентрация филаггрина в супернатантах стимулированных спленоцитов. * - достоверно отличается от группы «АД».

Было показано, что при ЭД введении фуллерена C_{60} уровень экспрессии филаггрина значительно увеличивался, причем зафиксированный рост являлся статистически достоверным относительно группы мышей с АД, не получавших фуллерен или получавших его подкожно. Таким образом, можно сделать вывод о том, что фуллерен dnC_{60} способен индуцировать экспрессию филаггрина и таким образом восстанавливать нарушенную барьерную функцию кожного покрова, препятствуя развитию сильной аллергической реакции.

3.6.3. Влияние водного раствора фуллерена dnC_{60} на гистологические изменения кожи у мышей с экспериментальным АД

Оценка патоморфологических изменений кожи осуществлялась по балльной системе. Были проанализированы и оценены степень утолщения эпидермиса, наличие некроза, гиперкератоза, степень пролиферации соединительно-тканых элементов дермы и подкожно-жировой клетчатки (ПЖК), а также присутствие в этих слоях некроза, отека и геморрагии. Кроме того, была проанализирована клеточная инфильтрация дермы и ПЖК на предмет наличия эозинофилов, полинуклеарных лейкоцитов, лимфоцитов и тучных клеток (таблица 3.4).

Таблица 3.4. Балльная система оценки патоморфологических изменений кожи.

№	Критерий оценки	Степень проявления	Балл
1	утолщения эпидермиса	отсутствует	0
		слабое	1
		умеренное	2
		выраженное	3
2	некроз эпидермиса	отсутствует	0
		присутствует	1
3	гиперкератоз эпидермиса	отсутствует	0
		присутствует	1
4	степень пролиферации соединительно-тканых элементов дермы	отсутствует	0
		слабое	1
		умеренное	2
		выраженное	3
5	некроз дермы	отсутствует	0
		присутствует	1
6	отек дермы	отсутствует	0
		присутствует	1
7	геморрагии дермы	отсутствует	0
		присутствует	1
8	степень пролиферации соединительно-тканых элементов ПЖК	отсутствует	0
		слабо	1
		умеренно	2
		выражено	3
9	некроз ПЖК	отсутствует	0
		присутствует	1
10	отек ПЖК	отсутствует	0
		присутствует	1

11	геморрагии ПЖК	отсутствует присутствует	0 1
12	клеточная инфильтрация дермы	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3
13	клеточная инфильтрация дермы (эозинофилы)	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3
14	клеточная инфильтрация дермы (полинуклеарные лейкоциты)	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3
15	клеточная инфильтрация дермы (лимфоциты)	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3
16	клеточная инфильтрация ПЖК	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3
17	клеточная инфильтрация ПЖК (эозинофилы)	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3
18	клеточная инфильтрация ПЖК (полинуклеарные лейкоциты)	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3
19	клеточная инфильтрация ПЖК (лимфоциты)	отсутствует слабо умеренно выражено	0 1 2 3

На основе микроскопических особенностей кожи мышей, получавших и не получавших фуллерен, был рассчитан гистологический индекс (рисунок 3.36е).

Было показано, что максимальный гистологический (воспалительный) индекс был в группе «АД» - 24 балла, а минимальный – в группе «интактные» - 4 балла. Воспалительные индексы в группах «С₆₀-ЭД» и «С₆₀-ПК» составляли 14 и 18 баллов, соответственно. Таким образом, в результате проведенного

гистологического анализа было выявлено, что введение фуллерена dnC_{60} снижает проявление признаков аллергического воспаления примерно на 42% и 25%, в группах « C_{60} -ЭД» и « C_{60} -ПК», соответственно.

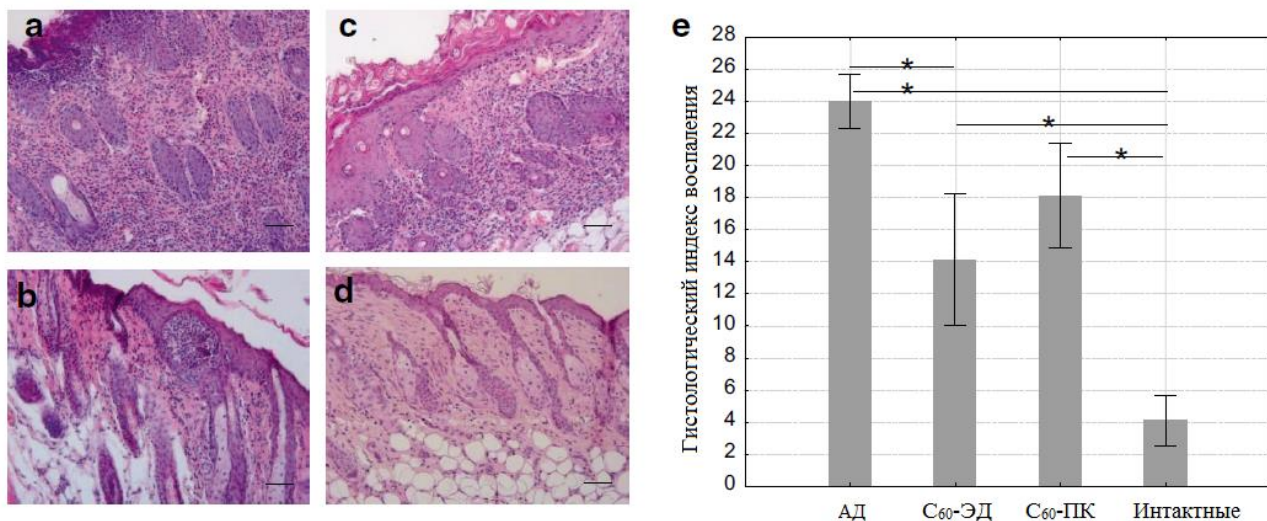


Рисунок 3.36. – Патоморфологическое исследование кожи. а – «АД», б – « C_{60} -ЭД», с – « C_{60} -ПК», d – «интактные», шкала 100 мкм. е - Гистологический индекс воспаления.

Забор кожи проводился после окончания третьего этапа сенсибилизации. Патоморфологическое исследование проводилось сотрудником ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России О. О. Камышниковым. Изучение кожи у группы мышей, в которой производилось моделирование атопического дерматита без специфического лечения, выявило изменения, характеризующие патологический процесс развития дерматита: воспалительная лейкоцитарная инфильтрация эпидермиса и дермы кожи полинуклеарными лейкоцитами, в составе которой обнаруживалось большое количество эозинофилов – специфического компонента аллергического воспаления. Также отмечалось вовлечение в патологический воспалительный процесс и подкожной жировой клетчатки. Эпидермис кожи в этой группе животных над областями дермального воспаления некротизировался вплоть до дермы, а в прилежащих областях был утолщён. Над эпидермисом образовывался струп из кератиновых масс и дегенеративно изменённых лейкоцитов. В дерме кожи помимо лейкоцитарной

инфильтрации происходила пролиферация соединительнотканых фибробластоподобных клеточных элементов, как реакция в ответ на раздражение с целью компенсации поврежденной соединительной ткани дермы. Также в дерме отмечалось развитие геморрагии деструктивного типа, которые выглядели как скопления ярко-красных эритроцитов, придатки кожи – волосяные фолликулы и сальные железы в дерме кожи часто редуцировались и исчезали. Микрокартина гистологического препарата кожи в группе мышей АД, представляющей модель atopического дерматита, показана на рисунке 3.36а.

У группы мышей «С₆₀-ПК» по сравнению с группой «АД» отмечалось уменьшение выраженности полиморфноядерной лейкоцитарной инфильтрации эпидермиса и дермы, однако эозинофильный компонент инфильтрации был сохранен. Этим микроскопическим признаком можно обозначить противовоспалительный эффект исследуемого вещества. Также наблюдалось уменьшение проявлений некроза эпидермиса и дермы кожи, утолщение эпидермиса за счёт шиповатого слоя сохранялось, в клетках базального слоя эпидермиса наблюдалось увеличение числа фигур митоза, что свидетельствует о более выраженном развитии регенерации по сравнению с группой «АД». Деструктивные геморрагии в дерме кожи в этой группе обнаруживались реже. Отмечалось умеренное развитие гиперкератоза эпидермиса, как проявление компенсаторного механизма защиты от повреждения. Пролиферация фибробластоподобных клеток соединительной ткани дермы была умеренной. Микрокартина патологических изменений в коже мышей этой группы (рисунок 3.36б) отражала развитие аллергического специфического воспаления - дерматита.

В группе животных «С₆₀-ЭД» по сравнению с группами «АД» и «С₆₀-ПК» наблюдался наиболее выраженный лечебный эффект, который характеризовался уменьшением выраженности воспалительной лейкоцитарной инфильтрации с уменьшением количества эозинофилов в составе инфильтрата. Также наблюдалось уменьшение проявлений некроза эпидермиса и дермы кожи, утолщение эпидермиса было незначительным, в клетках базального слоя эпидермиса наблюдалось увеличение числа фигур митоза, что свидетельствует о

более выраженном развитии регенерации по сравнению с группой «АД». Деструктивные геморрагии в дерме кожи в этой группе по сравнению с группой «АД» обнаруживались реже. Гиперкератоз эпидермиса был незначительным. Микрокартина гистологических препаратов кожи мышей этой группы представлена на рисунке 3.36b. Следует отметить, что накожное применение исследуемого вещества проявляло выраженный специфический противовоспалительный и антиаллергический эффект, который, по-видимому, был обусловлен преимущественным местным механизмом действия при увеличенном времени воздействия по сравнению с подкожным введением, при котором очевидно более быстрое всасывание не позволяет реализоваться лечебному эффекту.

