

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

На правах рукописи

ШЕРШАКОВА НАДЕЖДА НИКОЛАЕВНА

**Фуллерен C₆₀: механизм биологической активности и разработка
подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным
стрессом**

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Хаитов Муса Рахимович

Москва, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Структурно-функциональные особенности фуллерена C ₆₀ , способы получения и перспективы использования в медицине	15
1.2. Аллергические патологии – воспалительный процесс.....	23
1.2. Раневое и ожоговое воспаление кожи: механизмы регенеративного процесса	36
1.3. Алопеция	62
1.4. Герпес-вирусные инфекции.....	84
1.5. Обоснование гипотез механизма действия фуллерена C ₆₀	85
1.6. Токсикология фуллеренов	109
1.7. Данные мировой литературы о фармакокинетике водной дисперсии фуллерена C ₆₀	115
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	117
2.1. Получение водного раствора фуллерена C ₆₀	117
2.2. Изучение противоаллергической активности ВРФ на модели атопического дерматита.....	117
2.3. Изучение противоаллергической активности фуллерена C ₆₀ на модели пищевой аллергии	126
2.4. Изучение противоаллергической активности фуллерена C ₆₀ на модели анафилактического шока.....	130
2.5. Изучение ранозаживляющей активности ВРФ	131
2.6. Изучение фолликулостимулирующей активности ВРФ	140
2.7. Изучение противовирусной активности ВРФ	147
2.8. Изучение антиоксидантной активности водного раствора фуллерена C ₆₀	150

2.9. Изучение способности фуллерена C ₆₀ взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором	153
2.10. Изучение способности фуллерена C ₆₀ взаимодействовать с мембранными фосфолипидами	158
2.11. Изучение способности фуллерена C ₆₀ влиять на профиль генов цитокинов, экспрессируемых миелоидными клетками человека.....	161
2.12. Изучение общетоксических свойств ВРФ	166
2.13. Изучение фармакокинетических свойств и кинетики выведения фуллерена C ₆₀	169
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	176
3.1. Получение водного раствора фуллерена C ₆₀	176
3.2. Изучение противоаллергической активности водного раствора фуллерена C ₆₀	177
3.3. Изучение ранозаживляющей активности водного раствора фуллерена C ₆₀	213
3.4. Изучение фолликулостимулирующей активности водного раствора фуллерена C ₆₀	237
3.5. Изучение противовирусной активности водного раствора фуллерена C ₆₀	255
3.6. Разработка гипотез механизма действия фуллерена C ₆₀	261
3.7. Изучение острой токсичности ВРФ.....	305
3.8. Изучение хронической токсичности ВРФ	312
3.9. Изучение фармакокинетики и кинетики выведения фуллерена C ₆₀	322
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	333
4.1. Противоаллергическая активность фуллерена C ₆₀	333
4.2. Ранозаживляющая активность фуллерена C ₆₀	336
4.3. Фолликулостимулирующая активность фуллерена C ₆₀	339
4.4. Противовирусная активность фуллерена C ₆₀	342

4.5. О механизме биологической активности фуллерена C ₆₀ : анализ предложенных гипотез	347
4.6. Оценка общетоксических свойств водного раствора фуллерена C ₆₀	362
4.7. Оценка фармакокинетики и кинетики выведения фуллерена C ₆₀ из организма	366
4.8. Прикладной аспект представленных разработок	368
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	380
ВЫВОДЫ	384
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	385

Список принятых сокращений

АД – атопический дерматит;

АрК – арахидоновая кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

АУР, АНР - арил–углеводородный рецептор

АШ – анафилактический шок

в/в – внутривенно

ВРФ, dnC60 – водный раствор фуллерена C60

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дидеоксинуклеозид трифосфат

и/г - интрагастрально

ИЛ – интерлейкин;

ИФА – иммуноферментный анализ

лизо-ФАТ – предшественник фактора активации тромбоцитов, который вызывает агрегацию тромбоцитов и вазодилатацию, медиатор бронхоспазма

ЛК – липоксины

ЛС – лекарственное средство

ЛТ – лейкотриены

М1 – макрофаги фенотипа М1

М2 – макрофаги фенотипа М2

МФ – макрофаги

МФЛ - мембранные фосфолипиды

н/к – накожно

OVA – овальбумин

п/к – подкожно

ПА – пищевая аллергия

ПАУ – полиароматические углеводороды

ПГ, PG – простогландины

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТМБ – тетраметилбензидин

ФЛА2, PLA2 - фосфолипаза A2

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

ALOX5 - arachidonate 5-lipoxygenase (арахидонат-5-липоксигеназа);

ALOX12, АЛОГ-12, A12L - arachidonate 12-lipoxygenase (арахидонат-12-липоксигеназа)

ARE- цис–регуляторные элементы антиоксидантного ответа

CCL2 - C-C motif ligand 2 или MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), фактор хемотаксиса моноцитов

CMV – цитомегаловирус

COX-1, ЦОГ-1 - циклооксигеназа 1

COX-2, ЦОГ-2 - циклооксигеназа 2

CYP – цитохром

НЕТЕ-гидроксиэйкозатетраеновая кислота

НРЕТЕ-гидропероксиэйкозатетраеновая кислота

HRE - цис–регуляторные элементы ответа на гипоксию

Ig – иммуноглобулин

PBMC, МКПК - peripheral blood mononuclear cell (мононуклеарные клетки периферической крови)

PBS – фосфатно-солевой буфер

PBS/T – фосфатно-солевой буфер с 0,1 % Твин-20

RIPK1 - Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
(серин/треонин-протеинкиназа 1, взаимодействующая с рецептором)

TGF β - трансформирующий фактор роста бета

TNF α - Tumour Necrosis Factor (фактор некроза опухоли)

TX-тромбоксаны

VEGF-A - Vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов альфа)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации

Фуллерены представляют собой аллотропные молекулярные формы углерода, в которых атомы расположены в вершинах правильных шести- и пятиугольников, покрывающих поверхность сферы или сфероида. Такие молекулы могут содержать 28, 32, 50, 60, 70, 76 и более атомов углерода. Фуллерены широко применяются в производстве, поскольку проявляют нелинейные оптические свойства, являются полупроводником и улучшают проводимость металлов, усиливают антифрикционные и противоизносные свойства материалов, а также способствуют росту алмазных пленок. Кроме того, фуллерены используют при производстве аккумуляторов, огнезащитных красок, бетона, лаков, электрических и солнечных батарей. Наиболее изученным из фуллеренов в области биологии является фуллерен C₆₀. Фуллерен C₆₀ – абсолютно симметричная молекула, имеющая сферическую форму и диаметр 0,7 нм, содержащая 60 атомов углерода, которые расположены в вершинах правильных 12 пятиугольников и 20 шестиугольников на поверхности усеченного икосаэдра ($M = 720$ кДа) [Елецкий и др., 1995]. После открытия простого способа его получения [Kratschmer et al., 1990], были синтезированы многочисленные производные фуллерена, многие из которых обладают явной биологической активностью. Анализ литературы, выпущенной за последние десять лет, показал значительный рост интереса к фуллерену C₆₀ в области прикладных исследований [Dellinger et al. 2013; Shi et al., 2014; Goodarzi et al., 2017; Lu et al., 2012]. Очень большое число работ связано с биологическими свойствами фуллерена и его производных, и попытками анализа механизма его действия [Junaid et al., 2016]. Основой уникального действия фуллерена являются три важных свойства: гидрофобность, электроноакцепторная активность и лёгкая поляризуемость молекул, определяющая как его внутримолекулярные взаимодействия, так

