

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

Малиновская Е.М.¹, Савинова Е.А.¹, Сергеева В.А.¹, Ершова Е.С.^{1,3}, Проскурнина Е.В.¹, Каменева Л.В.¹, Долгих О.А.¹, Вейко Н.Н.¹, Краевая О.А.², Жиленков А.В.², Трошин П.А.², Костюк С.В.^{1,3}

¹ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова
ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: m.elena.0402@gmail.com

² Институт проблем химической физики РАН
просп. ак. Семенова, 1, г. Черноголовка, 142432, РФ; e-mail: troshin2003@inbox.ru

³ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии
ул. Петровка, 25, с. 2, г. Москва, 107031, РФ; e-mail: svet-vk@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0523

Аннотация. В работе рассматривается влияние двух водорастворимых производных фуллерена C₆₀, модифицированных аминокислотными остатками, на уровень активных форм кислорода (АФК) в культивируемых клетках человека и на транскрипционную активность генов, регулирующих про- и антиоксидантную активность клеток. Производные фуллерена C₆₀ с присоединенными остатками аминокислот серина и фенилбутана синтезировали из хлорфуллеренов C₆₀Cl₆. В экспериментах *in vitro* использовали культуры эмбриональных фибробластов легких человека. Различные концентрации производных фуллерена добавляли к среде культивирования, клетки культивировали в присутствии соединений от 1 до 72 часов. Уровень АФК определяли с помощью красителя 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA), который под действием свободных радикалов окисляется с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF), методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и с использованием планшетного ридера. Уровень экспрессии белков определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфичных антител. Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Показали, что при введении изучаемых соединений в клеточную среду они интенсивно поглощают активные формы кислорода за счет двойных сопряженных связей в каркасе. При этом производные фуллерена способствуют развитию вторичного окислительного стресса в клетках через 24 часа после введения. Данный эффект происходит за счет активации фермента NOX4. В клетках эмбриональных фибробластов легких человека, которым были введены исследуемые производные фуллерена C₆₀, обнаружена корреляция между экспрессией белка фермента NOX4 и уровнем активных форм кислорода. Отсутствие активации антиоксидантного транскрипционного фактора NRF2 при инкубации эмбриональных фибробластов легких человека в присутствии производных фуллерена C₆₀ способствует развитию вторичного окислительного стресса в клетках.

Ключевые слова: водорастворимые производные фуллерена C₆₀, активные формы кислорода, эмбриональные фибробласты легких человека, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

С момента своего открытия фуллерены привлекают значительное внимание исследователей в различных научных областях, включая биомедицину. Фуллерены – это углеродные сферы, которые в настоящее время используются во всем мире и имеют широкий спектр применений. Эти молекулы обладают уникальными электронными свойствами, которые делают их перспективными кандидатами для методов диагностики и терапевтического применения [1-7]. Наноразмер и возможность модификации поверхности позволяют фуллеренам стать незаменимым материалом в нанотехнологиях, в том числе, в наномедицине. Сложность исследований фуллеренов заключалась в том, что ранее синтез этих наносоединений протекал очень неселективно, и, в связи с этим получение индивидуальных соединений было медленным, сложным и дорогим. Однако с появлением новых методов синтеза эти проблемы были решены. Ковалентное присоединение различных функциональных групп к каркасу фуллерена позволяет получить широкий круг водорастворимых производных фуллерена (ВРПФ), которые проявляют различные свойства в отношении биологических объектов, в том числе, культивируемых *in vitro* клеток человека [4,6].

Однако на сегодняшний день еще недостаточно изучено воздействие наносоединений на молекулярно-генетический аппарат клетки и организм человека в целом. Известно, что в основе развития и прогресса многих сердечно-сосудистых, онкологических и неврологических заболеваний лежит окислительный стресс. Накопление в организме активных форм кислорода (АФК) в результате повышенного уровня их синтеза и/или

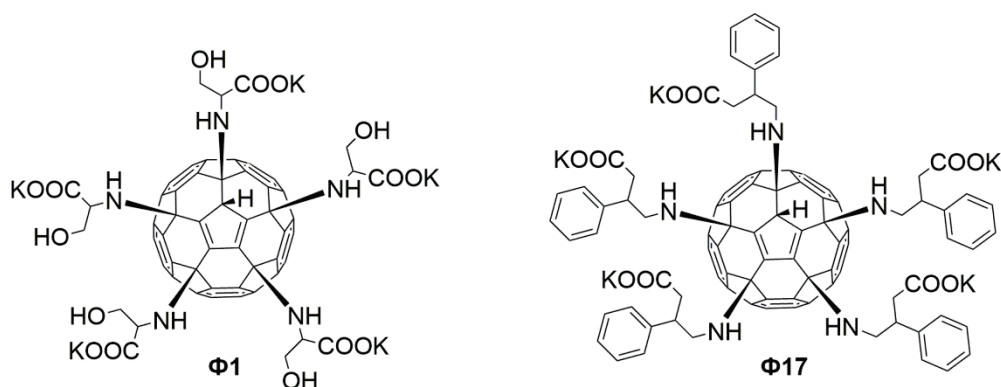


Рисунок 1. Структурные формулы исследованных производных C_{60}

сниженной активности антиокислительных систем приводит к повреждениям клеточной ДНК. Показано, что фуллерены и их водорастворимые производные являются мощными акцепторами свободных радикалов, что делает этот класс соединений привлекательным инструментом для регулирования свободнорадикальных процессов и для снижения тяжести окислительного стресса в биологических системах [1-3,10]. В настоящее время растет интерес к применению производных фуллеренов в различных отраслях наномедицины, проводятся эксперименты как на животных моделях, так и на клеточных культурах, в том числе, на культивируемых клетках человека [5-9]. В ходе исследования биологического действия ВРПФ C_{60} на клетки человека выяснилось, что данные соединения вызывают активацию ряда генов в клетках [8,9]. При этом ответ клетки зависит не только от природы функциональных групп, присоединенных к фуллерену, но и от типа клетки.