Микроскопическая картина, представленная на рисунке 3.36d, отражает нормальное строение кожи мышей в группе контроля – интактные животные. Эпидермис тонкий, в нём хорошо различим лишь базальный, шиповатый и роговой слой. Под эпидермисом расположена дерма, состоящая из большого количества волокон плотной соединительной ткани типа коллагена с проходящими в ней сосудами и нервными волокнами, в дерме находится множество придатков кожи – волосяных фолликулов и сальных желёз. Подкожная жировая клетчатка представлена жировыми клетками с расположенными между ними сосудами и нервными волокнами. Под подкожной жировой клетчаткой находится собственный мышечный слой кожи и подлежащая рыхлая соединительная ткань. В этой группе животных не отмечалось явных признаков воспаления и некроза, лишь у единичных животных встречались очаговые лимфоцитарные инфильтраты, являющиеся, по-видимому, условной физиологической нормой мышей линии BALB/c.

Таким образом, воспалительная клеточная реакция в коже мышей, происходившая в результате сенсибилизации овальбумином, уменьшалась в группах «С₆₀-ПК» и «С₆₀-ЭД» по сравнению с группой «АД». Главным аспектом, отражающим специфический компонент воспалительной клеточной реакции, является инфильтрация эозинофилами дермы кожи, уменьшение выраженности

которой наблюдалось в группе мышей «C₆₀-ЭД», что коррелировало с уменьшением экспрессии ИЛ-5. Следует отметить, что у животных, которым проводили терапию C₆₀, по сравнению с группой «АД», наблюдалась выраженная регенерация поврежденной кожи.

В результате проведенного патогистологического анализа, можно сделать заключение о том, что при введении водной дисперсии фуллерена dnC₆₀ в условиях развития экспериментального атопического дерматита наблюдается уменьшение аллергического воспаления. Максимально выраженный положительный эффект был выявлен у животных, получавших фуллерен dnC₆₀ эпидермально. Уменьшение аллергического воспаления достигалось, по-видимому, за счет снижения активации Th2-клеток, а также, возможно, за счет наличия у фуллерена dnC₆₀ антиоксидантной активности.

4. Обсуждение результатов

4.1. Получение водорастворимого фуллерена и его производных

Ранее, в ряде предварительных исследований сотрудниками ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА России было показано, что водорастворимые формы фуллерена, например, его аддукты с простыми аминокислотами, не проявляют аллергенных свойств, и в то же время могут ингибировать IgE-опосредованную секрецию гистамина и системную анафилаксию (у мышей), вызванную введением овальбумина [Андреев и др. 2000; Babakhin et al. 2009].

Таким образом, перспективность применения таких соединений как противоаллергических средств не вызвала сомнений, об также свидетельствовали публикации зарубежных авторов, рассмотренные в литературном обзоре. Но необходимо отметить, что доступность таких водорастворимых фуллеренов очень ограничена. Хотя большая поверхность фуллерена C_{60} , с учетом хорошо разработанной его химии, позволяет легко присоединять к такой молекуле разнообразные гидрофильные адденды, создавать разветвленные кислород- и аминокислотосодержащие структуры, хорошо растворимые в воде, однако такие реакции обычно идут неоднозначно. Часто образуются продукты полиприсоединения и побочные продукты, так что выделение нужного продукта довольно трудоемко. По-видимому, по этим причинам ассортимент коммерчески доступных водорастворимых производных фуллерена представлен лишь в нескольких простых соединениях и по очень высокой цене. В этой связи был предпринят синтез собственных водорастворимых производных C_{60} , в результате чего были разработаны оригинальные схемы синтеза.

Поскольку в растворах фуллерены и их производные почти всегда образуют наночастицы (кластеры), то наличие заряда на их поверхности играет важную роль в стабилизации таких растворов (дисперсий). По этой причине был разработан синтез водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} с катионными природными аминокислотами, L-аргинином и L-лизином, а также с пиперазином, циклическим диамином. Главной проблемой синтеза аддуктов фуллерена с

гидрофильными соединениями, такими как аминокислоты, является несовместимость по растворимости компонентов реакции: фуллерен очень гидрофобен, а аминокислоты – гидрофильны. Первый для растворения требует апротонной неполярной среды (толуол), а аминокислоты - водной среды; реакции же в гетерогенных средах обычно идут долго.

Для решения этой задачи указанные аминокислоты были модифицированы в триметилсилильные (ТМС, $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$) производные, легко растворимые в апротонной среде. Для этой цели использовали легко доступный силилирующий реагент (N,O-бис(триметилсилил)-ацетамид, который все функциональные группы исходного соединения (гидроксильные, amino, карбоксильные) закрывает ТМС-группой, замещая подвижный протон. При этом реакционная способность ТМС-аминогруппы (с фуллереном) сохраняется.

В результате образуется раствор ТМС-аминокислоты в апротонном растворителе (N-метилпирролидон (МП) или диметилсульфоксид (ДМСО), который затем вводят в реакцию с раствором фуллерена в том же растворителе при комнатной температуре.

Поскольку реакция идет с доступом кислорода воздуха, одновременно происходит присоединение атома кислорода с образованием эпоксида. На этой стадии образуемый продукт находится в среде апротонного растворителя, откуда его выделяют путем разбавления водой с последующим диализом. Вода мгновенно расщепляет все связи с ТМС, заменяя ТМС опять на атомы водорода. При этом отщепляемый водой ТМС образуют гексаметилдисилоксан (ГМДС), который можно удалить или путем упаривания в вакууме (т. кип. 100°C при 760 мм рт. ст.) или экстракцией этилацетатом или серным эфиром. Все другие побочные продукты (ацетамид, аминокислоты, пептиды, аминсахара, не вступившие в реакцию) растворимы в воде и легко отделяются диализом. Раствор после диализа высушивают лиофильно, получая конечный продукт в виде сухого светло-коричневого порошка. Они умеренно растворимы при нейтральном pH и хорошо при низком pH. Очевидно при низком pH происходит протонирование

свободных аминогрупп, увеличение положительного заряда, что способствует повышению растворимости.

Тип и количество аминокислот, присоединенных к фуллерену, оказывает существенное влияние на гидродинамический размер частиц в формируемой дисперсии. Тот факт, что молекулы получаемых соединений не проходят через диализную мембрану, говорит о том, что они находятся в коллоидном (агрегированном) состоянии. Это же подтверждают и данные измерения размеров частиц в получаемых растворах. Известно, что растворы, содержащие частицы до 200 нм практически прозрачны для человеческого глаза. Данный размер характерен для белков и вирусов, и это имеет большое значение в биологическом плане, позволяя их транспорт внутрь клеток по тому или иному механизму. Этот аспект также важен и для фармацевтических препаратов, если они находятся в нанодисперсном состоянии, такая форма резко увеличивает их биодоступность.

4.2. Анализ действия фуллерена и его производных на реакцию гиперчувствительности замедленного типа

Изучение активности фуллерена и его производных в отношении реакции ГЗТ показало, что водный раствор фуллерена и его катионные аддукты с аминокислотами и пиперазином оказывают заметный ингибирующий эффект на реакцию ГЗТ. Причем его особенность заключалась в том, что наибольший эффект для препаратов C₆₀-Arg и C₆₀-Lys достигался на поздних сроках, т. е. после прохождения пика воспалительного ответа (48-72 ч), в то время как C₆₀ и C₆₀-Pip обладали значительной активностью на пике воспаления (24 ч). Принято считать, что в иммунопатогенезе ГЗТ существенную роль играет функциональная активность Th1-клеток (ФНО- α , ИФН- γ), клеток Th2-профиля (ИЛ-4 и ИЛ-5) и Th17-клеток (ИЛ-17). В работе было продемонстрировано снижение уровней ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-17, ИФН- γ и ФНО- α у животных, получавших C₆₀ и C₆₀-Pip по сравнению с модельной группой.

ГЗТ относится к IV типу аллергии по классификации P. H. G. Gell и R. Coombs, независимо от антител, и является основным механизмом защиты от

внутриклеточных патогенов [Black et al.,1999; Rajan, 2003]. В тоже время ГЗТ может быть причиной воспалительных заболеваний, в том числе гранулематозного воспаления, например, при туберкулезе, саркоидозе, контактном дерматите и псориазе. ГЗТ играет определенную роль в противоопухолевом иммунитете, в реакциях отторжения трансплантата. Развитие патологического процесса, как предполагают, обусловлено нарушением баланса между Th1- и Th2-клетками, также особый вклад в патогенез вносят клетки с фенотипом Th17, которые рекрутируют макрофаги и нейтрофилы к месту воспаления [Iwakura et al., 2008].

Модели ГЗТ на животных часто используют в качестве доклинических тестов для оценки иммуномодуляторной активности препаратов, предназначенных для лечения дерматитов. Для подавления воспалительной реакции обычно используют иммунодепрессанты, например циклоспорин, который блокирует транскрипцию ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН- γ и ИЛ-2R, тем самым ингибирует продукцию цитокинов, индуцирующих активацию и дифференцировку Т-клеток.

Запуск механизма ГЗТ инициируется поглощением аллергена антиген-презентирующими клетками (АПК) – дендритными клетками и макрофагами, где происходит процессинг аллергена на фрагменты и их комплексирование с МНС класса II с последующей презентацией наивным $CD4^+$ Т-лимфоцитам в региональном лимфоузле. Такой контакт вызывает клональную экспансию и дифференцировку наивных лимфоцитов в клетки с фенотипом $CD4^+$ -, Th1- и Th17-. Повторное взаимодействие их с макрофагами, презентующими аллерген, приводит к активации, как Т-лимфоцитов, так и макрофагов, и вызывает выброс ими шлейфа цитокинов и факторов хемотаксиса ИФН- γ , ИЛ-2, ФНО- α , GM-CSF, ИЛ-8, MIF и MCP-1/MCAF. Под влиянием аллергена и цитокинов макрофаги продуцируют в окружающую ткань литические ферменты, оксид азота, активные формы кислорода и другие биологические активные вещества. Учитывая, что фуллерены обладают исключительной способностью реагировать с АФК, именно этот фактор может играть ключевую роль в их препятствии развитию воспаления.