и облегчённый перенос электронов от донорных молекул [Sabirov et al., 2014; Deguchi et al., 2006]. Относительно высокая растворимость фуллеренов в ароматических растворителях связана со стэкинг (π - π -электронными) взаимодействиями [Li et al., 2016], играющими, очевидно, важную роль в биологической активности фуллерена. Показано, что фуллерен C₆₀ и его соединения, как мощные антиоксиданты, способны *in vivo* и *in vitro* эффективно инактивировать синглетный кислород и свободные радикалы [Bosi et al., 2003]. Это свойство делает фуллерен C₆₀ перспективным терапевтическим средством для лечения аллергии и других воспалительных заболеваний, связанных с окислительным стрессом, сопровождающимся генерацией активных форм кислорода, свободных радикалов и оксида азота [Roursgaard et al., 2008]. В настоящее время синтезированы сотни производных фуллерена C₆₀ с обширным спектром биологической активности. Важным свойством фуллерена C₆₀ является также его низкая токсичность и возможность использовать разные пути его введения. Несмотря на широкий спектр биологических эффектов фуллерена C₆₀, его применение в клинической практике пока не описано. Основным препятствием для использования фуллерена C₆₀ в медицинской практике является практически полная нерастворимость в воде (~ 10–11 мг/л), что обусловлено его высокой гидрофобностью в сочетании с тенденцией к образованию агрегатов. Кроме того, до сих пор неясными остаются вопросы фармакокинетики и механизма действия данного соединения. Следует отметить, что получение водорастворимых производных фуллерена C₆₀ является трудоемким и дорогостоящим процессом. Однако, в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России была разработана принципиально новая технология получения водной формы немодифицированного фуллерена C₆₀, которая основана на использовании биосовместимых компонентов и исключает использование токсичных растворителей, ультразвуковую обработку, длительное перемешивание и нагревание [Патент 2548971, 2015]. Технология является

относительно простой и легко масштабируется, при этом концентрация раствора фуллерена C₆₀ достигает 1 мг/мл, что на порядок выше относительно выходов при иных способах получения подобных дисперсий [Патент 2679257, 2019].

Таким образом, в связи с вышеизложенным, представляется актуальным изучение биологической активности, биораспределения, выведения и механизма действия фуллерена C₆₀. Важным аспектом также является необходимость и возможность изучения именно немодифицированного фуллерена C₆₀, поскольку любая химическая модификация молекулы обычно сопровождается изменением свойств, в том числе биологических.

Цель

Целью данной работы являлось изучение биологической активности и фармакокинетики водного раствора фуллерена C₆₀, а также определение возможных клеточных мишеней взаимодействия в рамках обоснования механизма действия.

Задачи исследования

Для достижения указанной цели поставлен ряд задач:

1. Оценить противоаллергические свойства ВРФ на моделях аллергических патологий, в том числе при моделировании атопического дерматита, анафилактического шока и пищевой аллергии *in vivo*;
2. Изучить способность ВРФ проявлять регенеративную активность при моделировании раневого и ожогового воспалений *in vivo*;
3. Изучить способность ВРФ проявлять фолликулостимулирующую активность на модели алопеции *in vivo*;

4. Изучить противовирусную активность ВРФ при моделировании герпес-вирусной инфекции *in vitro* и *in vivo*;
5. Используя данные о биологической активности ВРФ, осуществить оценку состоятельности гипотез о механизме действия ВРФ, а именно: изучить способность фуллерена C60 взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором и влиять на цитокиновый профиль макрофагов, а также на скорость их прибытия в зону воспаления;
6. Изучить острую и хроническую токсичность ВРФ;
7. Изучить фармакокинетику ВРФ при различных способах введения;
8. Оценить прикладной аспект разработок.

Научная новизна

Впервые проведено исследование биологической активности немодифицированного фуллерена C60, полученного в высокой концентрации по уникальной биосовместимой масштабируемой технологии.

Впервые выдвинуто и обосновано предположение относительно способности фуллерена C60 взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором.

Впервые выдвинуто предположение о том, что клеточной мишенью для фуллерена C60 в организме могут являться макрофаги, что обуславливает противовоспалительный и ранозаживляющий эффекты данного соединения.

Впервые проведено исследование по изучению фармакокинетических характеристик и распределения немодифицированного фуллерена C60 по внутренним органам.

Впервые проведено *in vivo* исследование токсических эффектов немодифицированного фуллерена C60, полученного по уникальной биосовместимой технологии.

Показана перспективность применения немодифицированного фуллерена C₆₀, полученного по уникальной биосовместимой масштабируемой технологии, в качестве противовоспалительного и противовирусного средства, а также средства для стимуляции роста волос.

Теоретическая и практическая значимость работы

Настоящая работа выполнена в рамках программы фундаментальных и прикладных исследований. Благодаря уникальным свойствам, фуллерены являются очень интересным и перспективным материалом для создания новых лекарственных препаратов. Исследования эффективности ряда созданных препаратов на основе фуллерена C₆₀ показали многообещающие результаты, однако их практическое использование невозможно без установления механизма их биологической активности, локализации биологических мишеней, а также анализа поведения в организме, включая выявление токсических эффектов и изучение процесса выведения.

Таким образом, научно-практической ценностью работы является то, что показанные безопасность и выводимость фуллерена C₆₀ из организма при различных способах введения могут послужить основой для возможности проведения доклинических испытаний препаратов на основе ВРФ, поскольку неизученность данных вопросов являлась весьма существенным препятствием для такого рода исследований.

Важное фундаментальное значение работы заключается в описании и обосновании механизмов биологической активности ВРФ. Научная значимость настоящего исследования заключается в получении новых знаний о структуре частиц ВРФ, эффектах фуллерена на экспрессию генов различных сигнальных путей, в том числе участвующих в процессах воспаления и роста волос. Кроме того, анализ возможности взаимодействия молекул C₆₀ с арил-углеводородными рецепторами (АУР), а также изучение способности фуллерена влиять на профиль экспрессии

генов макрофагов позволили существенно приблизиться к объяснению механизма ряда биологических эффектов фуллерена C60.

Научно-практическая значимость работы состоит в получении данных о биологической активности водного раствора немодифицированного фуллерена C60, которые указывают на перспективность данного соединения для разработки препаратов для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Так, показанная противовоспалительная и ранозаживляющая активности ВРФ делают его перспективным для терапии раневых и ожоговых воспалений. По результатам оценки противовирусной активности ВРФ, можно говорить о возможности рассматривать данное соединение в качестве кандидатного препарата для терапии герпес-вирусных инфекций. Выявленный эффект стимуляции роста волос создает предпосылки к возможности использовать ВРФ при разработке препаратов для терапии алопеции.

Полученные результаты исследований биологической активности водного раствора немодифицированного фуллерена C60 привели к созданию на его основе восстанавливающего крема и спрея для роста волос, которые были зарегистрированы в качестве косметических средств.