Задачей данного исследования являлось изучение влияния двух водорастворимых производных фуллерена C_{60} на транскрипционную активность генов, регулирующих про- и антиоксидантную активность клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали влияние двух производных C_{60} , модифицированных аминокислотными остатками, на прооксидантную активность эмбриональных фибробластов легких человека (ФЛЭЧ). Производные фуллерена C_{60} с присоединенными остатками аминокислот серина (Φ1) и фенилаланина (Φ17) синтезировали из хлорфуллеренов $C_{60}Cl_6$, как описано в работе [11] (рис. 1).

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

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

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

Уровень экспрессии белков определяли путем проточной цитофлуориметрии с использованием специфических антител на приборе CyFlow Space (Partec, Германия).

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

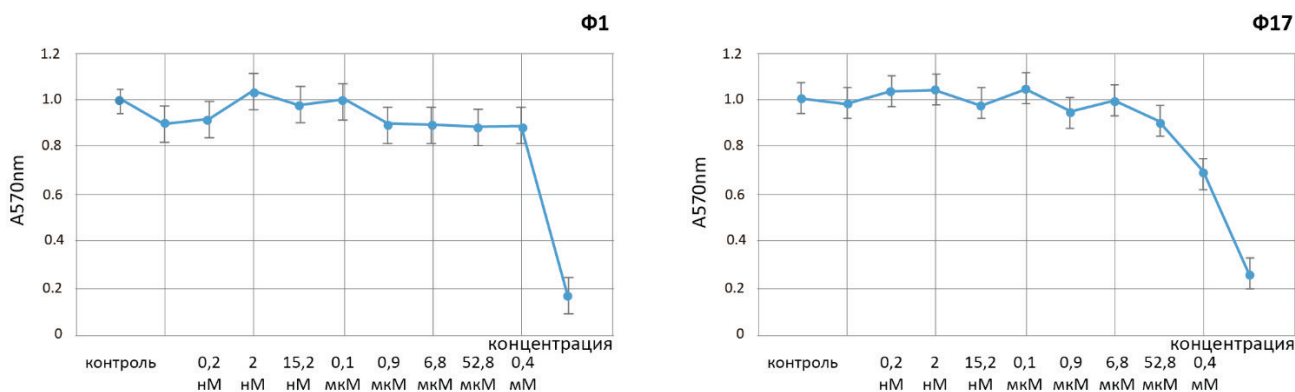


Рисунок 2. МТТ-тест: по оси X – концентрации производных фуллеренов, обозначены на рисунке; по оси Y – оптическая плотность при 570 нм

МТТ-тест показал, что диапазон концентраций 0,2 нМ-0,4 мМ исследуемых соединений безопасен для клеток (рис. 2).

Все исследованные производные фуллерена C_{60} флуоресцируют в красной области спектра (600-800 нм) с максимумом флуоресценции 732 нм – у Ф1 и 732 нм – у Ф17.

Наличие флуоресценции ВРПФ позволило детектировать их проникновение в клетки. Показали, что в течение 1 часа исследованные ВРПФ проникают в цитоплазму клеток. Максимум флуоресценции фуллеренов в клетках приходится на 3 часа после их добавления в среду культивирования. В течение 24 часов все исследованные ВРПФ остаются в клетках. На рисунке 3 приведен пример флуоресценции соединения Ф1 через 24 часа после добавления к клеткам. На большом увеличении видны места локализации флуоресцирующего производного фуллерена в клетке.

Из литературных данных известно, что водные растворы производных фуллеренов обладают антиоксидантным эффектом [6]. Однако данные относительно разных производных противоречивы. Поэтому был проведен ряд экспериментов для исследования скорости образования АФК в культуре клеток ФЛЭЧ, которые культивировали с исследуемыми соединениями.

Уровень АФК в клетках после воздействия производных фуллерена исследовали с помощью реагента H2DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). После проникновения через плазматическую мембрану клетки, реагент деацетируется внутриклеточными эстеразами. Нефлуоресцирующий DCFH в цитоплазме окисляется свободными радикалами до интенсивно флуоресцирующего DCF. Детектировали уровень синтеза АФК в клетках на планшетном ридере на термостатируемой платформе (Enspire, Финляндия). Выбрали одинаковую нетоксичную концентрацию всех исследованных производных фуллерена – 0,4 мкМ. В этой концентрации соединения вводили во флаконы с клетками ФЛЭЧ, инкубация проводилась в CO_2 -инкубаторе в течение 3 и 24 часов. В качестве контроля использовались клетки, культивирующиеся без воздействия Ф1 и Ф17, и среда без клеток (фон). После инкубации добавляли H2DCFH-DA и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра (рис. 4).

