

## Фуллерены и апоптоз

М.А. Орлова<sup>1</sup>, Т.П. Трофимова<sup>1</sup>, А.П. Орлов<sup>2</sup>, О.А. Шаталов<sup>3</sup>, Ю.К. Наполов<sup>3</sup>, А.А. Свистунов<sup>3</sup>, В.П. Чехонин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Химический факультет, кафедра радиохимии ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

<sup>2</sup>медико-биологический факультет, кафедра медицинских нанобиотехнологий ГБОУ ВПО

«Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

<sup>3</sup>фармацевтический факультет, кафедра фармакологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

**Контакты:** Марина Алексеевна Орлова orlova.radiochem@mail.ru

Многие представители обширного семейства водорастворимых аддуктов фуллеренов и наночастиц на их основе привлекают серьезное внимание как противовирусные агенты, противоопухолевые агенты и средства адресной доставки лекарств. Сегодня получено огромное количество таких производных фуллерена  $C_{60}$ . Однако для внедрения фуллереновых производных в медицинскую практику необходимо понимание причин и механизмов прямых и отдаленных последствий их эффектов *in vivo*. В первую очередь это касается их влияния на регуляцию процессов пролиферации, апоптоза и некроза. Огромное значение имеют способ получения, функционализации и морфология фуллереновых наночастиц (их размеры, форма, рельеф поверхности, аффинность к клеточным структурам), т. е. параметры, в зависимости от которых биологические эффекты наночастиц могут меняться от цитопротекторного до цитотоксического. В данной лекции содержится анализ современных представлений о влиянии фуллеренов и их производных на сигнальные пути апоптоза нормальных и опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** фуллерены, апоптоз, сигнальные пути

### Fullerene and apoptosis

M.A. Orlova<sup>1</sup>, T.P. Trofimova<sup>1</sup>, A.P. Orlov<sup>2</sup>, O.A. Shatalov<sup>3</sup>, Yu.K. Napolov<sup>3</sup>, A.A. Svistunov<sup>3</sup>, V.P. Chekhonin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University;

<sup>2</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia

Fullerene derivatives superfamily attracts a serious attention as antiviral and anticancer agents and drug delivery carriers as well. A large number of such fullerene  $C_{60}$  derivatives obtained to date. However, there is an obvious deficit of information about causes and mechanisms of immediately and long-term consequences of their effects *in vivo* which is a true obstacle on the way leading to practical medical use of them. First, this concerns their impact on the proliferation, apoptosis and necrosis regulation. Fullerene nanoparticle functionalization type, their sizes and surface nanopathology are of great importance to further promoting of either cytoprotective or cytotoxic effects. This lecture provides modern concept analysis regarding fullerenes effects on apoptosis pathway in normal and tumor cells.

**Key words:** fullerenes, apoptosis, signaling pathway

**Апопто́з** (греч. *απόπτωση* — опадание листьев) — программируемая клеточная смерть, регулируемый процесс самоликвидации на клеточном уровне, в результате которого клетка фрагментируется на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень быстро (в среднем за 90 мин) фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции. Морфологически регистрируемый процесс апоптоза продолжается 1–3 ч. Одной из биологических «задач» апоптоза является уничтожение дефектных (поврежденных, мутантных, инфицированных) клеток. В многоклеточных организмах апоптоз задействован в процессах дифференцировки и морфогенеза, в поддержании клеточного гомеостаза, в обеспечении развития и функционирования иммунной системы. Апоптоз присущ всем эукариотам, начиная от одноклеточных простейших вплоть до высших организмов. Апоптоз регулируется каскадом внутриклеточных молекул, взаимодействие

которых приводит к активации или торможению процесса. Этот каскад последовательных взаимодействий и превращений называется сигнальным путем. Основная задача системы, регулирующей апоптоз, — держать эффекторные ферменты — каспазы, демонтирующие клетки, в неактивном состоянии, но быстро переводить их в активную форму в ответ на минимальное действие соответствующих индукторов.

Тенденция исследований в области фуллереновых производных в основном направлена на расширение их классов, в то время как механизм и интенсивность воздействия на пролиферативные процессы, а также взаимосвязь с действием других про- или антиапоптотических факторов изучена недостаточно. Нет четкой прогностической модели того, какие производные фуллерена и в каких условиях будут проявлять антиапоптотические свойства, а какие можно сразу причислять к возможным антиопухолевым агентам. Приведенная ниже градация условна, однако она помогает выделить некоторые взаимосвязи.

Показано, что дендритные однозамещенные фуллерены с большим количеством гидроксильных групп (-ОН) в заместителе, а также C3-карбоксифуллерены являются ингибиторами апоптоза [1]. Однако для всех ли клеток это справедливо, и насколько универсально это действие, остается под вопросом. Водорастворимые фуллерены влияют на ионный гомеостаз, тогда как некоторые производные  $C_{60}$  проявляют свойства блокаторов ионных каналов биомембран [2, 3], за исключением CIC-3 каналов. Ингибирование носит обратимый характер, и, как предполагают, взаимодействие происходит во внеклеточных участках канала. Чтобы оценить возможность проникновения наночастиц сквозь мембрану, вычислили величину энергии Гиббса, необходимой для переноса  $C_{60}$  вдоль оси, перпендикулярной к поверхности двойного слоя мембраны [4], и была показана принципиальная возможность проникновения  $C_{60}$ . В целом, водорастворимые производные фуллерена легко проникают через биологические мембраны различных типов клеток [5].