Масштабированная в ходе работ уникальная технология получения водного раствора фуллерена C60, позволит получать его в промышленных объемах.

В совокупности, полученные в ходе исследования данные должны позволить устранить основные препятствия не только для проведения ДКИ и КИ, но и для дальнейшего использования ВРФ и препаратов на его основе для разработки новых терапевтических средств и внедрения их в клиническую практику.

С Федеральным медико-биологическим агентством согласованы технические задания на выполнение прикладных научно-исследовательских работ по теме: «Разработка и оценка эффективности и безопасности кандидатного лекарственного средства для терапии

алопеции» (шифр: «ДКИ Алопеция-24) и по теме: «Доклинические исследования противоаллергического лекарственного средства на основе водного раствора фуллерена C60» (шифр: «ДКИ Фуллерен-24»), начало которых запланировано на 2024 год.

Положения, выносимые на защиту

Немодифицированный фуллерен C60, полученный по уникальной биосовместимой технологии в высокой концентрации, обладает противовоспалительной, регенеративной, противовирусной и фолликулостимулирующей активностями.

Молекула фуллерена C60 способна взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором.

Потенциальной клеточной мишенью фуллерена C60 в организме являются макрофаги, что обуславливает противовоспалительный и ранозаживляющий эффекты данного соединения.

Немодифицированный фуллерен C60 является малотоксичным соединением.

Водный раствор немодифицированного фуллерена C60 является перспективной основой для разработки противовоспалительных и противовирусных средств.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональные особенности фуллерена C₆₀, способы получения и перспективы использования в медицине

1.1.1. История открытия и структурные особенности фуллерена C₆₀

Фуллерены представляют собой аллотропные молекулярные формы углерода, в которых атомы расположены в вершинах правильных шести- и пятиугольников, покрывающих поверхность сферы или сфероида. Помимо фуллерена к аллотропным формам углерода относятся графит, алмаз, карбин, графен и углеродные нанотрубки. История открытия фуллерена началась в середине 1970–х, когда британский химик Гарольд Крото обнаружил длинные углеродные молекулярные цепочки по спектральным данным из космоса и поставил себе цель синтезировать их в лабораторных условиях. В начале 1980–х в Университете Райса (Техас, США), в лаборатории Ричарда Смолли, была разработана аппаратура для исследования соединений и кластеров, образующихся из тугоплавких элементов. Крото учёл возможности установок и предложил смоделировать условия, чтобы получить не металлические кластеры, а углеродные цепочки. Сначала были получены пики в масс–спектре для структур из 60 и 70 атомов углерода, а затем они были интерпретированы как замкнутые структуры, имеющие форму футбольного мяча и мяча для регби. Так, фуллерен был открыт в 1985 году [Kroto et al., 1985]. За это открытие в 1996 году Гарольд Крото (Англия), Ричард Смолли и Роберт Кёрл (США) получили Нобелевскую премию по химии.

Следует отметить, что теоретически фуллерены были предсказаны задолго до экспериментального получения. В 1966 году Дэвид Джонс предположил, что внедрение в графитовый слой, состоящий из правильных шестиугольников, может превратить плоский слой в полую замкнутую структуру. В 1971 году в Японии физиком Осавой обсуждалась

возможность существования такой структуры. Он опубликовал результаты в японском журнале Kagaku («Химия»), который выходил только на японском языке [Осава, 1970]. Затем, через год им была написана книга об ароматичности, в которую была включена глава о фуллерене, но из-за языкового барьера его работа не была известна научному сообществу вплоть до экспериментального открытия фуллерена C₆₀.

Отметим, что в СССР в 1971 году сотрудниками Института элементоорганических соединений РАН (ИНЭОС РАН), Е. Г. Гальперном, И. В. Станкевичем и Д. А. Бочваром, впервые был проведен квантово-химический расчет стабильности и электронной структуры фуллерена. Квантово-химический расчет молекулы такого размера был очень сложен для компьютеров того времени, однако он был проведен и показал, что C₆₀ является стабильной молекулой [Bochvar et al., 1973].

Молекулы высших фуллеренов ($n > 70$) также имеют форму замкнутой поверхности (Рис. 1). Самый симметричный и наиболее полно изученный представитель семейства фуллеренов — фуллерен C₆₀, в котором углеродные атомы образуют усечённый икосаэдр, состоящий из 20 шестиугольников и 12 пятиугольников и напоминающий футбольный мяч. Атомы углерода, образующие сферу, связаны между собой сильной ковалентной связью. Толщина сферической оболочки 0,1 нм, радиус молекулы C₆₀ — 0,357 нм. Длина связи С—С в пятиугольнике — 0,14 нм, в шестиугольнике — 0,139 нм [Елецкий и др., 1995].

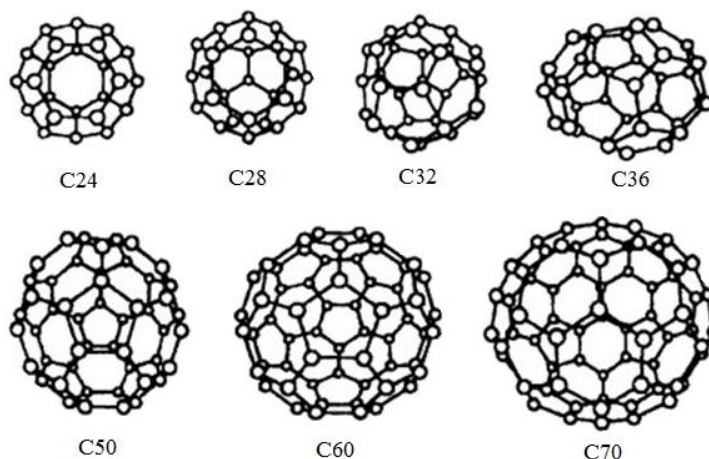


Рис. 1. Виды и структура молекул фуллерена

В природе фуллерен C_{60} встречается в шунгите (Россия, Карелия), фульгуритах (США и Индия), метеоритах и донных отложениях, которым 65 млн. лет, в космосе в виде газа и в твердом виде.

Все фуллерены практически нерастворимы в полярных растворителях (вода, этанол, ацетон); хорошо растворимы в бензоле, толуоле, хлор/бром-бензолах. Образцы C_{60} чувствительны к воздействию ультрафиолетового излучения, особенно в присутствии кислорода. Молекулы фуллеренов обладают высокой электроотрицательностью и способностью присоединять к себе до шести свободных электронов. Известно, что фуллерены способны полимеризоваться, обладают высокой адгезионной способностью, фотопроводимостью и высокой механической прочностью [Сидоров и др., 2000].

Уникальное отличие фуллеренов от большинства других органических соединений связано с наличием замкнутой полости внутри молекулы. Как следствие, они могут давать два типа производных: эктоэдральные (заместители расположены на внешней поверхности и связаны ковалентной связью с атомом углерода) и эндоэдральные (топологические соединения, в которых атом или группа атомов расположены во внутренней полости молекулы [Андриевский и др., 2005].