Количественные данные, свидетельствующие о влиянии производных фуллерена на уровень АФК в ФЛЭЧ, полученные на проточном цитофлуориметре, подтвердили данными, полученными на приборе EnSpire Equipment (Финляндия). На рисунке 5 приводится пример анализа уровня АФК в клетках при действии производного Ф1 на планшетном ридере. По окончании времени воздействия фуллерена на клетки добавляли раствор H2DCFH-DA и анализировали изменение флуоресценции сигнала (длины волн λ возбуждения = 495 нм, λ эмиссии = 526 нм) в зависимости от времени инкубации клеток в присутствии красителя. Получали зависимость увеличения флуоресценции DCF от времени, которая представлена на рисунке 5. Угол наклона между кривой и осью X – скорость синтеза DCF (k). Для получения величины угла наклона применяли линейную аппроксимацию.



Рисунок 3. Локализация фуллерена Ф1 в клетках (ФЛЭЧ) через 24 часа после добавления к среде культивирования. Увеличение X40

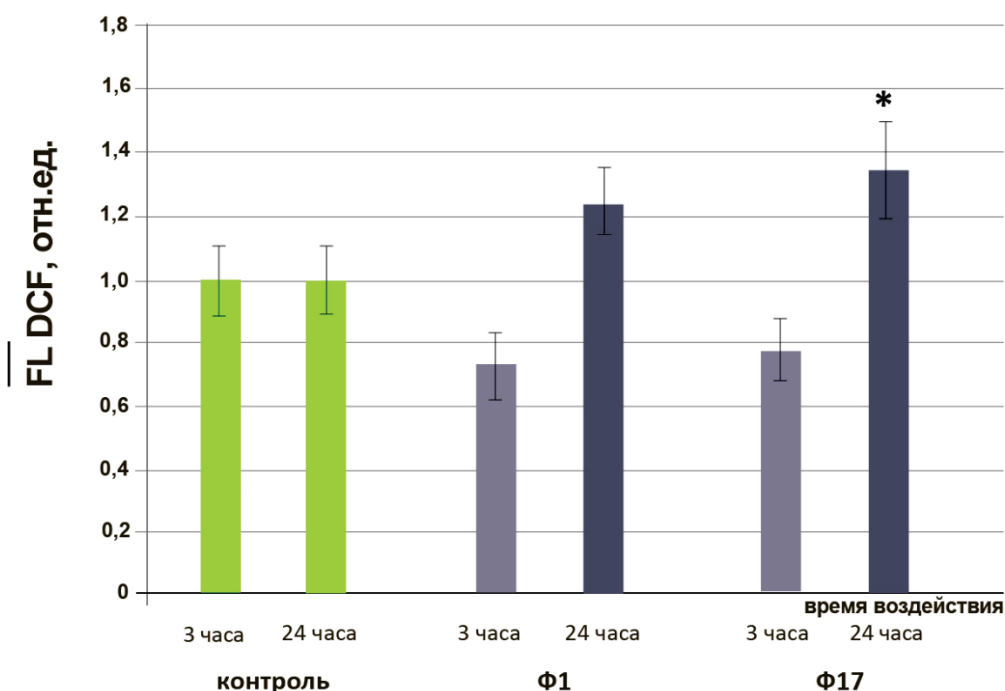


Рисунок 4. Гистограмма зависимости синтеза АФК в клетках от времени инкубации (в течение 24 часов) с производными фуллерена C_{60} (концентрация 0,4 мкМ), метод проточной цитофлуориметрии. (*) – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,01$, непараметрический U-тест

Коэффициенты линейной регрессии были не ниже 0,96 ($p < 0,001$). Скорость синтеза DCF отражает количество АФК в клеточной культуре. Результаты представляли в виде отношения констант скорости синтеза k_i/k_0 .

С использованием планшетного ридера подтвердили данные, полученные методом проточной цитофлуориметрии. При воздействии производных фуллерена C_{60} в концентрации 0,4 мкМ на фибробласты уровень АФК достоверно ($p < 0,01$) снижается на протяжении 3 часов после инкубации, но через 24 часа синтез АФК значительно возрастает (в 2-4 раза, $p < 0,001$) (рис. 6).

Для определения молекулярного механизма действия производных фуллерена на клетки были проанализированы источники АФК в клетке. Одним из основных продуцентов АФК в фибробластах является NADPH-оксидаза – фермент NOX4, катализирующий синтез пероксида водорода. Регуляция активности АФК ферментом NOX4 происходит, в основном, на транскрипционном уровне.

Был исследован уровень экспрессии мРНК фермента NOX4 методом ПЦР в реальном времени. Предварительно клетки ФЛЭЧ инкубировали с производными фуллерена C_{60} (концентрация 0,4 мкМ) в течение 3 и 24 часов (рис. 7).