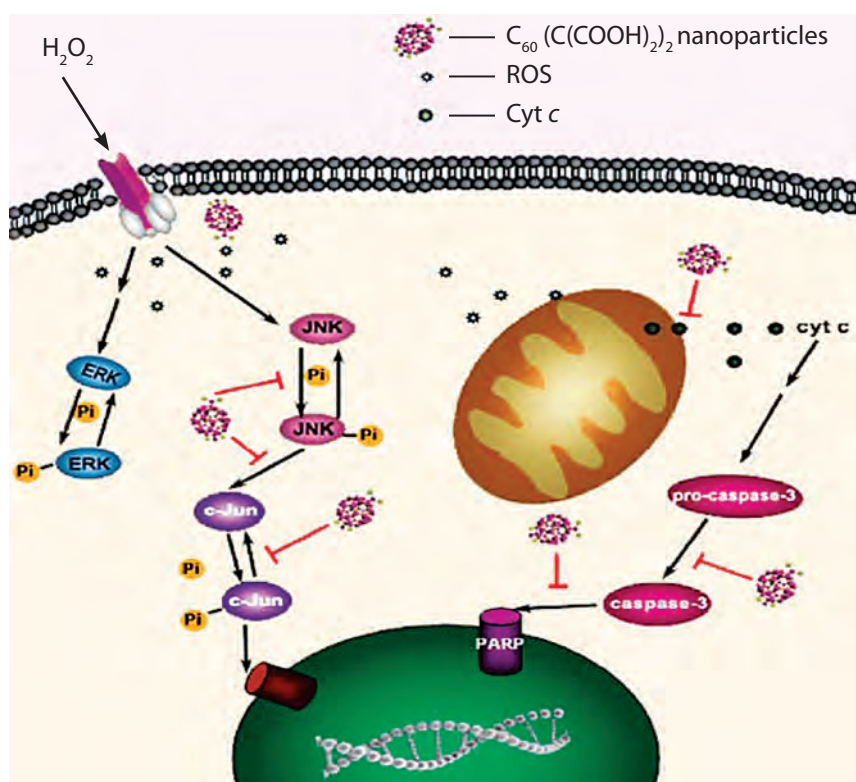
Митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) осуществляют контроль клеточного деления и являются критическими регуляторами процессов транскрипции [6], участвуя в нескольких сигнальных путях апоптоза. Токсическое действие  $n-C_{60}$  аналогично влиянию на апоптоз одностенных углеродных нанотрубок [7] и может быть связано с активацией МАРК, что, в свою очередь, взаимосвязано с активацией транс-

крипционного фактора NF- $\kappa$ B. Процесс зависит от дозы препарата [8].

Водорастворимые фуллерены *in vitro* и *in vivo* [9] выступают в роли защитных агентов от индукции остеокластогенеза по RANK (receptor activator NF- $\kappa$ B)-сигнальному пути и деструкции костных остеокластов при артритах. В экспериментах показано, что у крыс они способны понижать RANK-индуцированную дифференцировку остеокластов и подавлять их разрушение при внутриартикулярном введении.

Наночастицы  $C_{60}(C(COOH)_2)_2$  подавляют апоптоз, связанный с JNK (c-Jun amino-terminal kinases)-сигнальными путями, уменьшая JNK-фосфорилирование, активацию AP-1 (активатора протеина 1) и каспазы-3 (рис. 1). При этом не наблюдалось влияния на активацию классической митоген-активируемой киназы (ERK). Имеются данные, что протекторная роль  $n-C_{60}$  может быть опосредована активацией p38 [10, 11].

Каспазный путь апоптоза является наиболее распространенным, к активации каспазного каскада могут приводить изменения многочисленных компонентов биосистемы. Однако эти пути прослежены в очень немногих работах по фуллеренам, чаще рассматриваются отдельные факторы, способные привести к активации каспаз, или констатируется активация каспазы-3. Вопрос о влиянии заместителя рассматривали на примере апоптоза человеческих моноцитов (линия THP1) под действием разных производных фуллерена [12].



**Рис. 1.** Схема событий в СМЕС, индуцированных перексидом водорода и обработкой наночастицами  $C_{60}(C(COOH)_2)_2$ . Изменения опосредованы уменьшением фосфорилирования JNK и ингибированием ROS-продукции. Наблюдается супрессия данного сигнального пути с уменьшением активации c-Jun и каспазы-3 и ингибированием гидролиза PARP, высвобождающего цитохром С митохондрий [57]

Оказалось, что роль заместителя особенно важна для регуляции апоптоза.

Некоторые фуллерены способны, по крайней мере, частично защищать клетки от апоптоза, вызванного окислительным стрессом, путем повышения экспрессии антиоксидантных белков.

При действии  $n\text{-C}_{60}$  на рост опухолевых клеток меланомы мышей B16 *in vitro* наблюдали окислительный стресс, митохондриальную деполяризацию и, как результат, активацию каспазного каскада [13]. Наоборот, наночастицы  $\text{C}_{60}(\text{C}(\text{COOH})_2)_2$  ингибировали расщепление поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) и выход митохондриального цитохрома С, что приводило к эффективному подавлению каспазависимого апоптоза, вызванного окислительным стрессом.