Фуллерены обладают структурой замкнутой поверхности с сильно развитой системой π -электронов на поверхности, придающих ей полярные свойства. Они способны к реакциям присоединения, используя которые можно получить широкий спектр продуктов с разнообразными физико-химическими и биологическими свойствами. Например, показано, что фуллерен C_{60} обладает мембранотропными свойствами и регулирующим влиянием на механизм работы мембранных ферментов [Andreev I. et al, 2008; Mchedlov-Petrosyan, 2010].

Любой заместитель в фуллереновом ядре приводит к значительным изменениям строения молекулы. Введение в него всего лишь одного заместителя меняет свойства сразу двух атомов углерода: их гибридизация

меняется из sp^2 гибридного состояния в состояние sp^3 . При этом в случае фуллерена C₆₀ исчезает такое его свойство, как равноценность всех атомов углерода, нарушается единая π -электронная система молекулы.

Присоединяя к себе радикалы различной химической природы, фуллерены способны образовывать широкий класс химических соединений, обладающих различными физико-химическими свойствами [Михеев, диссертация, 2018]. Так, получены пленки полифуллерена, в которых молекулы C₆₀ связаны между собой не вандерваальсовским, как в кристалле фуллерита, а химическим взаимодействием. Данные пленки обладают пластическими свойствами и являются новым типом полимерного материала. При этом фуллерен C₆₀ служит основой полимерной цепи, а связь между молекулами осуществляется с помощью бензольных колец [Zhai et al., 2014].

1.1.2. Способы получения водных дисперсий фуллерена C₆₀

Фуллерены представляют собой гидрофобные молекулы с низкой растворимостью в полярных растворителях, что является определенным препятствием для изучения биологической активности фуллеренов.

Поведение и свойства водных дисперсий не модифицированного фуллерена, которые пригодны для биомедицинских исследований, изучались довольно интенсивно, и разработано немало методов их получения [Mchedlov-Petrosyan, 2013]. В рамках разработки технологии получения водных растворов фуллеренов было предложено, например, простое добавление сухого C₆₀ в воду с последующим интенсивным перемешиванием в течение длительного периода времени позволяет получать дисперсию немодифицированного фуллерена C₆₀. Недостатком данного метода является образование крупных агрегатов и низкая концентрация фуллерена C₆₀ в итоговом растворе. Наиболее известные способы получения водных дисперсий C₆₀ основаны на переносе органического раствора фуллерена в водную фазу. Такие способы

включают использование летучих, смешивающихся с водой органических растворителей, в которых растворяют фуллерен. После введения воды растворитель выпаривают, получая водную дисперсию фуллерена C₆₀. Еще один способ получения водного раствора фуллерена C₆₀ предполагает использование органического растворителя для растворения фуллерена с последующей ультразвуковой обработкой раствора для постепенного перевода C₆₀ в водную фазу по мере испарения органического растворителя. Однако, важно отметить, что наличие в растворе даже следов токсичного растворителя не приемлемо для лекарственных препаратов [Oberdörster et al., 2006]. Другой подход к получению фуллерена C₆₀ в воде заключается во включении его в водорастворимые надмолекулярные структуры с использованием поверхностно-активных веществ, липосом или циклодекстринов. В большинстве случаев ядро фуллерена полностью покрыто модифицирующим агентом и практически не контактирует с водой. Мицеллярные дисперсии C₆₀ в воде, стабилизированные детергентами, могут быть получены с использованием твина, тритона или додецилсульфата натрия. Однако применение данных дисперсий C₆₀ в биологии затруднено из-за токсичности ряда используемых органических растворителей или поверхностно-активных веществ. Наиболее универсальный способ получения водорастворимого фуллерена C₆₀ основан на его химических модификациях путем присоединения функциональных гидрофильных групп. Сочетание гидрофобных и гидрофильных заместителей в структуре приводит к внутримолекулярной оси полярности. Данный эффект способствует проникновению через мембрану и обеспечивает накопление в субклеточных компартментах [Mchedlov-Petrosyan, 2010]. Однако, важно помнить, что изменение химической структуры биологически активного вещества может сопровождаться изменением и его биологических свойств.

Следует отметить, что все описанные методы получения водных нанодисперсий фуллерена характеризуются низким выходом фуллерена из

кристаллического состояния в раствор, необходимостью длительного перемешивания, мощной ультразвуковой обработки и нагревания, что делают эти методы плохо воспроизводимыми и крайне дорогими.

В данной работе был использован принципиально новый метод получения водной формы фуллерена, который основан на использовании биосовместимых компонентов и исключает использование токсичных растворителей, ультразвуковую обработку, длительное перемешивание и нагревание. ВРФ был получен с использованием метода тангенциальной ультрафильтрации раствора C60 в смеси с N-метилпирролидон/вода, позволяющей эффективно удалять органический растворитель из водной дисперсии [патент RU 2679257, 2019]. Эффективность трансформации фуллерена из кристаллического состояния в раствор была близка к количественной, при этом по данной технологии можно получить растворы с концентрацией C60 до 1-3 мг/мл. Устойчивость к нагреванию получаемого раствора позволяет проводить стерилизацию.

В ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России более 20 лет проводятся разработки по изучению физико–химических и биологических свойств фуллерена C60, а также разработка способов его получения. Так, в 2015 году Андреев С. М. с соавторами получил патент за изобретение нового способа получения водной нанодисперсии фуллерена C60 [патент 2548971, 2015]. В текущей работе использован раствор фуллерена, полученный по данной технологии, которая является биосовместимой и основана на смешивании раствора C60 в N–метилпирролидоне (МП) с деионизованной водой с последующим исчерпывающим диализом против дистиллированной воды [Андреев и др., 2014]. Технология является легко масштабируемой, относительно простой, экономичной и позволяет на порядок повышать концентрацию фуллерена C60 в растворе по сравнению с существующими способами получения, а введение в дисперсию биосовместимого неионогенного стабилизатора позволяет значительно повысить стабильность дисперсии. Важнейшим аспектом является также

то, что разработанная технология позволяет проводить широкие исследования биологических свойств именно немодифицированного фуллерена C₆₀, а полученный раствор является биосовместимым и пригоден для использования в медицине.

1.1.3. Перспективы использования фуллерена C₆₀ в медицине

Изомер C₆₀ – это стабильное и наиболее легко образующееся соединение среди известных фуллеренов с устойчивой симметрией. Важной особенностью фуллерена C₆₀ является его низкая токсичность, проницаемость через биологические мембраны и отсутствие иммуногенности [Shershakova et al., 2023; Andreev I. et al., 2008].

В настоящее время синтезированы сотни производных фуллерена C₆₀ с обширным спектром биологической активности: противоопухолевой [Yang et al., 2002], противовирусной [Меджидова, 2004; Lin et al., 2000; Tsao et al., 2002], антимикробной [Tsao et al., 2001], антиоксидантной [Wang et al., 1999; Li et al., 2017], нейропротективной [Dugan et al., 2001], фотодинамической [Vileno et al., 2004], мембранотропной [Андреев и др., 2002], ингибиторы ферментов, блокаторы апоптоза и как радиопротекторы [Пиотровский и др., 2006].