Так, воспаление, индуцированное форболмиристил ацетатом, ведущее к генерации АФК, эффективно тормозилось введением фуллерена, содержащим гидрофильные и гидрофобные радикалы [Dellinger et al., 2009], другие производные фуллерена способны блокировать окислительный стресс, наблюдаемый при ряде заболеваний [Sato et al., 1997, Roursgaard et al., 2008]. Недавно установлено, что водная наносuspension свободного кристаллического фуллерена способна частично подавлять ГЗТ-опосредованное воспаление (модель на мышах), при этом выявлено снижение секреции ИЛ-6 и ИЛ-17, и относительный рост популяции клеток с Treg-фенотипом [Yamashita et al., 2009]. Полученные результаты предполагают, что данная модель ГЗТ вполне применима для оценки активности модуляторов Т-клеточного иммунного ответа, а применение синтетических препаратов на основе фуллерена является перспективным направлением в терапии ГЗТ-опосредованных воспалительных заболеваний.

4.3. Оценка безопасности водной дисперсии фуллерена

Безопасность водной дисперсии фуллерена оценивали как *in vivo* в исследовании острой токсичности, так и *in vitro* в тесте на гемолитическую активность. Способность гемолизировать эритроциты крови является одним из важнейших показателей, который следует определять на ранних стадиях исследования препарата, поскольку эти исследования могут сказать о перспективности его использования, например, для в/в введений.

Анализ гемолитической активности дисперсии фуллерена dnC_{60} показал, что только очень большие концентрации dnC_{60} могут гемолизировать эритроциты. Однако степень гемолитической активности даже больших доз водной дисперсии фуллерена не является существенной. Таким образом, можно сделать вывод о том, что фуллерен dnC_{60} не обладает гемолитической активностью.

Анализ острой токсичности водного раствора фуллерена является одним из этапов оценки его биологической безопасности и перспективности его практического применения, как основы терапевтического средства. В настоящей

работе установлено, что независимо от способа введения дисперсии фуллерена токсическим эффектом она не обладает. Более того, при введении небольших доз препарата у мышей наблюдался более активный набор веса по сравнению с контрольной группой. Гистологический анализ также не выявил каких-либо патологических изменений внутренних органов, характерных для токсического поражения. Полученные данные хорошо согласуются с ранними результатами других авторов. Так, длительный эксперимент по анализу токсичности фуллерена C₆₀, проведенный на крысах показал, что фуллерен почти в два раза увеличивал продолжительность жизни крыс, а динамика изменения веса животных говорила об отсутствии явных токсических эффектов. Анализ механизмов действия с использованием экспериментальной модели интоксикации крыс четыреххлористым углеродом, показал, что влияние фуллерена на продолжительность жизни связано, по-видимому, с подавлением окислительного стресса [Baati et al., 2012]. В другой недавней публикации установлено, что водная дисперсия C₆₀, стабилизированная крахмалом, не проявляла хронической токсичности при интрагастральном введении крысам, гематологические и биохимические показатели не отличались от контроля [Hendrickson et al., 2015]. Таким образом, все больше данных свидетельствуют о биологической безопасности немодифицированной формы фуллерена.

4.4. Изучение противоаллергических эффектов водной дисперсии фуллерена dnC₆₀ на экспериментальной модели atopического дерматита

Изучение способности фуллерена dnC₆₀ подавлять аллергический ответ проводили на модели экспериментального atopического дерматита *in vivo* при накожном и подкожном введении водной дисперсии фуллерена.

Важнейшей особенностью патогенеза atopического дерматита является гиперпродукция IgE В-клетками в сыворотке крови [Гущин, 2004]. Различные исследователи однозначно предлагают определять в сыворотке крови содержание общих и специфичных к ОА иммуноглобулинов: IgE, IgG1, IgG2a [Lehto et al., 2010; Saegusa et al., 2009].

В результате проведенного исследования было выявлено, что введение фуллерена dnC_{60} приводит к снижению концентрации специфических IgE-антител в крови животных экспериментальным АД. Следует отметить, что в группах « C_{60} -ЭД» и « C_{60} -ПК», наблюдалось статистически значимое снижение уровня анти-ОА IgE по сравнению с группой «АД», что свидетельствовало о положительном влиянии терапии на иммунный ответ.

Известно, что при атопическом дерматите преобладает Th2-ответ. Поэтому важным показателем являлся индекс IgG1/IgG2a, по которому определяется наличие сдвига иммунного ответа в сторону активации Th1- или Th2-лимфоцитов. Увеличение индекса IgG1/IgG2a свидетельствует о Th2-направленности иммунного ответа на аллерген, а уменьшение – о преобладании иммунного ответа с участием Th-клеток. Было показано, что применение C_{60} сдвигает иммунный ответ от Th2- к Th1-типу, изменяя соотношения IgG1/ IgG2a в качестве маркеров для Th2- и Th1-типа иммунного ответа. Можно предположить, что это явление связано с действием dnC_{60} на окислительно-восстановительный гомеостаз. АФК и другие окислительно-восстановительные активные молекулы, выполняют ключевые функции в иммунном ответе, определяя его направленность [Gostner et al., 2013], а фуллерен, как известно способен активно взаимодействовать с АФК. В наших экспериментах было показано, что у мышей, получавших dnC_{60} эпидермально иммунный ответ сдвигался в сторону Th1-типа, что характерно при ослаблении аллергического воспаления.

Известно, что у больных атопическим дерматитом иммунный ответ на антигенное воздействие развивается по Th2-пути и сопровождается высоким уровнем ИЛ-4 и ИЛ-5. ИЛ-4 играет ключевую роль в подготовке аллергических процессов: синтез IgE, активация тучных клеток, ингибирование продукции ИФН- γ , который подавляет развитие аллергической реакции. В свою очередь, выработка ИФН γ повышается за счет ИЛ-12, который ответственен за переключение дифференцировки Th0-лимфоцитов в сторону Th1-типа. ИЛ-12 тормозит синтез IgE-антител. ИЛ-5 служит главным фактором привлечения эозинофилов. Способность эозинофилов к долгожительству и продукции в

эйзинофильных гранулах нейротоксинов (белки с антимикробной и РНК-азной активностью) и ферментов способствует переходу острой фазы заболевания в хроническую, что сопровождается сильным зудом, повреждением кератиноцитов и еще большим высвобождением цитокинов и медиаторов воспаления [Rothenberg et al., 2006]. Показано, что лимфоциты являются основным источником цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-12, ИФН- γ [Jin et al., 2009].

Проведенный анализ выработки цитокинов, вовлеченных в патогенез АД, показал, что введение фуллерена C_{60} приводило к снижению активации Th2-клеток, поскольку уровень ИЛ-4 и ИЛ-5 снижался до такового у интактных животных.

Важнейшим представителем цитокинов Th1-профиля является ИЛ-12, который играет ключевую роль при дифференцировке Т-клеток. ИЛ-12 является также доминирующим во многих воспалительных заболеваниях, в том числе при АД, стимулируя выработку ИФН- γ [Sun et al., 2015]. Было показано, что при накожном нанесении фуллерена уровень продукции ИЛ-12 увеличивался по сравнению с животными модельной группы «АД». Это свидетельствовало о смещении иммунного ответа в сторону Th1-типа, который не являлся характерным для аллергического ответа. Кроме того, в настоящем исследовании было показано, что при эпидермальном нанесении фуллерена dnC_{60} заметно повышался уровень ИФН- γ , что свидетельствовало о повышенной активации Th1-клеток.

В тоже время, в многочисленных экспериментах по изучению экспрессии цитокинов, вовлеченных в патогенез АД, установлено, что кожа также является генератором цитокинов, и их спектр аналогичен спектру цитокинов, вырабатываемому спленоцитами.

Важным фактором при АД является продукция Т-регуляторных клеток (Treg), маркерами которых служат мембранные молекулы CD4, CD25, CTLA-4 и внутриклеточный транскрипционный фактор Foxp3 [Донецкова, 2014]. Treg играют исключительно важную и разностороннюю роль в физиологии и

патологии АД, а также являются возможной мишенью для контролирования этого заболевания.

В настоящем исследовании был проведен анализ работы регуляторных Т-лимфоцитов (Т-супрессоров), которые являются центральными регуляторами иммунного ответа. Основная их роль заключается в контроле силы и продолжительности иммунного ответа путем регулирования функции Т-эффекторных клеток (Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток). Эти клетки экспрессируют транскрипционный фактор Foxp3, который регулирует транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа.

В проведенном исследовании было показано, что у животных, получавших фуллерен dnC_{60} , уровень экспрессии Foxp3 увеличивался по сравнению с группой экспериментального АД. Достоверное увеличение экспрессии Foxp3 выявлено только в группе « C_{60} -ЭД». Увеличение Foxp3 свидетельствует о повышении численности регуляторных клеток, что может вести к развитию ремиссии аллергического заболевания. Способность водного раствора фуллерена влиять на экспрессию молекулярного маркера Foxp3 может рассматриваться как ключ к пониманию механизма его терапевтического действия.