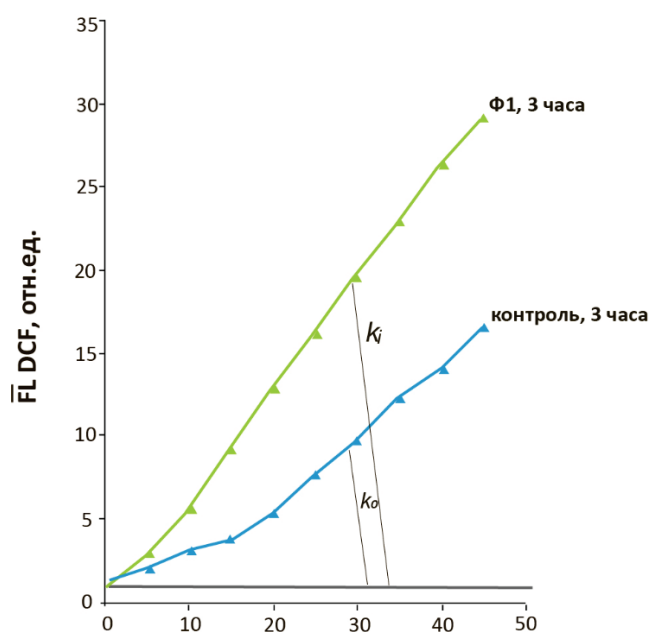


Рисунок 5. Пример анализа уровня АФК в клетках ФЛЭЧ при действии фуллерена Ф1. Клетки культивировали 3 часа в присутствии Ф1 или без производного фуллерена (контроль)

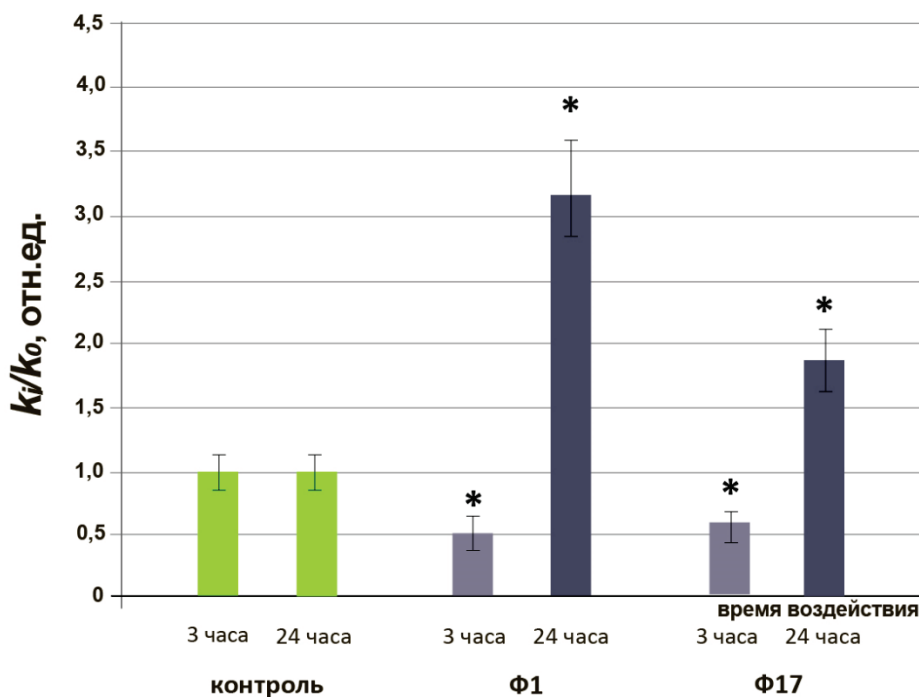


Рисунок 6. Гистограмма отношения констант скорости синтеза k_i/k_0 синтеза АФК в клетках от времени инкубации (в течение 24 часов) с производными фуллерена C_{60} (концентрация 0,4мкМ), данные получены с использованием планшетного ридера. (*) – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,01$, непараметрический U-тест

Из гистограмм видно, что уровень экспрессии гена фермента *NOX4* при добавлении исследуемых соединений в течение 3 часов практически не отличается от уровня контроля, но через 24 часа картина существенно меняется, и уровень экспрессии гена *NOX4* при воздействии производных фуллерена статистически значимо увеличивается – в 1,6-1,8 раз ($p < 0,01$).

На следующем этапе исследования необходимо было проверить влияние производных фуллерена C_{60} на синтез белка фермента *NOX4*. Количество белка *NOX4* определяли методом проточной цитофлуориметрии. Гистограммы строили с использованием среднего значения FL1-*NOX4* (рис. 8).

После введения соединений через 3 часа наблюдается незначительное снижение уровня белка *NOX4* (рис. 8). Через 24 часа уровень белка *NOX4* в клетках ФЛЭЧ при инкубации в присутствии производных C_{60} возрастает в 1,8-2,4 раза ($p < 0,01$).

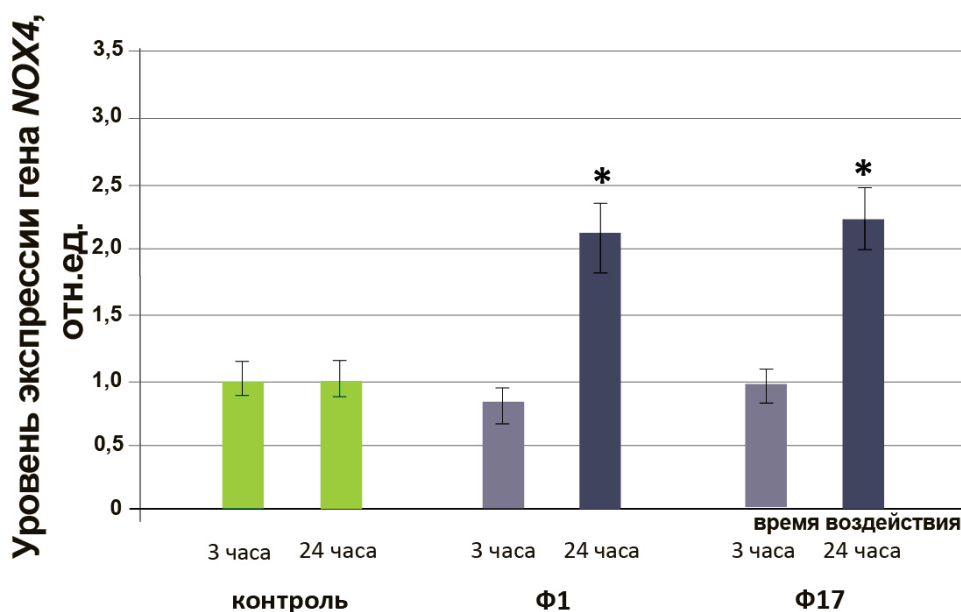


Рисунок 7. Гистограммы, отражающие уровень экспрессии гена *NOX4* в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии C_{60} в концентрации 0,4мкМ. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