Производные  $\text{C}_{60}$ -гексакискарбоновой кислоты описаны как блокаторы апоптозного сигнала тромбоцитарного фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) в клетках человеческой гепатомы [14].

$\text{C}_{60}(\text{C}(\text{COOH})_2)_2$  может ингибировать апоптоз, инициированный TNF- $\alpha$  в клетках HeLa, с помощью стабилизации лизосом. При интернализации  $\text{C}_{60}(\text{C}(\text{COOH})_2)_2$  повышается экспрессия молекулярного шаперона Hsp70, что способствует выживаемости клеток путем ингибирования пермеабилзации лизосомальных мембран. Важным фактором является кислая среда внутри лизосом, которая оказывает заметное, хотя и временное влияние на агрегированность наночастиц. Распределение по размерам изменяется в среднем со 100 до 10 нм и даже до отдельных молекул. Дезагрегированные частицы могут встраиваться в лизосомальные мембраны, образуя фуллерен-содержащие смешанные бислоиные мембраны. Это стабилизирует лизосомы, уменьшая проницаемость их мембран, в частности для деструк-

тирующих факторов. Происходит снижение выпуска катепсина из лизосом и ингибирование апоптоза, индуцированного TNF- $\alpha$  (рис. 2) [15].

Исследования, проведенные на гепатоцитах крыс, показали, что фуллеролы  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$  проявляют зависимость от концентрации препарата (0–0,25 ммоль) и времени экспозиции (0–3 ч) цитотоксичность вследствие индукции процесса перекисного окисления липидов, потери клеточного аденозинтрифосфата (АТФ) и глутатиона, увеличения уровней малонового диальдегида и окисленного глутатиона (GSSG) [16]. Считается, что основной мишенью фуллеролов являются митохондрии, поэтому на ранней стадии наблюдается митохондриальная недостаточность, деполяризация и ингибирование синтеза АТФ. Лишь на более поздней стадии наблюдается перекисное окисление липидов в результате окислительного стресса.

Для производных  $\text{C}_{60}$ -аминокислоты показана концентрационная зависимость при воздействии на линию человеческих эпидермальных кератиноцитов в культуре. В концентрации 0,4 и 0,04 мг/мл они снижали жизнеспособность клеток и развитие воспалительной реакции, а в концентрации ниже 0,04 мг/мл инициировали потерю активности цитокинов и поддерживали жизнеспособность клеток [17].

Перспективными можно признать исследования с целью оценки возможности использовать фуллерены в качестве модулятора действия лекарств. Например, гибрид  $\text{C}_{60}$ -дексаметазон сохраняет противовоспалительную активность дексаметазона, но оказывает гораздо более низкое иммуносупрессивное действие [18].

Фуллерен  $[\text{Gd}_2\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$  может вызвать фенотипическое созревание дендритных клеток. Эти наночастицы являются мощным активатором как для

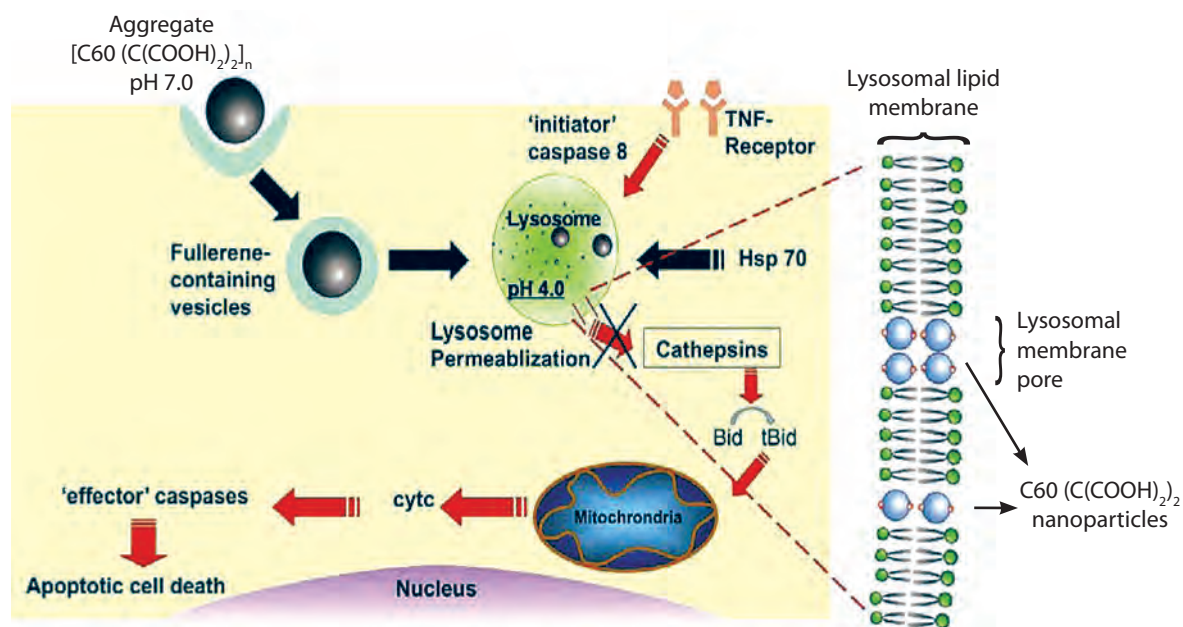


Рис. 2. Влияние  $\text{C}_{60}(\text{C}(\text{COOH})_2)_2$  на лизосомально-митохондриальный апоптотический путь [35]

дендритных клеток, так и для Th1-опосредованного иммунного ответа. Препарат вызывает увеличение продукции IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, p70 и IL-2 и ко-стимуляторов CD80, CD83, CD86 [19].