Центральным компонентом эпидермального барьера кожи является белок филаггрин. Ослабление барьерной функции кожи у пациентов с мутациями в гене филаггрина, вероятно, способствует увеличению проникновения аллергенов по трансдермальным путем и открывает путь различным антигенам из окружающей среды через кожу к иммунной системе, в результате чего, развивается иммунная реакция, характерная для атопического дерматита. Существует прямая взаимосвязь между АД и мутациями в гене, кодирующим филаггрин [Palmer et al., 2006]. Таким образом, одной из возможных терапевтических стратегий регулирования АД является повышение экспрессии филаггрина [Otsuka et al., 2014]. Об это свидетельствует тот факт, что 20% увеличение числа копий филаггрина приводит к снижению развития симптомов АД на 40% [Norton et al., 2010; Toda et al., 2003]. В настоящей работе было показано, что у мышей с

экспериментальным АД, получавших фуллерен dnC_{60} эпидермально, наблюдалось достоверное увеличение экспрессии филаггрина по сравнению с группой модельных животных. Таким образом, можно предположить, что водная дисперсия фуллерена способна восстанавливать функции кожного барьера, уменьшая степень аллергического воспаления.

Важным этапом анализа противоаллергических свойств фуллерена dnC_{60} было гистологическое исследование кожи. Основными критериями оценки в настоящей работе являлись: толщина эпидермиса и дермы, количество нормальных и дегранулированных тучных клеток, эозинофилов. Гистологический анализ показал, что положительный терапевтический эффект от введения водного раствора фуллерена был, достигнут как при эпидермальном, так и при подкожном введениях. Однако следует отметить, что при эпидермальном способе введения оказался наиболее эффективным. Так, в группе « C_{60} -ЭД» наблюдалось явное уменьшение числа эозинофилов. Уровень ИЛ-5 в указанной группе также был снижен.

Таким образом, на основании данных гистологического анализа, а также анализа продукции цитокинов можно сделать вывод, что водная дисперсия фуллерена dnC_{60} обладает противоаллергическим действием. Мы наблюдали значительное снижение уровней IgE и продукции Th2-цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-5) с сопутствующим увеличением выработки цитокинов Th1-профиля: ИЛ-12 и ИФН- γ . Однако, существенная разница в эффекте зависела от способа введения фуллерена. Более интенсивное ингибирование Th2-ответа наблюдалось при ЭД нанесении. Можно предположить, что фуллерен способен ослаблять аллергическую реакцию, активизируя Th1-клетки и подавляя Th2-тип иммунного ответа [Toda et al., 2003]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фуллерен может быть использован в качестве агента для подавления экспрессии провоспалительных цитокинов. Поскольку АД является хроническим заболеванием, по-видимому, барьерная дисфункция является основной причиной его развития. Полученные данные указывают на потенциальную возможность использования водного раствора фуллерена в качестве стимулятора экспрессии

филаггрина. Таким образом, можно предположить, что ослабление аллергического ответа при введении водной дисперсии фуллерена может происходить, например, за счет одновременного увеличения экспрессии филаггрина и Foxp3, а также, возможно, из-за наличия у фуллерена антиоксидантной активности.

Гистологический анализ образцов кожи показал, что применение водорастворимого фуллерена улучшало гистологическую картину, снижая аллергическое воспаление как при накожном, так и при подкожном введении dnC_{60} . Сложным представляется объяснить, почему накожное применение фуллерена dnC_{60} было более эффективным по сравнению с подкожным введением. По-видимому, при эпидермальном введении фуллерен более доступен для иммунных клеток кожи, поскольку она воспалена.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что использование dnC_{60} в форме накожных аппликаций является перспективной альтернативой существующим терапевтическим подходам к контролю аллергии и воспаления.

5. Заключение

Таким образом, в результате исследований получен водный раствор фуллерена, обладающий значительным противоаллергическим и противовоспалительным действием, перспективный в качестве действующего вещества для создания новых препаратов, благодаря своей безопасности и биологическим эффектам. Полученные данные об увеличении экспрессии филаггрина, основного белка эпидермального барьера кожи, после кожного нанесения водного раствора фуллерена, свидетельствуют о перспективности продолжения исследований по разработке фуллерен-содержащих средств для терапии атопического дерматита.

Выводы:

1. Разработан новый метод получения водорастворимых производных фуллерена C_{60} . Получен водный раствор фуллерена (dnC_{60}) и соединения с аминокислотами – фуллерен-аргинин (C_{60} -Arg), фуллерен-лизин (C_{60} -Lys), и пиперазином – фуллерен-пиперазин (C_{60} -Pip).
2. Показана противовоспалительная активность водного раствора фуллерена и его производных. На экспериментальной модели реакции ГЗТ установлено, что введение соединений ингибирует продукцию цитокинов Th1-, Th2- и Th17-профиля.
3. Установлена безопасность водного раствора фуллерена dnC_{60} : соединение не обладает гемолитической активностью и токсическим эффектом независимо от пути введения. Данные гистологического анализа тканей и внутренних органов животных свидетельствуют об отсутствии токсического действия dnC_{60} .
4. Водный раствор фуллерена dnC_{60} обладает выраженной противоаллергической активностью. На экспериментальной модели atopического дерматита установлено, что введение dnC_{60} подавляет продукцию IgE-антител, интерлейкинов Th2-профиля, увеличивает продукцию ИЛ-12, ИФН- γ и экспрессию фактора Foxp3 и в результате снижает проявление признаков аллергического воспаления в коже лабораторных животных.
5. На экспериментальной модели atopического дерматита показано увеличение уровня экспрессии филаггрина при эпидермальном нанесении водного раствора фуллерена, способствующее восстановлению эпидермального барьера кожи лабораторных животных.

Список использованных сокращений

АФК - активные формы кислорода

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ДМСО – диметилсульфоксид

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерфероны

МП – N-метил-пирролидон

ОА – овальбумин

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ПФ – производные фуллерена

ТМБ – тетраметилбензидин

ТМС – N,O-(бис)триметилсилилацетамид

ФНО – фактор некроза опухоли

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

Вос – трет-бутоксикарбонильная группа

CsA – циклоспорин А

Ig – иммуноглобулин

KLH – гемоцианин виноградной улитки

Список литературы

1. Андреев И. М., Романова В. С., Петрухина А. О., Андреев С. М. Аминокислотные производные фуллерена C_{60} ведут себя как липофильные ионы, проникающие через биологические мембраны // Физика твердого тела. - 2002. - Т. 44. - С. 658-660.
2. Андреев С. М., Бабахин А. А., Петрухина А. О., Романова В. С., Парнес З. Н., Петров Р. В. Иммуногенные и аллергенные свойства конъюгатов фуллерена с аминокислотами и белком // Доклады Академии наук. – 2000. – Т. 370. – №. 2.
3. Андреев С. М., Петрухина, А. О., Бабахин, А. А., Гарманова, А. В., Романова, В. С., DuBuske, L. M. О генерации антител к фуллерену C_{60} // Иммунология. – 2006. – Т. 27. – №. 6. – С. 343-348.
4. Андреев С.М., Пургина Д.Д., Башкатова Е.Н., Гаршев А.В., Маерле А.В., Хаитов М.Р. Эффективный способ получения водных нанодисперсий фуллерена C_{60} // Российские нанотехнологии. - 2014. - Т. 9. - № 7-8. - С. 24-30.
5. Безмельницын В. Н., Елецкий А. В., Окунь М. В. Фуллерены в растворах // Успехи физ. Наук. – 1998. – 168. – С.1195-1120
6. Богова А. В., Ильина Н. И., Лусс Л. В. Тенденции в изучении эпидемиологии аллергических заболеваний в России за последние 10 лет // Российский аллергологический журнал. – 2008. – №. 6. – С. 3-14.
7. Венгерович Н.Г., Тюнин М.А., Антоненкова Е.В., Коньшаков Ю.О., Болехан А.В., Зайцева О.Б., Стуков А.Н., Бояркин М.Н., Попов В.А. Биологическая активность нанобиоконпозитов фуллерена C_{60} // Иммунология. - 2012. - №12. - С. 161–177.
8. Вольпин М. Е., Парнес З. Н., Романова В. С. Аминокислотные и пептидные производные фуллерена // Изв. РАН, сер. хим. – 1998. - №5. – С.1050-1054.
9. Гущин И. С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль // М.: Фармарус принт. – 1998. – Т. 252.