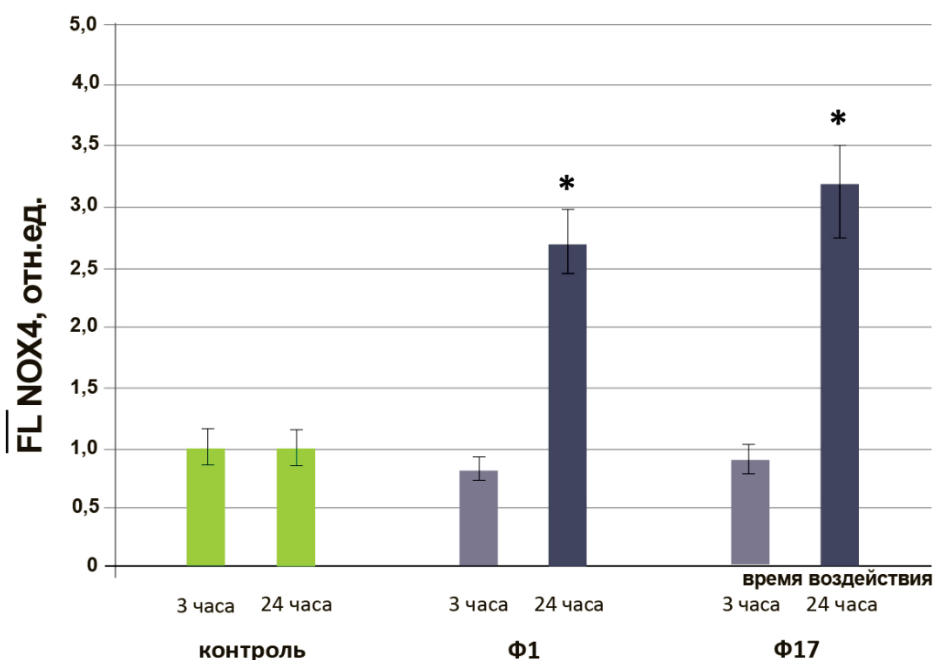


Рисунок 8. Гистограммы, отражающие уровень экспрессии белка NOX4 в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии производных C_{60} в концентрации 0,4мкМ. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

Применение плюмбагина – ингибитора фермента NOX4, позволило доказать, что увеличение уровня АФК зависит от возрастания экспрессии фермента NOX4. При добавлении производных фуллерена в среду культивирования клеток после 1 мкМ плюмбагина уровень экспрессии фермента NOX4 не возрастал, количество АФК в клетке также не увеличивалось (рис. 9).

Одним из главных транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию антиоксидантных белков, является NRF2 (Nuclear factor erythroid 2). При окислительном стрессе NRF2, не удерживаемый белком KEAP1, накапливается в цитоплазме и перемещается в ядро. В ядре NRF2 связывается с ARE (antioxidant response element) цис-регуляторными элементами, регулирующими экспрессию антиоксидантных генов и белков. Активация NRF2 приводит к индукции многих цитопротекторных белков, включая NADH-оксидоредуктазу NOX4. Влияние производных фуллерена C_{60} на уровень АФК и фермента NOX4 (наблюдается из экспериментальных данных) позволило предположить, что производные фуллерена могут также оказывать влияние на транскрипционный фактор NRF2. Решено было проверить действие производных фуллерена C_{60} на уровень экспрессии NRF2 в клетках фибробластов легкого эмбриона человека (рис. 10). Выяснили, что при воздействии производных фуллерена C_{60} уровень транскрипции гена *NRF2* остается близким к контролю.