Механохимически солибилизованный  $C_{60}$  способен выступать цитопротектором против NO-индуцированной цитотоксичности, но не в результате прямого взаимодействия [20]. Предполагают, что происходит нейтрализация митохондриально-продуцированных супероксид радикалов, и это пресекает цепочку образования пероксинитрита и активации каспаз. Показано, что именно индукция пероксинитрита может быть критическим сигнальным событием для генотоксичности нано- $C_{60}$  [21].

Растворимые фуллерены, модифицированные  $\beta$ -аланином, валином и фолиевой кислотой, проявляют непосредственную акцепторную активность по отношению к NO-радикалам [22]. NO-индуцированные события при контакте клеток феохромоцитомы крыс с 1 ммоль/л нитропруссид натрия (SNP), который вызывал заметное снижение митохондриального мембранного потенциала, активности супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT) и глутатионпероксидазы (Gpx), уменьшение жизнеспособности клеток, увеличение уровня накопления внутриклеточного NO и малонового диальдегида и повышение активности каспазы-3, заметно ингибировались предобработкой клеток до контакта с SNP аминокислота- $C_{60}$ -производными. Степень ингибирования зависела от морфологии агрегации фуллереновых наночастиц, которая влияла и на их защитный эффект против  $H_2O_2$ -индуцированного апоптоза. Сульфонат-производные  $C_{60}$  после внутривенного введения повышали содержание NO в плазме крови [23].

Фуллеролы  $C_{60}(OH)_{24}$  и  $C_{60}(OH)_x$  вызывали прямое NO-тушение [24], результатом чего явилось уменьшение NO-индуцированного снижения активностей антиоксидантов — CAT, глутатион-S-трансферазы (GST) и Gpx в денуклеированной фракции интерсти-

циальных тестикулярных клеток взрослых крыс после инъекции SNP. Предполагается, что *in vivo* может происходить конкуренция между аргиназой и индуцибельной NO-синтазой (iNOS) за аргинин как субстрат. В подтверждение этого для  $C_{60}(OH)_x$  действительно наблюдалось увеличение активности аргиназы и подавление продукции NO.

Полигидроксированные  $C_{60}$ -производные [25],  $C_{60}$ -(глюкозамин) $_6$  [26], карбоксифуллерены [20, 24] и  $C_{60}$ -(цистин) $_5$  показали способность включаться во взаимосвязи и реакции с белками и биоструктурами, что приводит к модуляции апоптоза в различных типах клеток, включая нейроны. Известно воздействие наночастиц модифицированных фуллеренов на клеточный ионный гомеостаз [27] и репликацию вирусов [2], а также их участие в расщеплении ДНК [28], ингибировании амилоидных образований [29].

Пытаются моделировать взаимодействие  $C_{60}$  и ряда белков, представляющих возможные мишени для лекарств [30], с целью создания в дальнейшем биоконъюгатных материалов. На основании компьютерного моделирования получены структуры комплексов  $C_{60}$  с NOS, GST (рис. 3),  $\beta$ -секретазой-1, гипоксантин фосфорибозил трансферазой [31], с некоторыми другими белками. Имеются экспериментальные подтверждения участия производных фуллеренов в ингибировании NOS [32], глутатион-редуктазы [33], а также цистеиновых и сериновых протеаз [34]. Известна анти-ВИЧ (ингибиторная) активность фуллерен-производных [2, 35, 36], а также образование фуллерен-специфичных антител [37].

Таким образом,  $C_{60}$ -производные способны вмешиваться в биохимические процессы организма за счет связывания с белками и ферментами. С одной стороны, важно научиться использовать эти возможности в терапевтических целях, предсказывая докинг на наиболее благоприятные мишени для целенаправленного действия с использованием производных фуллере-на. Однако эти же процессы могут представлять