Известно, что одной из движущих сил воспалительной реакции, которая приводит к развитию ряда заболеваний, является окислительный стресс. Фуллерен и его соединения как мощные антиоксиданты способны *in vivo* и *in vitro* инактивировать активные формы кислорода и свободные радикалы. 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. Подавление развития воспалительного процесса может происходить также, например, за счет активации фагоцитарных реакций [Зорин и др., 2000]. Так, введение водного раствора фуллерена C₆₀ (ВРФ) вызывало адгезию и

миграцию нейтрофилов и макрофагов в очаг воспаления с последующим обнаружением его в фаголизосомах клеток. При этом блокировался синтез провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, последний из которых является ключевым хемоаттрактантом для нейтрофилов.

На основе результатов использования водорастворимой формы фуллерена C60 (ВРФ) для терапии экспериментального атопического дерматита (АД), индуцированного у мышей с помощью аллергена овальбумина, можно сделать выводы о наличии у фуллерена C60 противоаллергической активности, поскольку он обеспечивал достоверное снижение уровня специфических IgE-антител, Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13), а также стимуляцию выработки Th1-цитокинов (IL-12 цитокина-индуктора). Было показано, что накожное введение ВРФ сдвигал иммунный ответ с Th2 на Th1, заметно увеличивая продукцию IL-12 и IFN- γ . Кроме того, при моделировании атопического дерматита установлено увеличение уровня экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 (forkhead box p3) по сравнению с модельной группой, что свидетельствует о повышении продукции регуляторных клеток [Барабошкина, диссертация, 2016; Shershakova et al., 2016]. Иммунная регуляция и толерантность являются важными функциями иммунной системы для предотвращения и ограничения иммунного ответа на собственные и чужеродные антигены. Регуляторные T-клетки CD4/CD25 играют центральную роль в поддержании иммунологической толерантности и участвуют в высвобождении противовоспалительного цитокина IL-10. Недостаток Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T-клеток приводит к нарушению регуляции иммунитета, и у больных часто наблюдаются поражения кожи, подобные атопическому дерматиту, повышение уровня IgE и усиленный Th2-ответ [Ryan et al., 2007].

Противовоспалительная активность производных фуллерена отмечается в ингибировании провоспалительных цитокинов, секреция которых опосредована фактором некроза опухоли (TNF α) в синовиальных

фибробластах, лимфоцитах и макрофагах, и является перспективным препаратом для лечения артрита [Yudoh et al., 2009]. Другие исследования показывают, что водная дисперсия фуллерена, полученная методом Андриевского [Babakhin et al., 2009], вызывала экспрессию генов провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- α , IL-6) и Th1 цитокинов (IL-12, IFN γ) у мышей.

1.2. Аллергические патологии – воспалительный процесс

Известно, что одной из движущих сил возникновения воспалительного процесса является окислительный стресс, который может запускать и развитие аллергических патологий. Так, например, окислительный стресс зачастую приводит к развитию атопического дерматита и пищевой аллергии, поскольку является одной из основных причин снижения барьерной функции кожи и слизистых оболочек.

1.2.1. Атопический дерматит

Атопический дерматит — одна из основных аллергопатологий, затрагивающая кожу. Это хронический процесс, основанный на аллергическом воспалении [Ярилин, 2010].

Эпидемиология атопического дерматита.

За последние десятилетия аллергические заболевания получили необычайно широкое распространение во всем мире. К настоящему времени распространенность АД в детской популяции США достигла 17,2%, у детей в Европе - 15,6%, в Японии - 24%, что отражает неуклонный рост АД в течение последних трех десятилетий [Баранов и др., 2008; Паттерсон, 2000]. В России от 13 до 35% населения страдают аллергическими заболеваниями. Патология имеет большую социальную, экономическую значимость.

Этиология атопического дерматита.

Атопический дерматит относится к мультифакторным заболеваниям. Наследуемая предрасположенность к атопическим заболеваниям реализуется под действием провоцирующих факторов окружающей среды, которые также способствуют возникновению и развитию окислительного стресса. Чаще всего в детском возрасте этиологическими факторами являются пищевые аллергены. Возможна этиологическая роль аллергенов домашней пыли, эпидермальных, пыльцевых, грибковых, бактериальных и вакцинальных аллергенов. К неаллергенным причинным факторам относят: психоэмоциональные нагрузки; изменения метеоситуации; пищевые добавки; поллютанты; ксенобиотики. Отрицательные климатические влияния (чрезмерно высокие или низкие температуры), нарушения правил ухода за кожей (раздражающее действие грубой одежды, химических веществ, горячей воды), плохие бытовые условия (высокая температура в сочетании с низкой влажностью), вакцинация, инфекционные заболевания могут усугублять воздействие причинных факторов [Феденко, 2008].

Генетическая предрасположенность и ряд факторов окружающей среды запускают процесс неправильного иммунного ответа. Так как первопричинами АД врачи не в силах управлять, нужно достаточно хорошо понимать иммунные механизмы развития АД и научиться регулировать их для излечения больных. Для изучения АД используют модели, воспроизведенные на мышах. Для данного исследования выбрали модель АТ на мышах с использованием белка овальбумина - основного аллергена белка куриного яйца.

Патогенез атопического дерматита.

Установлено, что Т-хелперы под воздействием антигенов дифференцируются в Th1, либо Th2, отличающихся друг от друга секрецией цитокинов. Часто эти клетки являются антагонистами, хотя только их совместное функционирование обеспечивает сбалансированную

регуляцию иммуногенеза. Преобладание первого типа иммунного ответа наблюдается у людей, не страдающих аллергией, а второго – у атопиков [Ярилин, 2010]. Важнейшей особенностью патогенеза атопического дерматита является активация гуморального иммунитета, проявляющаяся гиперпродукцией IgE [Гущин, 2004].

Развитие воспалительного процесса у больных АД осуществляется в присутствии дендритных клеток, клеток Лангерганса при постоянно высоком уровне эозинофилов, IgE, цитокинов. Клетки Лангерганса являются основными клетками иммунной системы кожи, ответственными за IgE-опосредованное накопление аллергенов в коже, а также их презентацию Т-лимфоцитам. На поверхности клеток Лангерганса кожи обнаружены рецепторы к Fc-фрагменту молекулы IgE (FcR). Экспрессия высокочувствительных рецепторов FcεRI у лиц, предрасположенных к атопии, обеспечивает активную презентацию Т-лимфоцитам даже минимального количества антигена. При первом контакте антиген связывается с высокоаффинными рецепторами IgE (FcεRI), подвергается ферментативному расщеплению и связывается с HLA-антигенами II класса. Образующийся при этом полипептид специфически распознается Т-клеточным рецептором CD4⁺-лимфоцитов. Получив информацию клетки Лангерганса, перемещаются в лимфатические узлы, где вступают во взаимодействие с лимфоцитами, что увеличивает активацию Т-хелперов, и сопровождается повышением продукции цитокинов [Ревякина и др., 2000; Stingi, 2001]. Процесс сенсibilизации происходит при участии тучных клеток с выбросом гистамина, серотонина, кининов и других биологически активных веществ, что соответствует ранней фазе аллергической реакции.