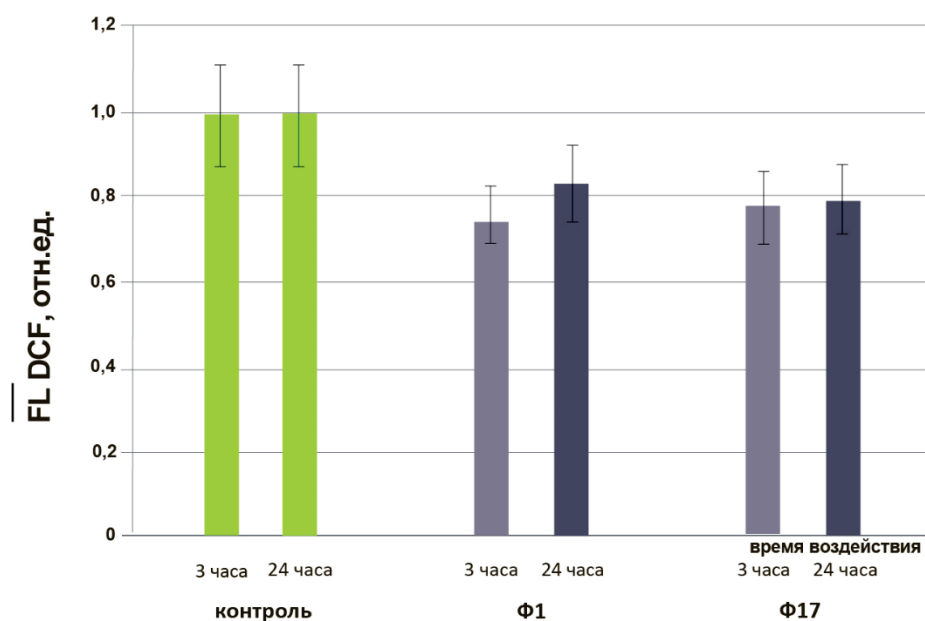


Рисунок 9. Снижение уровня АФК после внесения производных фуллерена C_{60} в среду культивирования ФЛЭЧ при ингибировании плюмбагином. Концентрация введенных соединений 0,4мкМ

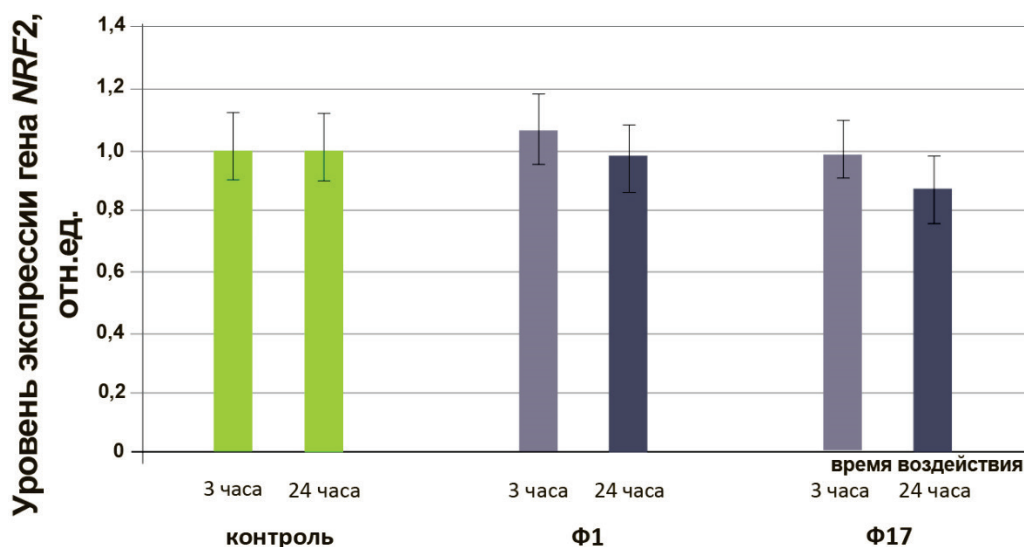


Рисунок 10. Уровень экспрессии гена *NRF2* в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии C_{60} в концентрации 0,4мкМ. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

Проанализировали влияние производных фуллерена C_{60} в ФЛЭЧ на уровень белка NRF2 методом проточной цитофлуориметрии (рис. 11).

Как видно из графиков, воздействие производных фуллерена C_{60} , добавленных к среде культивирования ФЛЭЧ, не приводит к возрастанию уровня NRF2 относительно контроля (рис. 11).

Активность транскрипционного фактора NRF2 зависит от его локализации, NRF2 в контроле локализован, преимущественно, в цитоплазме. Воздействие производных фуллерена C_{60} приводит к снижению уровня флуоресценции NRF2 в цитоплазме (рис. 12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что при введении исследуемых ВРПФ в клеточную среду, независимо от характера присоединённых к каркасу C_{60} остатков аминокислот, оба соединения активно поглощают АФК за счет двойных сопряженных связей в каркасе. В ответ на снижение уровня АФК повышается транскрипционная активность гена *NOX4*. Спустя 24 часа после введения производных фуллерена C_{60} происходит увеличение уровня транскрипционной активности фермента NOX4 и, соответственно, уровня АФК. При этом через 24 часа производные фуллерена C_{60} способствуют развитию вторичного окислительного стресса в клетках (рис. 13).