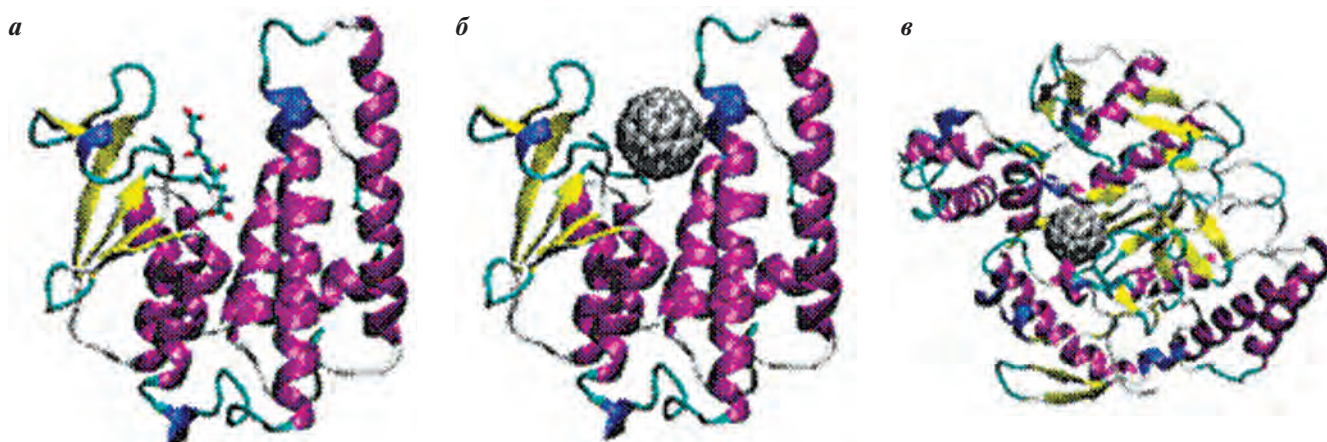


Рис. 3. Кристаллографическая структура глутатион-S-трансферазы с интеркалированной молекулой глутатиона (а) и докинг-комплексы  $C_{60}$ -глутатион-S-трансфераза (б) и  $C_{60}$ -NO-синтаза (в) [58]

опасность для организма, непредсказуемо нарушая пролиферацию и вмешиваясь в сигнальные пути апоптоза, которые до сих пор изучены недостаточно.

Особую важность представляет способность фуллеренов взаимодействовать с BSA (бычий сывороточный альбумин) [38, 39], HSA (человеческий сывороточный альбумин, коэффициент связывания  $K_{\text{связ.}} = 1,2 \times 10^7 \text{ моль}^{-1}$ ) [40] и лизоцимом [41], так как BSA и HSA выполняют в организме функцию универсального транспортера белков и биологически важных микроэлементов (металлов) [42]. Высокое сродство к HSA показали ортофосфат-содержащие фуллеролы [43]. При этом происходило изменение третичной структуры HSA в сторону большей компактности с увеличением процента  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -складок и увеличением полярности окружения триптофанового остатка. HSA может обеспечивать доставку наночастиц к органам и тканям. Однако одновременно создается конкуренция другим физиологически важным компонентам за счет изменения конформационного состояния молекулы и простой конкурентности.

О реальном влиянии фуллеренов на структуру и функции белков пока известно мало. Более того, хотя некоторые белки и взаимодействуют с фуллеренами, до настоящего времени кристаллической структуры таких комплексов не было получено. Однако докинг-моделированием было показано [44] высокое сходство между физико-химическими свойствами и геометрией поверхности сайтов связывания фуллерена с ВИЧ-протеазой, BSA и HSA (рис. 4).

Известно образование комплекса карбоксифуллерена с  $\beta$ -лактоглобулином (типичным представителем семейства белков барьерной жидкости) [45], и показана возможность переноса карбоксифуллерена из образованного комплекса в альбумин, что расширяет

представление о модели транспорта наночастиц в биологической системе.

При прямом измерении митохондриальной  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазной активности оказалось, что фермент ингибируется фуллеролом с  $\text{IC}_{50} = 7,1 \pm 0,3 \text{ моль/л}$  [46] и процесс является концентрационно-зависимым. Применение водорастворимых гексасульфатных производных фуллерена  $\text{C}_{60}$  у крыс оказывало нейротропное действие, снижая концентрацию лактатдегидрогеназы в крови [23].

Фуллеропирролидины являются неконкурентными ингибиторами по отношению к ацетилхолинэстеразе,  $\text{IC}_{50}$  варьируют в пределах 15,6–31,4  $\text{моль/л}$  [47], а смешанный карбоксифуллерен- $\text{C}_{60}$  проявлял ингибиторную активность против цистеиновых и сериновых протеиназ. Ингибирование тромбина составляло 24 % при концентрации препарата 10  $\text{моль/л}$  [44, 48]. Как ингибиторы, такие фуллерены могут использоваться при ожогах и в качестве радиопротекторов, т. е. в тех случаях, когда происходит сильнейшая активация протеиназ.

Водорастворимые фуллерены, имеющие в качестве боковой группы спиртовую, аминную или аминокислотную, являются ингибиторами Zn-содержащего фермента карбоангидразы (CAs) [49]. Механизм связан с закупоркой входа в активный центр сеткой фуллерена (размер и того и другого  $\sim 1 \text{ нм}$ ), при этом боковые фрагменты осуществляют взаимодействия с аминокислотными остатками активного центра, среди которых гистидин в положении 64, 94 и 96, валин в положении 121 и тирозин в положении 200.