Стадия связывания Т - хелперов антигенпредставляющими клетками Лангерганса завершается образованием активированных Th1 которые начинают продуцировать IL-2 и интерфероны, вызывая активацию Т-клеточных механизмов и ингибицию эозинофильных реакций. IFNγ моделирует иммунный ответ, подавляет рост кератиноцитов, может

тормозить синтез IgE и стимулировать синтез защитных антител [Ершов и др., 2005]. IL-2 индуцирует пролиферацию активированных антигеном зрелых Т-клеток, активирует естественные киллеры и цитотоксические лимфоциты, является хемоаттрактантом для эозинофилов [Ярилин, 2010].

У больных АД иммунный ответ на антигенное воздействие развивается по Th2-пути и сопровождается высоким уровнем IL-4, IL-5. Острая стадия кожного воспаления ассоциирована с преобладанием Th2 и экспрессией IL-4 [Ярилин, 2010]. IL-5 главным образом стимулирует дифференцировку и эндотелиальную адгезию эозинофилов, способствует их устойчивости к апоптозу, что способствует увеличению их циркуляции в крови. Способность эозинофилов к долгожительству и продукции в ткани нейротоксинов и ферментов обеспечивает переход острой фазы заболевания в хроническую, сопровождающейся сильным зудом, повреждением кератиноцитов и еще большим высвобождением цитокинов и медиаторов воспаления.

В торможении хронического процесса большая роль принадлежит IL-12, продуцируемому Th1-клетками. В свою очередь IL-12 повышает активность Th1 и продукцию IFN γ , тормозит синтез IgE, является выраженным ингибитором перехода в Th2.

Одной из основных функций иммунной системы является защита организма от патогенов различного происхождения путем уничтожения инфицированных клеток. В тоже время при иммунном ответе следует максимально уменьшить сопутствующее разрушение тканей и органов. Важную роль в супрессии и предотвращении аутоиммунных реакций играют Т-регуляторные клетки. Их основная функция контролировать силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию Т-эффекторных клеток [Chatila, 2005]. В настоящее время доказано, что нормальное функционирование Т-регуляторных клеток необходимо для предотвращения развития аутоиммунных и аллергических заболеваний. Содержание и функциональная активность Т-регуляторных клеток

является важным показателем состояния иммунной системы организма. Эти клетки экспрессируют Foxp3 - транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа. Часто эти клетки так и обозначают, как Foxp3+ регуляторные Т-клетки (Foxp3+ Treg cells). Различают несколько разных типов регуляторных Т-клеток: естественные Т-регуляторные клетки (T-reg1) и индуцибельные Т-регуляторные клетки (iT-reg). Индуцибельные Т-регуляторные клетки образуются под влиянием различных факторов на периферии, например, в региональных лимфатических узлах.

Для супрессии иммунного ответа Treg клетки выделяют цитокины: IL-10, IFN γ , IL-35. Существуют несколько механизмов супрессии: прямой - при непосредственном контакте между клетками и дистантный - осуществляющийся на расстоянии (чаще через растворимые цитокины) [Vignali et al., 2008]. Мишенями действия T-reg клеток являются Т-эффекторные клетки и дендритные клетки, ответственные за презентацию антигена и активацию Т-клеток. При дистантном механизме цитокины, выделяемые T-reg клетками, связываются со своими рецепторами на поверхности Т-эффекторных клеток, подавляют их активацию и тем самым супрессируют иммунный ответ. При прямом механизме супрессии T-reg взаимодействуют с эффекторными Т-клетками и гранзим-В, вызывают апоптоз активных Т-клеток [Friedline et al., 2009].

Множество механизмов проявления атопического дерматита делает его достаточно сложным, комплексным заболеванием, которое требует детального изучения и применения различных методов лечения под чутким руководством врача. Только лечение всего комплекса может давать положительный результат в лечении АД. Для этого требуется детальное изучение действия лекарственных препаратов на всех ступенях патогенеза заболевания.

1.2.2. Пищевая аллергия

Пищевая аллергия (ПА) – это повышенная чувствительность организма к пищевым продуктам, которая зачастую обусловлена снижением барьерной функции слизистой в условиях нарушенного окислительно-восстановительного статуса клеток. Проявляется непосредственно после употребления в пищу продукта, развивается быстро, и ее классическим примером может служить анафилаксия [Мунблит, 2016].

Эпидемиология пищевой аллергии

Пищевая аллергия встречается у 2–3% взрослого и 6–8% детского населения Европы и США. К наиболее часто встречающимся аллергенам относятся коровье молоко, яйца, арахис, орехи, пшеница, а также рыба и морепродукты [Мунблит и др., 2016; Kimber et al., 2002].

Распространенность пищевой аллергии в детской популяции достигает 10% (впервые годы жизни у детей – 6-8%, у подростков 2-4%), у взрослых – 2%.

Наиболее часто пищевая аллергия встречается у больных с atopическими заболеваниями, в частности, при atopическом дерматите у детей — у 30–40 %, у взрослых — у 20 %, при бронхиальной астме пищевая аллергия наблюдается у 17 %.

Клинические признаки пищевой аллергии

Для истинной пищевой аллергии наиболее характерными кожными проявлениями являются крапивница, ангионевротический отек Квинке и atopический дерматит. Клинические проявления зависят от многих факторов: возраста, наличия сопутствующих заболеваний, климатогеографических и экологических условий региона и др. [Лусс, 2005].

В целом, клинические проявления пищевой аллергии разнообразны по форме, локализации, степени тяжести и прогнозу. Симптомы могут затрагивать кожные, респираторные, желудочно-кишечные или сердечно-

сосудистые системы. Самым тяжелым проявлением пищевой аллергии является анафилаксия, характеризующаяся гипотонией, сосудистым коллапсом, сердечной дисритмией и диареей [Wang, 2016].

Около 50% больных пищевой аллергией имеют кожные проявления, 20% - нарушения со стороны ЖКТ, 20% пульмонологические нарушения и 10% - кардиоваскулярные проблемы [Рёкен и др., 2008].

Этиология пищевой аллергии

Пищевая аллергия, как и любая другая аллергия, относится к многофакторным заболеваниям, и является предметом взаимодействия различных экзогенных (окружающей среды), а также генетических факторов с иммунной системой [Schülke et al., 2016; Рёкен и др., 2008].

Факторы, способствующие развитию пищевой аллергии, общие для взрослых и детей. В первую очередь, это повышение проницаемости слизистой кишечника, отмечающееся при воспалительных заболеваниях ЖКТ, причиной которых является окислительный стресс, образ жизни, состав микробиома кишечника, питание. Изменения образа жизни (стресс-факторы, ожирение, употребление алкоголя, более широкое использование антибиотиков) способствует развитию аллергического воспаления в промышленно развитых странах [Schülke et al., 2016].

Было показано, что воспалительные заболевания ЖКТ и заболевания гепатобилиарной системы способствуют развитию ПА и ее распространенность у лиц с данными патологиями колеблется от 5 до 50 % [Лусс, 2005].

После травмы, стресса эпителий кожи также теряет свою барьерную функцию, в результате чего начинается ремоделирование тканей и воспалительные реакции, которые сопровождаются выработкой соответствующих цитокинов и хемокинов. Идея о том, что эпителий кожи может спровоцировать начало аллергических заболеваний описывается во многих работах [Wang, 2016].