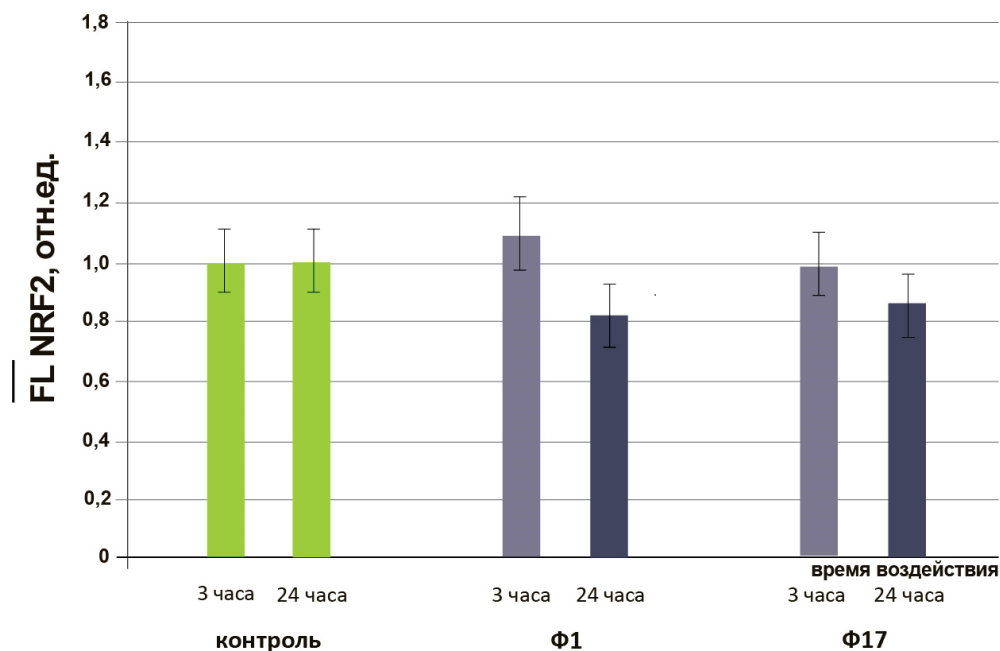


Рисунок 11. Уровень белка NRF2 в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии производных C_{60} в концентрации 0,4мкМ. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

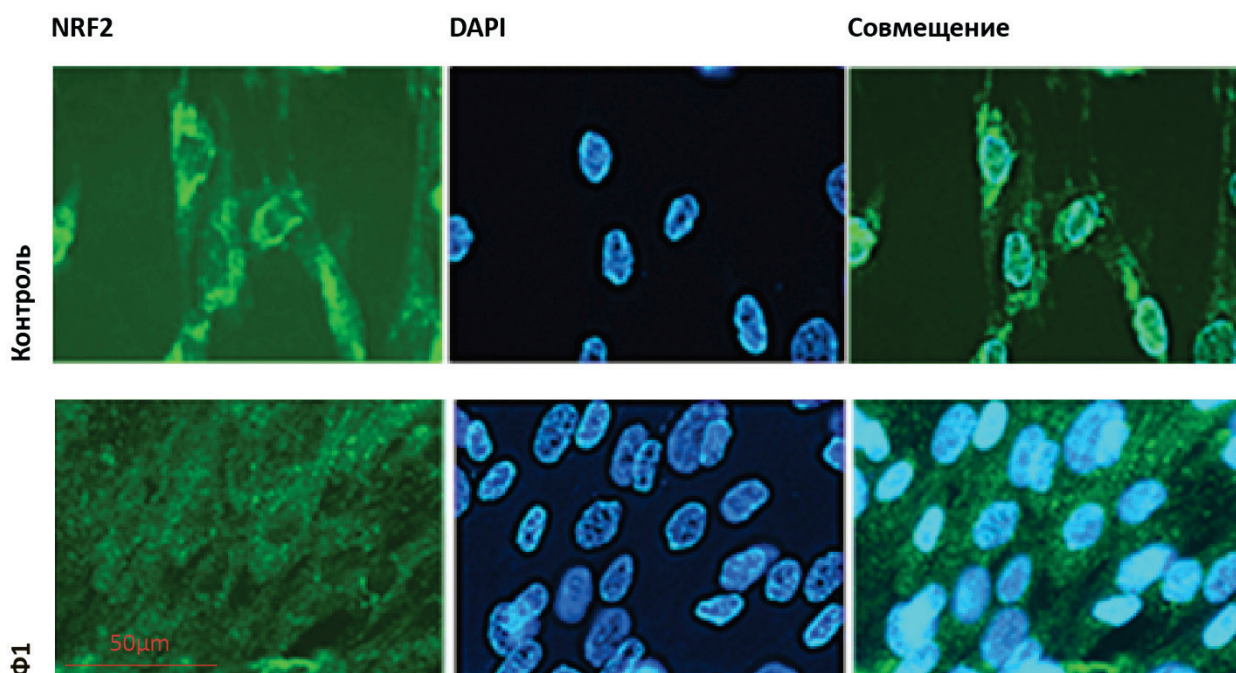


Рисунок 12. Локализация и экспрессия NRF2 в ФЛЭЧ при действии соединений на основе C_{60} на примере соединения Ф1 в концентрации 0,4 мкМ на культуру клеток ФЛЭЧ в течение 24 часов. NRF2 визуализировали с помощью антител к NRF2. Для окраски ядер использовался раствор ДНК-связывающегося красителя DAPI

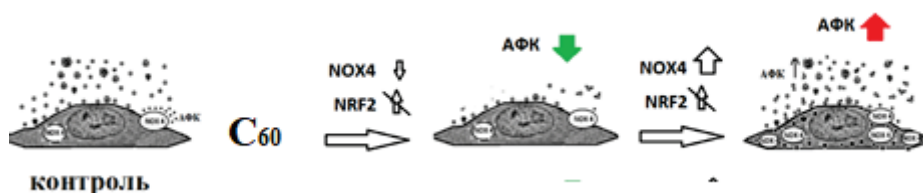


Рисунок 13. Схематичное объяснение влияния производных фуллерена C_{60} на ФЛЭЧ

Мы показали, что развитие вторичного окислительного стресса при действии на клетки производных фуллерена C_{60} происходит за счет активации фермента NOX4. В клетках ФЛЭЧ, которым были введены исследуемые производные фуллерена C_{60} , обнаружена корреляция между средним значением белка фермента NOX4 и уровнем АФК. Отсутствие активации NRF2 при инкубации ФЛЭЧ в присутствии производных фуллерена C_{60} способствует развитию вторичного окислительного стресса в клетках.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФ: проект 19-13-00411-П (синтез Ф1 и Ф17) и проект 18-15-00437 П (влияние Ф1 и Ф17 на ФЛЭЧ).