Получен урациловый аддукт  $\text{C}_{60}$  [50], способный к комплементарному связыванию с аденином, аденозином и АТФ. Разнообразные свойства могут проявлять и порфирин-фуллерены. Образуя металлоком-

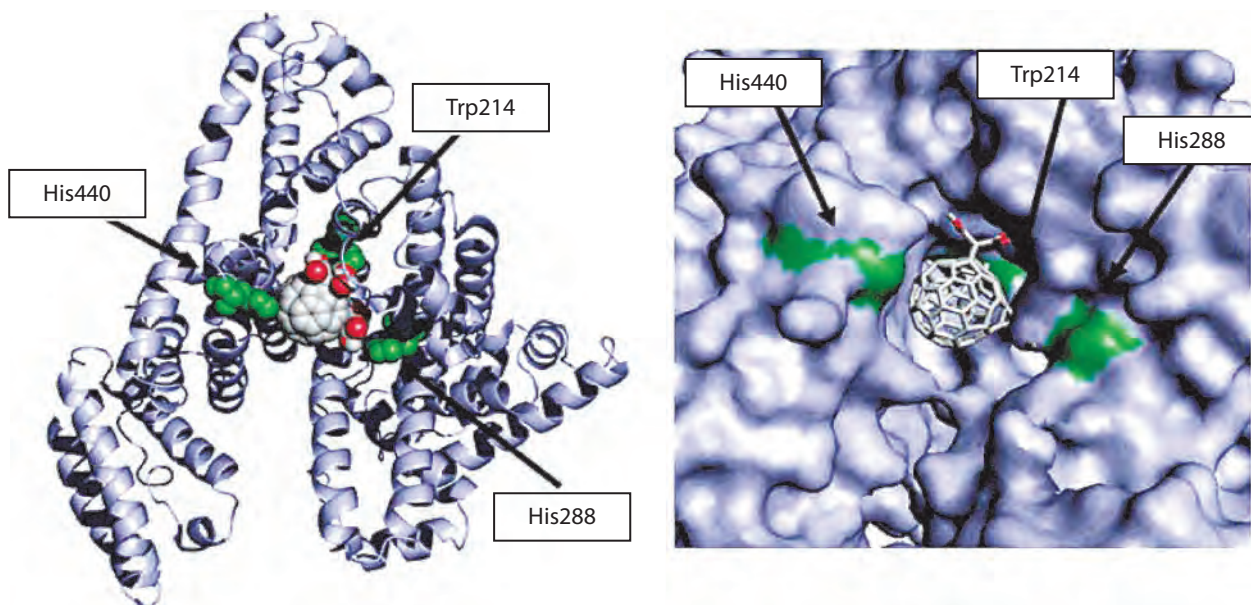


Рис. 4. Докинг-прогнозируемый сайт связывания карбоксифуллерена с HSA [59]

плексы, они способны встраиваться в белки, например, в апо-миоглобин, с получением  $C_{60}$ -миоглобина [51].

Один из наиболее известных путей апоптоза реализуется через повреждения ДНК, что активирует как минимум p53-сигнальный путь [52]. Показано, что водорастворимые производные  $C_{60}$  могут резко усиливать эффективность полимеразной реакции при относительно низкой концентрации ДНК [53], что способно помешать нормальной репликации ДНК *in vivo* и приводит в действие различные сигнальные пути апоптоза.

Моно- и бис-метанофосфонаты  $C_{60}$  выступают в ряде случаев ингибиторами ДНК-рестриктивных эндонуклеаз. Ингибирование ДНК-эндонуклеазы *Eco* III бис-метанофосфонатом- $C_{60}$  (ВМРФ) прямо зависит от дозы фуллера, а ингибирование полимеразной цепной реакции (ПЦР) с Taq ДНК-полимеразой ( $IC_{50} = 2,7$   $\mu$ моль/л) с помощью ВМРФ уменьшалось при увеличении концентрации Taq полимеразы в системе ПЦР [54]. Предполагается, что этот процесс ингибирования не коррелирует с АФК и зависит от связывания фуллеренового аддукта с полимеразой, а не с ДНК.

При pH < 9 размер фуллерола удобен для связывания с бактериальной ДНК [55]. В этом случае происходит увеличение термической и ферментативной (по

отношению к ДНКазе I и Hind III рестриктазе) стабильности ДНК дозозависимым образом. Защитная концентрация фуллерола составляла 50–500 нг/мл. В то же время при связывании этой же ДНК с нано- $C_{60}$  для защиты от ферментативного расщепления требовалась концентрация не менее 500 нг/мл. Наблюдалась также зависимость влияния размеров фуллереновых наночастиц на результат воздействия на ДНК и на токсичность. Например, нано- $C_{60}$  с размером 100 нм являются неблагоприятными для связывания с ДНК.

ДНК-фуллерен связывание способно изменять третичную структуру молекул ДНК и усложнять их узнавание белками, которое базируется на специфической и строго определенной форме молекулы ДНК [56]. Конкретные изменения были продемонстрированы на примере комплекса  $C_{60}(OH)_{24}$ -ДНК, где фуллерол прочно связывался с фосфатным остовом за пределами цепи нативной ДНК и с парами оснований в пределах главного канала между спиралями [57].