10. Гушин И.С. Иммуноглобулин Е-мишень противоаллергического действия // Российский аллергологический журнал. - 2004. - №1. - С. 5 – 9.
11. Донецкова А. Д. Изучение естественных регуляторных Т-клеток и их молекулярного маркера Foxp3 в норме и при аллергии у детей: дис. – М, 2007.
12. Елецкий А. В., Смирнов Б. М. Фуллерены и структуры углерода // Успехи физических наук. – 1995. – Т. 165. – №. 9. – С. 977-1009.
13. Каркищенко Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов // Биомедицина. – 2009. - №1. – С. 5–27.
14. Левашов В. А., Ремова, А. А., В. Р. Белоусов Электронная структура линейных цепочек фуллеренов // Письма в ЖЭТФ. – 1997. - Т.65. - вып.8. - стр. 647-650
15. Меджидова М. Г., М. В. Абдуллаева, Н. Е. Федорова, В. С. Романова, А. А. Куш Противовирусная активность аминокислотных производных фуллерена при цитомегаловирусной инфекции *in vitro* // Антибиотики и химиотерапия. - 2004 . - Т. 49 . - № 8-9 . - С. 13-20.
16. Мчедлов-Петросян Н. О. Растворы фуллерена C₆₀: коллоидный аспект // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2010. - Т. 1. - №1. – С.19-37.
17. Нуретдинов И.А., Губская В.П., Sorvaја С., Губайдуллин А.Т., Коновалова Н.П. Квантовые и биологические свойства нитроксидных метанофуллеренов // Наночастицы в конденсированных средах: сборник научных статей. – 2008. - с. 225-230.
18. Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П., Шаталов О.А., Свистунов А.А., Наполов Ю.К., Чехонин В.П. Производные фуллерена как модуляторы процессов клеточной пролиферации и апоптоза // Новые направления медицинской науки. Онкогематология. – 2012. - №4. - стр. 7 – 10
19. Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П., Шаталов О.А., Наполов Ю.К., Свистунов А.А., Чехонин В.П. Фуллерены и апоптоз // Новые направления медицинской науки. Онкогематология. – 2013. - №1. - С. 65-71

- 20.Пиотровский Л.Б. и др. Влияние комплексов фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном на репродукцию вирусов гриппа // Вопросы вирусологии. - 2001. - №3. - С. 38-42.
- 21.Пиотровский Л.Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ // Российские нанотехнологии. – 2007. – Т. 2. – №. 7-8. – С. 6-18
- 22.Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М., Думпис М.А., Киселев О.И. Механизмы биологического действия фуллеренов — зависимость от агрегатного состояния // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. - Т. 7. -№2. - с. 1548-1554
- 23.Резников В. А., Полеховский Ю. С. Аморфный шунгитовый углерод— естественная среда образования фуллеренов //Письма в ЖТФ. – 2000. – Т. 26. – №. 15. – С. 94-102.
- 24.Романова В. С., Цыряпкин В. А., Ляховецкий Ю. А., Парнес З. Н., Вольпин М. Е. Присоединение аминокислот и дипептидов к фуллерену C_{60} с образованием моноаддуктов // Изв. РАН. сер.хим. – 1994. – С.1154-1155.
- 25.Сидоров Л.Н., Юровская М.А. и др. Фуллерены: учебное пособие, Москва: Экзамен. - 2005. - 690 с.
- 26.Сыренский А. В., Галагудза М. М., Егорова Е. И. Предпосылки к изучению сердечно-сосудистых эффектов производных фуллерена (литературный обзор). //Артериальная гипертензия. – 2004. – Т. 10. – №. 3.
- 27.Третьякова Е. А., Олейник Г. А. Фармацевтическая организация как бизнес-система //Фармация. – 2006. – №. 2. – С. 17-19
- 28.Фалынскова И.Н., Ионова К.С., Дедова А.В., Ленева И.А., Махмудова Н.Р., Раснецов Л.Д. Противовирусное действие гидрата фуллерен(трис-аминокапроновой кислоты) в культуре клеток HEp-2 в отношении респираторно-синцитиального вируса // Химико-фармацевтический журнал. - 2014. - №2. - С.17-20
- 29.Хаитов Р. М. Аллергология и иммунология: нац. рук. // М.: ГЭОТАР-МЕД. - 2009. – 649 с.

30. Хаитов Р. М., Ильина Н. И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство // М.: Гэотар-Медиа. – 2009. – Т. 656.
31. Целуйкин В. Н., Канафьева О. А., Неверная О. Г. О водных дисперсиях фуллерена C_{60} // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2012. - Т. 14. - № 3. - С. 390—392
32. Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Камышников О.Ю., Башкатов Е.Н., Елисютина О.Г., Хаитов М.Р. Разработка модели атопического дерматита *in vivo* // Физиология и патология иммунной системы. - 2011. - Т. 15. - № 8. - С. 3-10.5
33. Шипелин В.А., Арианова Е.А., Трушина Э.Н., Авреньева Л.И., Батищева С.Ю., Черкашин А.В., Сото С.Х., Лашнева Н.В., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллерена C_{60} при его введении в желудочно-кишечный тракт крыс // Гигиена и санитария. - 2012а. - № 2. - С. 90–94.
34. Шипелин В.А., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Селифанов А.В., Сото С.Х., Мальцев Г.Ю., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Характеристика пероральной токсичности фуллерена C_{60} для крыс в 92-дневном эксперименте // Вопросы питания. - 2012б. - Т. 81. - № 5. - С. 20–27.
35. Ширинкин С. В., Волкова Т. О., Немова Н. Н. Медицинские нанотехнологии. Перспективы использования фуллеренов в терапии болезней органов дыхания // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. - 2009. - 183 с.
36. Юровская М. А.. Методы получения производных фуллерена C_{60} // Химия. – 2000. – Т. 6. – №. 5. – С. 26-30.
37. Andrievsky G., Klochkov V., Derevyanchenko L. Is the C_{60} fullerene molecule toxic?! // Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures. – 2005. – Т. 13. – №. 4. – С. 363-376.
38. Andreev I., Petrukhina A., Garmanova A., Andreev S., Romanova V., Troshin P., Troshina O., DuBuske L. Penetration of fullerene C_{60} derivatives through

- biological membranes //Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nonstructures. – 2008. – T. 16. – №. 2. – С. 89-102.
- 39.Andreichenko K. S. et al. Effect of fullerene C₆₀ on ATPase activity and superprecipitation of skeletal muscle actomyosin //Український біохімічний журнал. – 2013. – №. 85. - № 2. – С. 20-26.
- 40.Aschberger K., Johnston H. J., Stone V. et al. Review of fullerene toxicity and exposure–appraisal of a human health risk assessment, based on open literature //Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2010. – T. 58. – №. 3. – С. 455-473.
- 41.Baati T., Bourasset F., Gharbi N. et al. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene //Biomaterials. – 2012. – T. 33. – №. 19. – С. 4936-4946.
- 42.Babakhin A. A., Andrievsky G., DuBuske L. M. Inhibition of systemic and passive cutaneous anaphylaxis by water-soluble fullerene C₆₀ //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2009. – T. 123. – №. 2. – С. S118.
- 43.Bagchi M., Moriyama H., Shahidi F. Bio-nanotechnology: a revolution in food, biomedical and health sciences. – John Wiley & Sons, 2012.
- 44.Baker G.L., Gupta A., Clark M.L. et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C₆₀ fullerene nanoparticles and microparticles //Toxicological sciences. – 2008. – T. 101. – №. 1. – С. 122-131.
- 45.Bakry R., Vallant R. M., Najam-ul-Haq M et al. Medicinal applications of fullerenes //International journal of nanomedicine. – 2007. – T. 2. – №. 4. – С. 639–649
- 46.Belgorodsky B., Fadeev L., Ittah V. et al. Formation and characterization of stable human serum albumin-tris-malonic acid [C₆₀] fullerene complex //Bioconjugate chemistry. – 2005. – T. 16. – №. 5. – С. 1058-1062.
- 47.Bieber T. Atopic Dermatitis // N. Engl. J. Med. - 2008. - Vol. 358. - P. 1483-1494.

48. Bisaglia M., Natalini B., Pellicciari R., et al. C₃-fullerene-tris-methanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis // *Journal of neurochemistry*. – 2000. – T. 74. – №. 3. – C. 1197-1204.
49. Black C.A. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. // *Dermatol. Online J.* – 1999. – Vol. 5. – P.1-7
50. Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications // *European journal of medicinal chemistry*. – 2003. – T. 38. – №. 11. – C. 913-923.
51. Bosi S., Feruglio L., Da Ros T. et al. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives // *Journal of medicinal chemistry*. – 2004. – T. 47. – №. 27. – C. 6711-6715.
52. Bensasson R. V. et al. C₆₀ in model biological systems. A visible-UV absorption study of solvent-dependent parameters and solute aggregation // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1994. – T. 98. – №. 13. – C. 3492-3500.
53. Bunz H., Plankenhorn S., Klein R. Effect of buckminsterfullerenes on cells of the innate and adaptive immune system: an in vitro study with human peripheral blood mononuclear cells // *International journal of nanomedicine*. – 2012. – T. 7. – C. 4571-4580.
54. Buseck P. R. Geological fullerenes: review and analysis // *Earth and Planetary Science Letters*. – 2002. – T. 203. – №. 3. – C. 781-792.
55. Chen B. X., Wilson S. R., Das M. et al. Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – T. 95. – №. 18. – C. 10809-10813.
56. Chen C., Xing G., Wang J. et al. Multihydroxylated [Gd@C₈₂(OH)₂₂] n nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity // *Nano letters*. – 2005. – T. 5. – №. 10. – C. 2050-2057.
57. Chen K.L., Smith B.A., Ball W.P., Fairbrother D.H. Assessing the colloidal properties of engineering nanoparticles in water: case studies from fullerene C₆₀ nanoparticles and carbon nanotubes // *Environ. Chem.* – 2010. – V. 7. – P. 10–27

58. Chen Y. W., Hwang K. C., Yen C., and Lai Y. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2004. – T. 287. – №. 1. – C. R21-R26.
59. Chen Z., Ma L., Liu Y., Chen C. Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics // *Theranostics*. – 2012. – T. 2. – №. 3. – C. 238-250.
60. Chueh S. C., Lai M. K., Lee M. S. et al. Decrease of free radical level in organ perfusate by a novel water-soluble carbon-sixty, hexa (sulfobutyl) fullerenes // *Transplantation proceedings*. – Elsevier, 1999. – T. 31. – №. 5. – C. 1976-1977.
61. Costa C.L.A., Chaves I.S., Ventura-Lima J. et al. In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2012. – T. 155. – №. 2. – C. 206-212.
62. Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Biological applications of fullerene derivatives: a brief overview // *Croatica Chemica Acta*. – 2001. – T. 74. – №. 4. – C. 743-755.
63. David W. I. F. et al. Crystal structure and bonding of ordered C₆₀ // *Nature*. – 1991. – T. 353. – №. 6340. – C. 147-149.
64. Deguchi S., Mukai S.-a., Yamazaki T. и др. Nanoparticles of fullerene C₆₀ from engineering of antiquity // *J. Phys. Chem. C*. – 2010. – V. 114, N 2. – P. 849–856.
65. De Maria P., Fontana A., Gasbarri C., Velluto D. Effects of fullerene guests on the stability of 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine liposomes // *Soft Matter*. – 2006. – T. 2. – №. 7. – C. 595-602.
66. Dellinger A., Zhou Z., Lenk R. et al. Fullerene nanomaterials inhibit phorbol myristate acetate-induced inflammation. // *Experimental dermatology*. – 2009. – T. 18. – №. 12. – C. 1079-1081.
67. Deryabin D. G et al. The activity of [60] fullerene derivatives bearing amine and carboxylic solubilizing groups against *Escherichia coli*: a comparative study // *Journal of Nanomaterials*. – 2014. – T. 2014. – P. 2.
68. Diederich. F. Covalent fullerene chemistry // *Pure and applied chemistry*. – 1997. – T. 69. – №. 3. – C. 395-400.