Известно, что дисбаланс в составе микрофлоры и использование антибиотиков может вызвать повышение чувствительности к антигену. Было показано, что антибиотикотерапия мышей повышает восприимчивость мышей к арахисовой аллергии. А также беспорядочное питание, редкие или частые приемы пищи могут привести к нарушению секреции желудка, развитию гастрита, гиперсекреции слизи и другим расстройствам, способствующим формированию пищевой аллергии [Schülke et al., 2016; Лусс, 2005; Blázquez et al., 2017].

До сих пор не ясно, какие определенные дозы пищевых аллергенов ответственны за развитие сенсibilизации или толерантности. Для каждого организма переносимость пищевого продукта строго индивидуальна. Практически любой пищевой продукт может быть аллергеном и стать причиной развития пищевой аллергии.

Патогенез пищевой аллергии

Патогенез пищевой аллергии определяется сложным взаимодействием врожденного и приобретенного иммунного ответа. В основе аллергии лежит нарушение регуляции иммунной системы, отличающееся тем, что пропадает толерантность к белкам и баланс Th1 и Th2 нарушается. У пищевых аллергиков это приводит к неадекватной иммунной реакции, которая характеризуется направленным против пищевых аллергенов, специфическим ответом Th2 и IgE [Ярилин, 2010]. Симптомы пищевой аллергии возникают при дегрануляции тучных клеток и базофилов через сшивание аллергена IgE, связанного с поверхностью клетки через высокоаффинный IgE-рецептор FcRI [Blázquez et al., 2017]. Помимо местных желудочно-кишечных воспалений, также часто могут возникать системные реакции.

У пациентов с пищевой аллергией выражен повышенный выброс стромального лимфопоэтина тимуса (TSLP), IL-25 и IL-33, которые способствуют Th2 иммунному ответу. TSLP, IL-25 и IL-33 привлекают и активируют ILC2. Происходит высвобождение IL-13 из ILC2. IL-13

рассматривается как важный фактор для создания Th2 иммунного ответа на очень ранней стадии сенсibilизации. Хотя первоначально ILC2 были обнаружены в ткани желудочно-кишечного тракта, их точная роль и влияние секретируемых цитокинов в пищевой аллергии мало изучены [Saldanha et al., 2004]. IL-33 непосредственно не вызывает дегрануляцию тучных клеток, но стимулирует секрецию нескольких цитокинов IL-6 IL-13 в тучных клетках, а также эозинофилов, в результате чего иммунный ответ Th2, дополнительно усиливается [Johnston et al., 2014; Hsu et al., 2010; Bouffi et al., 2013]. IL-9 стимулируется и продуцируется тучными клетками [Goswami et al., 2011]. Было показано, что IL-9 имеет решающее значение для инициации и тяжести анафилаксии, связанной с пищевыми продуктами, посредством стимуляции кишечного мастоцитоза [Forbes et al., 2008; Osterfeld et al., 2010; Wang, 2016].

Гуморальный ответ при пищевой аллергии характеризуется временным увеличением аллергенспецифических IgE с последующим снижением IgE и постепенным увеличением уровней аллергенспецифических IgG-антител. В ответ на пищевые аллергены повышается уровень IgG4. Аллергенспецифический IgG4 считается противовоспалительным и может конкурировать с IgE за связывание аллергена [van de Veen et al., 2016].

Исследования пищевой аллергии на мышинных моделях продемонстрировали возможное участие антигенспецифических В-регуляторных клеток, которые продуцировали TGF- β в индукции толерантности к пищевым аллергенам. В-регуляторные клетки могут индуцировать клетки Т-регуляторные и подавлять активацию эффекторных Т-клеток. Фенотипы клеток В-reg, участвующих в этих ответах, остаются плохо определенными. [van de Veen et al., 2016].

Связь пищевой аллергии и атопического дерматита

Недавние клинические исследования показывают, что некоторые пациенты с атопическим дерматитом в раннем возрасте могут иметь

высокий риск развития пищевой аллергии. Наиболее часто течение атопического дерматита усугубляют яйца, рыба, молочные продукты. Зуд, покраснение, отек губ, тошнота и рвота являются типичными симптомами [Рёкен и др., 2008].

Эпидермальный барьер имеет важное значение в защите организма от инфекций, микробов и других экзогенных факторов; снижает трансэпидермальную потерю воды, а также участвует в иммунных процессах. В различных исследованиях ученые рассматривают мутацию гена, кодирующего эпидермальный структурный белок — филаггрин, в качестве сильнейшего генетического фактора, приводящий к дисфункции эпидермиса, что увеличивает риск развития атопического дерматита (АД). А также установлено, что АД может инициироваться дефектами барьерной функции кожи, которые могут быть генетически обусловленными или приобретенными. Так, дисфункция целостности кожного барьера повышает риск сенсибилизации к пищевым продуктам у больных АД.

Людям страдающих от АД и ПА свойственны некоторые общие иммунологические изменения. Воспалительная реакция, которая развивается в коже после контакта с аллергенами, включает вовлечение эпидермальных антиген-презентирующих клеток, таких как дендритные клетки и клетки Лангерганса. Эти клетки обладают высоким сродством к рецепторам IgE и связывающих антиген. Презентация этого комплекса в дальнейшем клеткам Th2 типа приводит к локальному воспалению [Sicherer et al., 2013; Arkwright et al., 2013].

Обычно сенсибилизация к пищевым антигенам происходит через гастроинтестинальный тракт. Нарушение барьерной функции кишечника и повышение абсорбции пищевых аллергенов у больных АД может в будущем способствовать развитию ПА. Возможен и другой путь сенсибилизации — контакт пищевого аллергена с воспаленной кожей еще до его приема [Caubet et al., 2013].

Некоторые исследования подтверждают, что значимость пищевой аллергии возрастает при средней и тяжелой степени тяжести АД.

Эти данные подтверждают мнение о том, что нарушение барьерной функции кожи и слизистых, в том числе в результате развития окислительного стресса, является важным аспектом патогенеза аллергопатологий, способствуя инициации аллергической сенсибилизации [Wang, 2016]. Наличие аллергической сенсибилизации, в свою очередь, может привести к развитию анафилаксии.

1.2.3. Анафилаксия

Анафилаксия — это острая системная реакция сенсибилизированного организма на повторный контакт с аллергеном, протекающая по I типу аллергических реакций, которая может привести к летальному исходу. Впервые феномен и термин «анафилаксия» был описан и введен французскими физиологами Шарль Робер Рише и Полем Портье в 1902 г. В 1913 г. Шарль Робер Рише получил Нобелевскую премию «в знак признания его работ по анафилаксии».

Распространенность анафилактоического шока составляет примерно 2%, однако наблюдается ежегодный рост данного показателя, поскольку он коррелирует с увеличением распространенности аллергии в целом [Del Carpio-Orantes et al., 2015].

Клиническая картина анафилактоического шока

Наиболее тяжелым клиническим проявлением анафилаксии является анафилактоический шок, связанный с высокой летальностью. Анафилактоический шок возникает в результате внезапного высвобождения медиаторов из тучных клеток и базофилов в кровообращение, сопровождающаяся выраженными нарушениями гемодинамики (согласно международным рекомендациям (WAO; EAACI)): снижение систолического артериального давления ниже 90 мм.рт.ст. или на 30% от исходного уровня), приводящими к недостаточности кровообращения и

гипоксии во всех жизненно важных органах [Al-Salam et al., 2019; Leatherman, 2014].