Благодаря способности вызывать в определенных условиях гибель клеток фуллерены являются потенциальными противоопухолевыми агентами. Однако однозначное прогнозирование про- и антиапоптотических свойств различных производных фуллера, тем более для различных типов клеток, пока еще невозможно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lebovits R., Rosenblum M. Substituted fullerenes and their use as inhibitors of cell death, US Patent, № 0197950 A1, 2009.
2. Friedman S.H., De Camp D.L., Sijbesma R.P. et al. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J Am Chem Soc* 1993;115:6506–9.
3. Park K.H., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J Biol Chem* 2003;278:50212–6.
4. Redmill P.S., McCabe C. Molecular dynamics study of the behavior of selected nanoscale building blocks in a gel-phase lipid bilayer. *J Phys Chem B* 2010;114:9165–72.
5. Andreev I., Petrukhina A., Garmanova A. et al. Penetration of fullerene  $C_{60}$  derivatives through biological membranes. *Fullerenes Nanotubes & Carbon Nanostructures* 2008;16:89–102.
6. Johnson G.L., Lapadat R.L. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* 2002;298:1911–2.
7. Фатхутдинова Л.М., Халиулин Т.О., Зальялов Р.Р. Токсичность инженерных наночастиц. *Казанский мед журн* 2009;90:578–84.
8. Manna S.K., Sarkar S., Barr J. et al. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B in human keratinocytes. *Nano Lett* 2005;5:1676–84.
9. Yudoh K., Karasawa R., Masuko K., Kato T. Water-soluble fullerene ( $C_{60}$ ) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. *Int J Nanomed* 2009;4:233–9.
10. Okada T., Otani H., Wu Y. et al. Role of F-actin organization in p38 MAPkinase-mediated apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes subjected to simulated ischemia and reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:2310–8.
11. Luschen S., Scherer G., Ussat S. et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces TNF-induced activation of NF- $\kappa$ B, elicits caspase activity, and enhances cytotoxicity. *Exp Cell Res* 2004;293:196–206.
12. Rebecca M., Hsing-Lin W., Jun G. et al. Impact of physicochemical properties of engineered fullerenes on key biological responses. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;234:58–67.
13. Zogovic N.S., Nikolic N.S., Vranjes-Djuric S.D. 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;30:6940–6.
14. Huang Y.L., Shen C.K.F., Luh T.Y. et al. Blockage of apoptotic signaling of transforming growth factor-beta in human hepatoma cells by carboxy-fullerene. *Eur J Biochem* 1998;254:38–43.
15. Li W., Zhao L., Wei T. et al. The inhibition of death receptor mediated apoptosis through lysosome stabilization following internalization of carboxyfullerene nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32:4030–41.
16. Nakagawa Y., Suzuki T., Ishii H. et al. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction. *Arch Toxicol* 2011;85:1429–40.
17. Rouse J.G., Yang J.Z., Barron A.R., Monteiro-Riviere N.A. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol In Vitro* 2006;20(8):1313–20.
18. Liu R.L., Cai X.Q., Wang J.D. et al. Research on the bioactivities of  $C_{60}$ -dexamethasone. *J Nanosci Nanotechnol* 2009;9:3171–6.
19. Yang D., Zhao Y., Guo H. et al.  $[Gd@C82(OH)22]n$  nanoparticles induce dendritic cell maturation and activate Th1