Список литературы / References:

1. Dugan L.L., Lovett E.G., Quick K.L., Lotharius J., Lin T.T., O'Malley K.L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 2001, vol. 7, no. 3, pp. 243-246.
2. Wolff D.J., Papoiu A.D., Mialkowski K., Richardson C.F., Schuster D.I., Wilson S.R. Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by tris-malonyl-C(60)-fullerene adducts. *Arch Biochem. Biophys.*, 2000, vol. 378, no. 2, pp. 216-223.
3. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*, 2005, vol. 5, pp. 2578-2585.
4. Kraevaya O.A., Peregudov A.S., Troyanov S.I. et al. Diversion of the Arbuzov reaction: alkylation of C-Cl instead of phosphonic ester formation on the fullerene cage. *Org Biomol Chem*, 2019, vol. 17, no. 30, pp. 7155-7160.
5. Bisaglia M., Natalini B., Pellicciari R., Straface E., Malorni W., Monti D., Franceschi C., Schettini G. C3-fullerotrismethanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis. *J Neurochem*, 2000, vol. 74, pp. 1197-1204.
6. Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova E. et al. Antioxidant properties of fullerene derivatives depend on their chemical structure: a study of two fullerene derivatives on HELFs. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, vol. 2019, p. 4398695.
7. Monti D., Moretti L., Salvioli S., Straface E., Malorni W., Pellicciari R., Schettini G., Bisaglia M., Pincelli C., Fumelli C., Bonafè M., Franceschi C. C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, vol. 277, pp. 711-717.

8. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Tabakov V.J. et al. Functionalized fullerene increases NF- κ B activity and blocks genotoxic effect of oxidative stress in serum-starving human embryo lung diploid fibroblasts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2016, vol. 805, pp. 46-57.
9. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Chausheva A.I. et al. Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts. *Oxid. Med. Cell Longev*, 2016, vol. 2016, p. 9895245.
10. Xiao L., Takada H., Gan X.h., Miwa N. The water-soluble fullerene derivative 'Radical Sponge' exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, vol. 16, pp. 1590-1595.
11. Kornev A.B., Khakina E.A., Troyanov S.I., Kushch A.A., Peregudov A., Vasilchenko A., Deryabin D.G., Martynenko V.M., Troshin P.A. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60] fullerene using chlorofullerene C₆₀Cl₆ as a precursor. *Chem. Commun*, 2012, vol. 48, pp. 5461-5463.

THE EFFECT OF WATER-SOLUBLE DERIVATIVES OF FULLERENE C₆₀ ON THE LEVEL OF OXIDATIVE STRESS AND ON THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF GENES REGULATING PRO- AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HUMAN EMBRYONIC FIBROBLAST CELLS (HELFs) *IN VITRO*

Malinovskaya E.M.¹, Savinova E.A.¹, Sergeeva V.A.¹, Ershova E.S.^{1,3}, Proskurnina E.V.¹, Kameneva L.V.¹, Dolgikh O.A.¹, Veiko N.N.¹, Kraevaya O.A.², Zhilenkov A.V.², Troshin P.A.², Kostyuk S.V.^{1,3}

¹ Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechie St., 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: m.elena.0402@gmail.com

² IPCP RAS

Semenov ave. 1, Chernogolovka, 142432, Russia; e-mail: troshin2003@inbox.ru

³ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology

Petrovka St, 25, B.2, Moscow, 107031, Russia; e-mail: svet-vk@yandex.ru

Received 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0523

Abstract. The paper considers the effect of two water-soluble C₆₀ fullerene derivatives modified with amino acid residues on the level of reactive oxygen species (ROS) in cultured human cells and on the transcriptional activity of genes that regulate pro- and antioxidant activity of cells. C₆₀ fullerene derivatives with attached serine and phenibut amino acid residues were synthesized from C₆₀Cl₆ chlorofullerenes. Human embryonic lung fibroblast cultures were used in in vitro experiments. Various concentrations of fullerene derivatives were added to the culture medium, the cells were cultured in the presence of compounds from 1 to 72 hours. The level of ROS was determined using the dye 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), which is oxidized by free radicals to form fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF), by fluorescence microscopy, flow cytometry, and using a plate reader. The level of protein expression was determined by flow cytometry using specific antibodies. The level of gene expression was assessed by real-time polymerase chain reaction. It was shown that when the studied compounds are introduced into the cellular environment, they intensively absorb reactive oxygen species due to double conjugated bonds in the framework. At the same time, fullerene derivatives contribute to the development of secondary oxidative stress in cells 24 hours after administration. This effect occurs due to the activation of the NOX4 enzyme. In the cells of human embryonic lung fibroblasts, which were injected with the studied C₆₀ fullerene derivatives, a correlation was found between the average value of the NOX4 enzyme protein and the level of reactive oxygen species. The lack of activation of the antioxidant transcription factor NRF2 upon incubation of human embryonic lung fibroblasts in the presence of C₆₀ fullerene derivatives contributes to the development of secondary oxidative stress in cells.

Key words: water-soluble derivatives of fullerene C₆₀, reactive oxygen species, human embryonic lung fibroblasts, oxidative stress.