69. Dugan L. L. et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 17. – C. 9434-9439.
70. Dugan L. L. et al. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders //Parkinsonism & Related Disorders. – 2001. – T. 7. – №. 3. – C. 243-246.
71. Evans A. et al. Solid-phase C₆₀ in the peculiar binary XX Oph? //Monthly Notices of the Royal Astronomical Society: Letters. – 2012. – T. 421. – №. 1. – C. L92-L96.
72. Fedorova N. E. et al. Carboxylic Fullerene C₆₀ Derivatives: Efficient Microbicides Against Herpes Simplex Virus And Cytomegalovirus Infections In Vitro //Mendeleev Communications. – 2012. – T. 22. – №. 5. – C. 254-256.
73. Foley S, Crowley C, Smaih M, et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative //Biochemical and biophysical research communications. – 2002. – T. 294. – №. 1. – C. 116-119.
74. Ganser-Pornillos B. K., Yeager M., Sundquist W. I. The structural biology of HIV assembly //Current opinion in structural biology. – 2008. – T. 18. – №. 2. – C. 203-217.
75. Gao J., Wang H.L., Shreve A., Iyer R. Fullerene derivatives induce premature senescence: A new toxicity paradigm or novel biomedical applications //Toxicology and applied pharmacology. – 2010. – T. 244. – №. 2. – C. 130-143.
76. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M et al. [60] fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity //Nano Letters. – 2005. – T. 5. – №. 12. – C. 2578-2585.
77. Giust, D., Da Ros, T., Martín, M., & Albasanz, J. L. [60] Fullerene derivative modulates adenosine and metabotropic glutamate receptors gene expression: a possible protective effect against hypoxia //Journal of nanobiotechnology. – 2014. – T. 12. – №. 1. – C. 1.
78. Guskova O. A., Varanasi S. R., Sommer J. U. C₆₀-dyad aggregates: Self-organized structures in aqueous solutions //The Journal of chemical physics. – 2014. – T. 141. – №. 14. – C. 144303.

79. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system //Free radicals in the brain. – Springer Berlin Heidelberg. - 1992. – C. 21-40.
80. Hendrickson O. D., Zherdev A. V., I. V. Gmshinskii, and B. B. Dzantiev Fullerenes: in vivo studies of biodistribution, toxicity, and biological action //Nanotechnologies in Russia. – 2014. – T. 9. – №. 11-12. – C. 601-617.
81. Hendrickson O. D., Morozova O. V., Zherdev A.V. et al. Study of distribution and biological effects of fullerene C₆₀ after single and multiple intragastrical administrations to rats //Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2015. – T. 23. – №. 7. – C. 658-668.
82. Hirsch A., Li Q., Wudl F. Globe-trotting Hydrogens on the Surface of the Fullerene Compound C₆₀H₆(N(CH₂CH₂)₂O)₆ //Angewandte Chemie International Edition in English. – 1991. – T. 30. – №. 10. – C. 1309-1310.
83. Horie M., Nishio K., Kato H. et al. In vitro evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C₆₀ medium dispersion //Journal of biochemistry. – 2010. – T. 148. – №. 3. – C. 289-298.
84. Hu Z., Guan W., Wang W. et al. Protective effect of a novel cystine C₆₀ derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells //Chemico-biological interactions. – 2007. – T. 167. – №. 2. – C. 135-144.
85. Hu Z., Zhang C., Huang Y. S. et al. Photodynamic anticancer activities of water-soluble C₆₀ derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line //Chemico-biological interactions. – 2012. – T. 195. – №. 1. – C. 86-94.
86. Huy P. D. Q., Li M. S. Binding of fullerenes to amyloid beta fibrils: size matters //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2014. – T. 16. – №. 37. – C. 20030-20040.
87. Ilinskaya A. N., Dobrovolskaia M. A. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials //British journal of pharmacology. – 2014. – T. 171. – №. 17. – C. 3988-4000.

88. Iwakura Y., Nakae S., Saijo S., Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. // *Immunol. Rev.* – 2008. – Vol. 226, №1. – P. 57-79
89. Iwashita A., Matsuo Y., Nakamura E. AlCl₃-Mediated Mono-, Di-, and Trihydroarylation of [60] Fullerene // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2007. – T. 46. – №. 19. – C. 3513-3516.
90. Izquierdo M., Osuna S., Filippone S. et al. Regioselective Intramolecular Nucleophilic Addition of Alcohols to C₆₀: One-Step Formation of a cis-1 Bicyclic-Fused Fullerene // *The Journal of organic chemistry.* – 2009. – T. 74. – №. 16. – C. 6253-6259.
91. Jensen A. W., Wilson S. R., Schuster D. I. Biological applications of fullerenes // *Bioorganic & medicinal chemistry.* – 1996. – T. 4. – №. 6. – C. 767-779.
92. Ji H., Li X. K. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis // *Oxidative medicine and cellular longevity.* – 2016. – T. 2016
93. Jia G. et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene // *Environmental science & technology.* – 2005. – T. 39. – №. 5. – C. 1378-1383.
94. Jia J. et al. Fused five-membered rings determine the stability of C₆₀F₆₀ // *Journal of the American Chemical Society.* – 2008. – T. 130. – №. 12. – C. 3985-3988.
95. Jiang G., Li G. Preparation, characterization, and properties of fullerene–vinylpyrrolidone copolymers // *Biotechnology progress.* – 2012. – T. 28. – №. 1. – P. 215-222.
96. Jiang, G., Yin, F., Duan, J., & Li, G. Synthesis and properties of novel water-soluble fullerene–glycine derivatives as new materials for cancer therapy // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* – 2015. – T. 26. – №. 1. – P. 1-7.
97. Jiao Q., Li L., Mu Q., Zhang Q. Immunomodulation of nanoparticles in nanomedicine applications // *BioMed research international.* – 2014. – T. 2014.

98. Jiao F. et al. Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fulleranol in a mouse breast cancer model //Carbon. – 2010. – T. 48. – №. 8. – C. 2231-2243.
99. Jin H. et al. Toll-like receptor 2 is important for the T H 1 response to cutaneous sensitization //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2009. – T. 123. – №. 4. – C. 875-882. e1.
100. Jovanovic B., Anastasova L., Rowe E.W., and Palic D., Hydroxylated fullerenes inhibit neutrophil function in fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820) //Aquatic Toxicology. – 2011. – T. 101. – №. 2. – C. 474-482.
101. Jung H., Wang C. U., Jang W. Nano- C_{60} and hydroxylated C_{60} : Their impacts on the environment //Toxicology and Environmental Health Sciences. – 2009. – T. 1. – №. 2. – C. 132-139.
102. Käsermann F., Kempf C. Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses //Reviews in Medical Virology. – 1998. – T. 8. – №. 3. – C. 143-151.
103. Kokubo K. et al. Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups //ACS nano. – 2008. – T. 2. – №. 2. – C. 327-333.
104. Khaitov M. R., Luss L. V., Ilyna N. I., Khaitov R. M. Global Atlas of Allergy // Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology – 2014. – I.17 – pp.374-376
105. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives //Bio-Applications of Nanoparticles. – Springer New York, 2007. – C. 168-180.
106. Kornev A. B. et al. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60] fullerene using chlorofullerene $C_{60}Cl_6$ as a precursor //Chemical Communications. – 2012. – T. 48. – №. 44. – C. 5461-5463.
107. Kotelnikova R. A. et al. Influence of water-soluble derivatives of [60] fullerene on therapeutically important targets related to neurodegenerative diseases //MedChemComm. – 2014. – T. 5. – №. 11. – C. 1664-1668.
108. Kotelnikova R. A., Kotelnikov A. I., Bogdanov G. N., Romanova V. S., Kuleshova E. F., Parnes Z. N., Volpin M. E. Memranotropic properties of the

- water-soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene C₆₀ //FEBS letters. – 1996. – T. 389. – №. 2. – C. 111-114.
109. Kotelnikova R. A. et al Features of the effect C₆₀ amino acid derivatives on the structure and functions of biomembranes // Mol. Mat. — 1998. - Vol. 11. - P. 111-116.
110. Krustic P. J., Wasserman E., Keizer P. N. и др. Radical reactions of C₆₀ // Science. -1991. - Vol. 254. - P.1183–1185.
111. Kurz A., Halliwell C.M., Davis J.J., Hill H.A.O., Canters G.W. A fullerene-modified protein //Chemical Communications. – 1998. – №. 3. – C.433-434.
112. Kwag D.S., Park K., Oh K.T., Lee E.S. Hyaluronated fullerenes with photoluminescent and antitumoral activity //Chemical communications. – 2013. – T. 49. – №. 3. – C. 282-284.
113. Kyzyma E. A. et al. Structure and toxicity of aqueous fullerene C₆₀ solutions //Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2015. – T. 9. – №. 1. – C. 1-5.
114. Lagally C. D., Reynolds C. C. O., A. P. Grieshop, M. Kandlikar, and S. N. Rogak. Carbon Nanotube and Fullerene Emissions from Spark-Ignited Engines // Aerosol Science and Technology. – 2012. – T.46. – №. 2. – C. 156-164.
115. Lehto M. et al. A murine model of epicutaneous protein sensitization is useful to study efficacies of topical drugs in atopic dermatitis //International immunopharmacology. – 2010. – T. 10. – №. 4. – C. 377-384.
116. Li F. B., Wang G. W. Fullerenes //Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. – 1993.
117. Li W. et al. The translocation of fullerene nanoparticles into lysosome via the pathway of clathrin-mediated endocytosis //Nanotechnology. – 2008. – T.19. – №. 14. – C. 145102.
118. Li Y. J. et al. Cycloaddition reactions of hydrofullerenes with cyano-substituted alkenes under basic conditions //New journal of chemistry. – 2004. – T.28. – №.8. – C. 1043-1047.