- immune responses. *ACS Nano* 2010;4(2):1178–86.
20. Misirkic M.S., Todorovic-Markovic B.M., Vucicevic L.M. et al. The protection of cells from nitric oxide-mediated apoptotic death by mechanochemically synthesized fullerene ( $C_{60}$ ) nanoparticles. *Biomaterials* 2009;30:2319–28.
21. Xu A., Chai Y., Nohmi T., Hei T.K. Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells. *Part Fibre Toxicol* 2009;6:3–16.
22. Hu Z., Huang Y., Guan W. et al. The protective activities of water-soluble  $C_{60}$  derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells. *Biomaterials* 2010;31:8872–81.
23. Huang S.S., Tsai S.K., Chin C.L. et al. Neuroprotective effect of hexasulfobutylated  $C_{60}$  on rats subjected to focal cerebral ischemia. *Free Rad Biol Med* 2001;30(6):643–9.
24. Bisaglia M., Natalini B.L., Pellicciari R. et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents  $C_3$ -fullerotrimer-methanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis. *J Neurochem* 2000;74:1197–204.
25. Chen Y.W., Hwang K.C.H., Yen C.C., Lai Y.L. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol* 2004;287:21–6.
26. Chien C.T., Chen C.F., Hsu S.M. et al. Forced expression of bcl-2 and bcl-xL by novel water-soluble fullerene,  $C_{60}$ (glucosamine)<sub>6</sub>, reduces renal ischemia/reperfusion-induced oxidative stress. *Fuller Nanotub Car* 2001;9:77–88.
27. Kotelnikova R.A., Kotelnikov A.I., Bogdanov G.N. et al. Membranotropic properties of the water soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene  $C_{60}$ . *FEBS Lett* 1996;389:111–4.
28. Boutorine A.S., Tokuyama H., Takasugi M. et al. Fullerene-oligonucleotide conjugates: photoinduced sequence-specific DNA cleavage. *Angew Chem Int Ed* 1994;33:2426–65.
29. Kim J.E., Lee M. Fullerene inhibits-amyloid peptide aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:576–9.
30. Calvaresi M., Zerbetto F. Baiting proteins with  $C_{60}$ . *ACS Nano* 2010;4:2283–99.
31. Gupta S., Dhawan A., Shanker R. In silico approaches: prediction of biological targets for fullerene derivatives. *J Biomed Nanotechnol* 2011;7:91–2.
32. Wolff D.J., Barbieri C.M., Richardson C.F. et al. Trisamine  $C_{60}$ -fullerene adducts inhibit neuronal nitric oxide synthase by acting as highly potent calmodulin antagonists. *Arch Biochem Biophys* 2002;399:130–41.
33. Mashino T., Okuda K., Hirota T. et al. Inhibitory effect of fullerene derivatives on glutathione reductase. *Fullerene Sci Technol* 2001;9:191–6.
34. Tokuyama H., Yamago S., Nakamura E. et al. Photoinduced biochemical-activity of fullerene carboxylic-acid. *J Am Chem Soc* 1993;115:7918–9.
35. Marcorin G.L., Da Ros T., Castellano S. et al. Design and synthesis of novel [60] fullerene derivatives as potential HIV aspartic protease inhibitors. *Org Lett* 2000;2:3955–8.
36. Schuster D.I., Wilson S.R., Schinazi R.F. Anti-human immunodeficiency virus activity and cytotoxicity of derivatized buckminsterfullerenes. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6(11):1253–6.
37. Braden B.C., Goldbaum F.A., Chen B.X. et al. X-Ray crystal structure of an anti-buckminsterfullerene antibody fab fragment: biomolecular recognition of  $C_{60}$ . *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000;97:12193–7.
38. Rozhkov S.P., Goryunov A.S., Sukhanova G.A. et al. Protein interaction with hydrated  $C_{60}$  fullerene in aqueous solutions. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:562–6.
39. Belgorodsky B., Fadeev L., Kolsenik J., Gozin M. Formation of a soluble stable complex between pristine  $C_{60}$ -fullerene and a native blood protein. *Chembiochem* 2006;7:1783–9.
40. Belgorodsky B., Fadeev L., Ittah V. et al. Formation and characterization of stable human serum albumin-tris-malonic acid [ $C_{60}$ ] fullerene complex. *Bioconjug Chem* 2005;16:1058–62.
41. Yang S.T., Wang H., Guo L. et al. Interaction of fullereneol with lysozyme investigated by experimental and computational approaches. *Nanotechnology* 2008;19:395–401.
42. Zhang X.F., Shu C.Y., Xie L. et al. Protein conformation changes induced by a novel organophosphate-containing water-soluble derivative of a  $C_{60}$  fullerene nanoparticle. *J Phys Chem C* 2007;111:14327–33.
43. Benyamini H., Shulman-Peleg A., Wolfson H.J. et al. Interaction of  $C_{60}$ -fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment. *Bioconjug Chem* 2006;17:378–86.
44. Belgorodsky B., Fadeev L., Kolsenik J., Gozin M. Biodelivery of a fullerene derivative. *Bioconjug Chem* 2007;18:1095–100.
45. Ueng T.H., Kang J.J., Wang H.W. et al. Suppression of microsomal cytochrome P450-Dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullereneol, a polyhydroxylated fullerene  $C_{60}$ . *Toxicol Lett* 1997;93:29–37.
46. Pastorin G., Marchesan S., Hoebeke J. et al. Design and activity of cationic fullerene derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase. *Org Biomol Chem* 2006;4:2556–62.
47. Iwata N., Mukai T., Yamakoshi Y.N. et al. Effect of  $C_{60}$ , a fullerene, on the activities of glutathione S-transferase and glutathion-related enzymes. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct* 1998;6:213–26.
48. Innocenti A., Durdagi S., Doostdar N. et al. Nanoscale enzyme inhibitors: fullerenes inhibit carbonic anhydrase by occluding the active site entrance. *Bioorg Med Chem* 2010;18:2822–8.
49. Marczak R., Hoang V.T., Noworyta K. et al. Molecular recognition of adenine, adenosine and ATP at the air–water interface by a uracil appended fullerene. *J Mater Chem* 2002;12:2123–9.
50. Ito M., Nakashima N. Design, synthesis and photophysical properties of  $C_{60}$ -modified proteins. *J Mater Chem* 2002;12:2026–33.
51. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцированные функции гена *p53*. *Усп биол наук* 2010;50:447–516.
52. Liang Y., Luo F., Lin Y. et al.  $C_{60}$  affects DNA replication *in vitro* by decreasing the melting temperature of DNA templates. *Carbon* 2009;47:1457–65.
53. Kang F., Song G.G. Inhibition of Taq DNA polymerase and DNA exonuclease ExoIII by an aqueous nanoparticle suspension of a bis-methanophosphonate fullerene. *Mater Sci Forum* 2011;685:345–51.
54. An H., Jin B. DNA exposure to buckminsterfullerene ( $C_{60}$ ): toward DNA stability, reactivity, and replication. *Environ Sci Technol* 2011;45:6608–16.
55. Rohs R., West S.M., Sosinsky A. et al. The role of DNA shape in protein-DNA recognition. *Nature* 2009;461:1248–53.
56. Pinteala M., Dascalu A., Ungureanu C. Binding fullereneol  $C_{60}$ (OH)<sub>24</sub> to dsDNA. *Int J Nanomed* 2009;4:193–9.
57. Shinohara N., Matsumoto K., Endoh S. et al. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity tests on fullerene  $C_{60}$  nanoparticles. *Toxicol Lett* 2009;191:289–96.
58. Baker G.L., Gupta A., Clark M.L. et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of  $C_{60}$  fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol Sci* 2008;101:122–31.
59. Seki M., Fujishima S., Gondo Y. et al. Acute toxicity of fullerene  $C_{60}$  in aquatic organism. *Environ Sci* 2008;21:53–62.