119. Lin A. M. Y. et al. Carboxyfullerene prevents iron-induced oxidative stress in rat brain //Journal of neurochemistry. – 1999. – T.72. – №. 4. – C. 1634-1640.
120. Lin A. M. Y. et al. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain //Neuroscience research. – 2002. – T. 43. – №. 4. – C. 317-321.
121. Lin, Y. L., Lei, H. Y., Wen, Y. Y., Luh, T. Y., Chou, C. K., & Liu, H. S. Light-independent inactivation of dengue-2 virus by carboxyfullerene C3 isomer //Virology. – 2000. – T. 275. – №. 2. – C. 258-262.
122. Liu H, Yang X, Zhang Y, Dighe A, Li X, Cui Q. Fullerol antagonizes dexamethasone-induced oxidative stress and adipogenesis while enhancing osteogenesis in a cloned bone marrow mesenchymal stem cell //Journal of Orthopaedic Research. – 2012. – T. 30. – №. 7. – C. 1051-1057.
123. Lotharius J., Dugan L. L., O'malley K. L. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons //The Journal of neuroscience. – 1999. – T. 19. – №. 4. – C. 1284-1293.
124. Lucafò M. et al. Profiling the molecular mechanism of fullerene cytotoxicity on tumor cells by RNA-seq //Toxicology. – 2013. – T. 314. – №. 1. – C. 183-192.
125. Luczkowiak J. et al. Glycofullerenes inhibit viral infection //Biomacromolecules. – 2013. – T. 14. – №. 2. – C. 431-437.
126. Magoulas G. E. et al. Synthesis and Evaluation of Anticancer Activity in Cells of Novel Stoichiometric Pegylated Fullerene-Doxorubicin Conjugates //Pharmaceutical research. – 2015. – T. 32. – №. 5. – C. 1676-1693.
127. Magoulas G. E. et al. Synthesis and antioxidative/anti-inflammatory activity of novel fullerene–polyamine conjugates //Tetrahedron. – 2012. – T. 68. – №. 35. – C. 7041-7049.
128. Martín N. et al. Retro-Cycloaddition Reaction of Pyrrolidinofullerenes //Angewandte Chemie. – 2006. – T. 118. – №. 1. – C. 116-120.
129. Mashino T. et al. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2005. – T. 15. – №. 4. – C. 1107-1109.

130. Miao Y. et al. Nanoparticle as signaling protein mimic: robust structural and functional modulation of CaMKII upon specific binding to fullerene C₆₀ nanocrystals //ACS nano. – 2014. – T. 8. – №. 6. – C. 6131-6144.
131. Mchedlov-Petrosyan N. O. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry //Chemical reviews. – 2013. – T. 113. – №. 7. – C. 5149-5193.
132. Monti, D., Moretti, L., Salvioli, S. et al. C₆₀ carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2000. – T. 277. – №. 3. – C. 711-717.
133. Moussa F., Chretien P., Dubois P et al. The influence of C₆₀ powders on cultured human leukocytes // Full. Sci. Technol. - 1995. - V. 3. - P. 333-342.
134. Moussa F., Trivin F., Ceolin R. et al. Early effects of C₆₀ Administration in Swiss Mice: A Preliminary Account for In Vivo C₆₀ Toxicity //Fullerene Science & Technology. – 1996. – T. 4. – №. 1. – C. 21-29.
135. Murdianti B.S., Damron J.T., Hilburn M.E. et al. C₆₀ oxide as a key component of aqueous C₆₀ colloidal suspensions //Environmental science & technology. – 2012. – T. 46. – №. 14. – C. 7446-7453.
136. Nierengarten I., Nierengarten J. F. Fullerene sugar balls: a new class of biologically active fullerene derivatives //Chemistry–An Asian Journal. – 2014. – T. 9. – №. 6. – C. 1436-1444.
137. Nishimura T., Kubota R., Tahara M. et al. Biological effects of fullerene C₆₀ in mouse embryonic stem cells //Toxicology Letters. – 2006. – T. 164. – C. S214.
138. Norton S. K. et al. A new class of human mast cell and peripheral blood basophil stabilizers that differentially control allergic mediator release //Clinical and translational science. – 2010. – T. 3. – №. 4. – C. 158-169.
139. Otsuka A. et al. Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2014. – T. 133. – №. 1. – C. 139-146. e10.

140. Palmer C. N. A. et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis //Nature genetics. – 2006. – T. 38. – №. 4. – C. 441-446.
141. Patel M.B. , Harikrishnan U., Valand N.N. et al. Novel Cationic Quinazolin-4 (3H)-one Conjugated Fullerene Nanoparticles as Antimycobacterial and Antimicrobial Agents //Archiv der Pharmazie. – 2013. – T. 346. – №. 3. – C. 210-220.
142. Park E.-J., Kim H., Kim Y., Yi J., Choi K., and Park K., Carbon fullerenes (C₆₀s) can induce inflammatory responses in the lung of mice //Toxicology and applied pharmacology. – 2010. – T. 244. – №. 2. – C. 226-233.
143. Deng J. P., Mou C. Y., Han C. C. Oxidation of fullerenes by ozone //Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures. – 1997. – T. 5. – №. 7. – C. 1325-1336.
144. Pinneo M. Diamond growth: today and tomorrow //Proceedings of the first general conference on Nanotechnology: development, applications, and opportunities: development, applications, and opportunities. – John Wiley & Sons, Inc., 1995. – P. 147-172.
145. Podolski I. Y. et al. Effects of Hydrated Forms of C₆₀ Fullerene on Amyloid-Peptide Fibrillization In Vitro and Performance of the Cognitive Task //Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2007. – T. 7. – №. 4-5. – C. 1479-1485.
146. Prylutsky Y. I., Buchelnikov A. S., Voronin D. P. et al. C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2013. – T. 15. – №. 23. – C. 9351-9360.
147. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Klymenko P. P. et al. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy //Cancer nanotechnology. – 2011. – T. 2. – №. 1-6. – C. 105-110.
148. Prylutska S. V., Matyshevska O. P., Golub A. A. et al. Study of C₆₀ fullerenes and C₆₀-containing composites cytotoxicity in vitro //Materials Science and Engineering: C. – 2007. – T. 27. – №. 5. – C. 1121-1124.

149. Radic S., Nedumpully-Govindan P., Chen R. et al. Effect of fullerene surface chemistry on nanoparticle binding-induced protein misfolding //Nanoscale. – 2014. – T. 6. – №. 14. – C. 8340-8349.
150. Rajagopalan P., Wudl F., Schinazi R.F., Boudinot F.D. Pharmacokinetics of a water-soluble fullerene in rats //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1996. – T. 40. – №. 10. – C. 2262-2265.
151. Rajan T.V. The Gell – Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation // Trends in Immunology. – 2003. – Vol. 24. – P.376-379.
152. Rothenberg M. E., Hogan S. P. The eosinophil //Immunology. – 2006. – T. 24. – №. 1. – C. 147.
153. Roursgaard M., Poulsen S.S., Kepley C. L. et al. Polyhydroxylated C₆₀ fullerene attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. //Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2008. – Vol.103, №4. – P.386-388
154. Ruoff R. S., Tse D. S., Malhotra R., Lorents D. C. Solubility of fullerene (C₆₀) in a variety of solvents //The Journal of Physical Chemistry. – 1993. – T. 97. – №. 13. – C. 3379-3383.
155. Ryan J. J., Bateman H. R., Stover A. et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response //The Journal of immunology. – 2007. – T. 179. – №. 1. – C. 665-672.
156. Saegusa J. et al. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis //The American journal of pathology. – 2009. – T. 174. – №. 3. – C. 922-931.
157. Santos S.M., Dinis A.M., Peixoto F., Ferreira L., Jurado A.S., Videira R.A. Interaction of fullerene nanoparticles with biomembranes: from the partition in lipid membranes to effects on mitochondrial bioenergetics //toxicological sciences. – 2014. – V.138. - №1. – p. 117-129.
158. Satoh M., Matsuo K., Kiriya H. et al. Inhibitory effect of a fullerene derivative, monomalonate C₆₀, on nitric oxide-dependent relaxation of aortic smooth muscle // Gen. Pharmacol. – 1997. – Vol. 29, N 3. – P. 345-351.

159. Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C₆₀ water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles //Nano letters. – 2007. – Т. 7. – №. 8. – С. 2399-2406.
160. Schur D. V., Matysina Z. A., Zaginaichenko S. Y., Botsva N. P., Elina O. V. Fullerenes: prospects of using in medicine, biology and ecology //Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology. – 2012. – Т. 20. – №. 1. – С. 139-145.
161. Scrivens W. A., Tour, J. M., Creek, K. E., Pirisi L. Synthesis of C¹⁴-labeled C₆₀, its suspension in water, and its uptake by human keratinocytes //Journal of the American Chemical Society. – 1994. – Т. 116. – № 10. – С. 4517-4518.
162. Semenov K.N., Charykov N.A., Keskinov V.A. и др. Solubility of light fullerenes in organic solvents // //Journal of Chemical & Engineering Data. – 2010. – V. 55. - №1. – P. 13–36.
163. Shi J. et al. PEI-derivatized fullerene drug delivery using folate as a homing device targeting to tumor //Biomaterials. – 2013. – Т. 34. – № 1. – С. 251-261.
164. Sijbesma, R.; Srdanov, G.; Wudl, F. et al. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes //Journal of the American Chemical Society. – 1993. – Т. 115. – № 15. – С. 6510-6512.
165. Singh S. B., Singh A. The Third Allotrope of Carbon: Fullerene an Update // Int.J.ChemTech Res. – 2013. – V.5. - №1. - P.167-171
166. Skamrova G.B., Laponogov I., Buchelnikov A.S. et al. Interceptor effect of C₆₀ fullerene on the in vitro action of aromatic drug molecules //European Biophysics Journal. – 2014. – Т. 43. – № 6-7. – С. 265-276.
167. Slater T. F., Cheeseman K. H., Ingold K. U. et al. Carbon Tetrachloride Toxicity as a Model for Studying Free-Radical Mediated Liver Injury [and Discussion] //Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences. – 1985. – Т. 311. – № 1152. – С. 633-645.
168. Stasheuski A. S., Galievsky V. A., Stupak A. P. et al. Photophysical Properties and Singlet Oxygen Generation Efficiencies of Water-Soluble Fullerene

- Nanoparticles //Photochemistry and photobiology. – 2014. – T. 90. – №5. – C. 997-1003.
169. Straface E., Natalini B., Monti D. Et al C3-Fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability //FEBS letters. – 1999. – T. 454. – №3. – C. 335-340.
170. Talyzin, A. V., Tsybin, Y. O., Purcell, J. M. et al. Reaction of hydrogen gas with C₆₀ at elevated pressure and temperature: Hydrogenation and cage fragmentation //The Journal of Physical Chemistry A. – 2006. – T. 110. – №27. – C. 8528-8534.
171. Tanimoto, S., Sakai, S., Kudo, E. et al. Target-Selective Photodegradation of HIV-1 Protease and Inhibition of HIV-1 Replication in Living Cells by Designed Fullerene–Sugar Hybrids //Chemistry–An Asian Journal. – 2012. – V.7. – № 5. – C. 911-914.
172. Tkach V., Yanamala N., Stanley S. et al. Graphene oxide, but not fullerenes, targets immunoproteasomes and suppresses antigen presentation by dendritic cells //Small. – 2013. – T. 9. – № 9-10. – C. 1686-1690.
173. Toda, M., Leung, D. Y., Molet, S. et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2003. – T. 111. – № 4. – C. 875-881.
174. Troshina O. A., Troshin P. A., Peregudov A.S. et al. Chlorofullerene C₆₀Cl₆: a precursor for straightforward preparation of highly water-soluble polycarboxylic fullerene derivatives active against HIV //Organic & biomolecular chemistry. – 2007. – T. 5. – № 17. – C. 2783-2791.
175. Trpkovic A., Todorovic-Markovic B., Kleut D. et al. Oxidative stress-mediated hemolytic activity of solvent exchange-prepared fullerene (C₆₀) nanoparticles //Nanotechnology. – 2010. – T. 21. – № 37. – C. 375102.
176. Trpkovic A., Todorovic-Markovic B., Trajkovic V. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress //Archives of toxicology. – 2012. – T. 86. – №. 12. – C. 1809-1827.

177. Tsai M. C., Chen Y. H., Chiang L. Y. Polyhydroxylated C₆₀, Fullerenol, a Novel Free-radical Trapper, Prevented Hydrogen Peroxide and Cumene Hydroperoxide-elicited Changes in Rat Hippocampus In vitro //Journal of pharmacy and pharmacology. – 1997. – T. 49. – №. 4. – C. 438-445.
178. Tsao N., Luh T., Chou C., Wu J., Lin Y., and Lei H. Inhibition of group A streptococcus infection by carboxyfullerene //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – T. 45. – №. 6. – C. 1788-1793.
179. Tsao, N., Luh, T. Y., Chou, C. K., Chang, T. Y., Wu, J. J., Liu, C. C., & Lei, H. Y. In vitro action of carboxyfullerene //J. Antimicrobial Chemother. - 2002. - Vol. 49. - P. 641-649.
180. Ueng, T.H., Kang, J.J., Wang, H.W. et al. Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerenol, a polyhydroxylated fullerene C₆₀ //Toxicology letters. – 1997. – T. 93. – №. 1. – P. 29-37.
181. Vileno, B., Sienkiewicz, A., Lekka, M., Kulik, A. J., & Forró, L. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C₆₀ //Carbon. – 2004. – T. 42. – №. 5. – P. 1195-1198.
182. Wang I. C. et al. C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation //Journal of medicinal chemistry. – 1999. – T. 42. – №. 22. – P. 4614-4620.
183. Whitaker, J. New Method of Selective Electrophilic Addition to Trifluoromethyl Fullerenes // The Electrochemical Society Interface. – 2011. - P.67.
184. Xiao L., Takada H., Maeda K. et al. Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes //Biomedicine & pharmacotherapy. – 2005. – T. 59. – №. 7. – P. 351-358.
185. Xiao L., Takada H., Gan X.H., et al. The water-soluble fullerene derivative ‘Radical Sponge®’ exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2006. – T. 16. – №. 6. – P. 1590-1595.

186. Xie L., Luo Y., Lin D. et al. The molecular mechanism of fullerene-inhibited aggregation of Alzheimer's β -amyloid peptide fragment //Nanoscale. – 2014. – T. 6. – №. 16. – C. 9752-9762.
187. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E. et al. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ^{14}C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity //Chemistry & biology. – 1995. – T. 2. – №. 6. – C. 385-389.
188. Yamashita K., Sakaia M., Takemoto N. et al. Attenuation of delayed-type hypersensitivity by fullerene treatment. // Toxicology. – 2009. – Vol. 261. – P.19-24.
189. Yang J., Wang K., Driver J. et al. The use of fullerene substituted phenylalanine amino acid as a passport for peptides through cell membranes //Organic & biomolecular chemistry. – 2007. – T. 5. – №. 2. – C. 260-266.
190. Yang X. L., Fan C. H., Zhu H. S. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid C_{60} fullerene derivatives and its mechanism // Toxicology in vitro. - 2002. - Vol. 16. - P. 41-46.
191. Ye C., Chen C. Y., Chen Z. et al. In situ observation of $\text{C}_{60}(\text{C}(\text{COOH})_2)_2$ interacting with living cells using fluorescence microscopy //Chinese Science Bulletin. – 2006. – T. 51. – №. 9. – C. 1060-1064.
192. Ye S., Chen M., Jiang Y. et al. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system //International journal of nanomedicine. – 2014. – T. 9. – C. 2073.
193. Youle R. J., Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis //Nature reviews Molecular cell biology. – 2005. – T. 6. – №. 8. – C. 657-663.
194. Yudoh K., Karasawa R., Masuko K., and Kato T., Water-soluble fullerene (C_{60}) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis //Int. J. Nanomedicine. – 2009. – T. 4. – C. 217-225.
195. Yusa S.-I., Awa S., Ito M. et al. Solubilization of C_{60} by micellization with a thermoresponsive block copolymer in water: Characterization, singlet oxygen generation, and DNA photocleavage //Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. – 2011. – T. 49. – №. 13. – P. 2761-2770.

196. Zhang G., Liu, Y., Liang, D. et al. Facile synthesis of isomerically pure fullerenols and formation of spherical aggregates from $C_{60}(OH)_8$ // *Angewandte Chemie*. – 2010. – T. 122. – №. 31. – P. 5421-5423.
197. Zhang S., Lukyanova O., Echegoyen L. Synthesis of Fullerene Adducts with Terpyridyl- or Pyridylpyrrolidine Groups in trans-1 Positions // *Chemistry–A European Journal*. – 2006. – T. 12. – №. 10. – C. 2846-2853.
198. Zhao B., Y.-Y. He, P. J. Bilski and C. F. Chignell Pristine (C_{60}) and hydroxylated [$C_{60}(OH)_{24}$] fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: type I vs type II mechanisms // *Chemical research in toxicology*. – 2008. – T. 21. – №. 5. – C. 1056-1063.
199. Zhou Z. Liposome formulation of fullerene-based molecular diagnostic and therapeutic agents // *Pharmaceutics*. – 2013. – T. 5. – №. 4. – P. 525-541.
200. Zhu J., Ji Z., Wang J. et al. Tumor-Inhibitory Effect and Immunomodulatory Activity of Fullerol $C_{60}(OH)_x$ // *Small*. – 2008. – T. 4. – №. 8. – C. 1168-1175.
201. Zogovic N. S., Nikolic N. S., Vranjes S. D. Djuric et al. Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C_{60}) on tumour cell growth in vitro and in vivo and a possible role of immunosuppression in the cancer-promoting activity of C_{60} // *Biomaterials*. – 2009. – T. 30. – №. 36. – P. 6940-6946.