Патогенез анафилаксии

При повторном попадании в организм аллерген активирует тучные клетки и базофилы посредством связывания со специфическим IgE и его высокоаффинным рецептором (FcεRI) на поверхности клетки, стимулируя ранее сформированные вещества (главным образом, гистамина, триптазы, гепарина, химазы и цитокинов). Далее, инициируется процесс дегрануляции клеток, благодаря чему высвобождаются продукты дегрануляции тучных клеток. Тучные клетки располагаются преимущественно в подслизистом слое и коже рядом с кровеносными сосудами. Цитокины, такие как TNF-α, IL-4, IL-6 и IL-13, высвобождаются позднее и играют роль в двухфазной или длительной анафилаксии. Одним из наиболее важных медиаторов воспаления является гистамин, который вызывает вазодилатацию, повышенную проницаемость сосудов, гиперсекрецию слизи, спазм гладких мышц, а также хемотаксис и активацию эозинофилов. Гистамин инициирует свои эффекты через рецепторы H1, вызывая зуд, ринорею, тахикардию и бронхоспазм; и одновременно активирует рецептор H2, что приводит к головной боли, гиперемии и гипотонии. Связывание гистамина с рецепторами H1 обуславливает активацию эндотелиальных клеток, которая вызывает превращение L-аргинина в оксид азота с последующей вазодилатацией, инициируя состояние шока. Далее происходит высвобождение других медиаторов, таких как простагландин PGD2, который способствует бронхоспазму и генерализованной вазодилатации. Продукты дегрануляции тучных клеток могут активировать другие важные биохимические пути, которые способствуют возникновению анафилактической реакции, такие как система кининоген-калликреин, каскад коагуляции и каскад комплемента. В конечном итоге, активация данных сигнальных путей

может привести к дисфункции ряда органов [Alam et al., 2013; Del Carpio-Orantes et al., 2015; Leatherman, 2014].

Патологическими признаками смерти от анафилактического шока являются отек гортани, закупорка слизию или гиперинфляция легких, а также повреждение миокарда. Также отмечается расширение правого желудочка, эозинофилия в легочных сосудах и желудочно-кишечном тракте, застойные явления в брюшной полости [Simonini et al., 2018; Leatherman, 2014].

1.2.4. Подходы к терапии аллергических заболеваний

Лечение атопического дерматита проводится комплексом методов: при помощи медикаментозной терапии, диеты и особого образа жизни. В терапии атопического дерматита в настоящее время используют различные терапевтические воздействия, направленные на контроль основных симптомов заболевания. Основными препаратами являются топические глюкокортикостероиды, антигистаминные препараты.

Важным и обязательным этапом наружной терапии АД является восстановление барьерной функции кожи. Для этого 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; Барабошкина, диссертация, 2016].

Терапия пищевой аллергии включает комплекс различных мероприятий, в том числе с применением медикаментозной терапии и диеты. К специфическим методам лечения относят элиминацию пищевого аллергена и аллергенспецифическую иммунотерапию. Элиминация, или исключение из питания причинно-значимого пищевого аллергена, относится к основным методам терапии пищевой аллергии. Образ жизни и диета должны быть со строгим избеганием попадания аллергенов как на кожу, так и в пищеварительный тракт.

Важным аспектом при лечении ПА является противовоспалительная терапия и восстановление барьерной функции слизистой оболочки ЖКТ.

При этом излечение аллергических заболеваний полностью невозможно. Адекватное применение всех мер может обеспечить стойкую ремиссию и предупреждает рецидивы, что значительно улучшает качество жизни больных. Следует отметить, что только комплексное лечение может давать положительные результаты коррекции иммунного ответа, однако появление средства, самостоятельно подавляющего аллергическое воспаление, причиной которого часто является нарушение окислительно-восстановительного баланса клеток, было бы большим шагом в лечении аллергопатологий в целом.

1.3. Раневое и ожоговое воспаление кожи: механизмы регенеративного процесса

Важная роль при раневых и ожоговых воспалениях принадлежит быстрому развитию окислительного стресса, от срока устранения которого зависит скорость регенерации.

1.3.1. Регенерация кожного покрова

Регенерация (лат. *regeneratio* – возрождение) представляет собой процесс восстановления разрушенных или утраченных тканей, органов, а также отдельных частей живых существ. Выделяют физиологическую, репаративную и патологическую регенерацию. При физиологической регенерации происходит постоянное восстановление клеток; при репаративной – восстановление тканей при травмах и других патологических состояниях, сопровождающихся массовой гибелью клеток; при патологической – возрождение «утраченных» органов и тканей после повреждений.

Различают полную (реституция) и неполную (субституция) регенерацию. При субституции на месте разрушенных тканей разрастается неспециализированная соединительная ткань – рубец. В ряде случаев при субституции функция восстанавливается либо за счёт усиленного размножения клеток, либо за счёт внутриклеточной регенерации (восстановление субклеточных структур при неизменённом числе клеток) [Новицкий и др., 2009].

Нарушение процесса деления клеток приводит не только к старению клеток, но и к старению организма в целом. Низкая регенерация тканей значительно растягивает процесс выздоровления при различных травмах и патологиях.

В зависимости от характера повреждающего фактора выделяют следующие типы ран: механические, ожоговые, лучевые, хронические и т.д. При наличии нескольких видов повреждающих факторов рану называют комбинированной.

Вне зависимости от происхождения раны заживление сопровождается тремя перекрывающимися фазами, предложенными М.И. Кузиным: воспаления (экссудативная фаза), регенерации (фаза пролиферации) и эпителизации (фаза реэпителизации). На рис. 2 показан временной интервал между указанными фазами.



Рис. 2. Фазы заживления ран. 1- фаза воспаления, 2 – фаза регенерации, 3 – фаза эпителизации

В большинстве случаев возникновение раны сопровождается кровотечением из поврежденных сосудов. В окружающие ткани тучные клетки выделяют медиаторы воспаления, такие как серотонин и гистамин, вазоактивные вещества брадикинины. Эти вещества инициируют процесс диапедеза (выход форменных элементов крови в рану), который сопровождается временным увеличением проницаемости поврежденных кровеносных сосудов, чтобы полиморфноядерные лейкоциты (PMN – *polymorphonuclear leukocytes*), тромбоциты (PLT – *platelets*) и белки плазмы проникли в рану (Рис. 3). Затем происходит вазоконстрикция (*vasoconstriction* – стягивание, сужение) сосудов, что является результатом выделения в рану катехоламинов [Mercandetti et al., 2005].

Роль тромбоцитов заключается в образовании сгустка крови на месте раны для поддержания гемостаза (Рис. 4). Они также выделяют факторы свертывания, которые способствуют образованию фибрина из фибриногена. Фибрин служит своеобразной сетью, в которую затем мигрируют клетки, участвующие в воспалении, и фибробласты. Формируется основа для завершения процесса коагуляции. Коагуляция (*coagulatio* – свертывание, сгущение) происходит тогда, когда тромбоциты агрегируют с фибрином, который осаждается в ране (Рис. 3). Без фибринового сетчатого каркаса рубец на месте зажившей раны будет недостаточно прочным [Beanes et al., 2004].

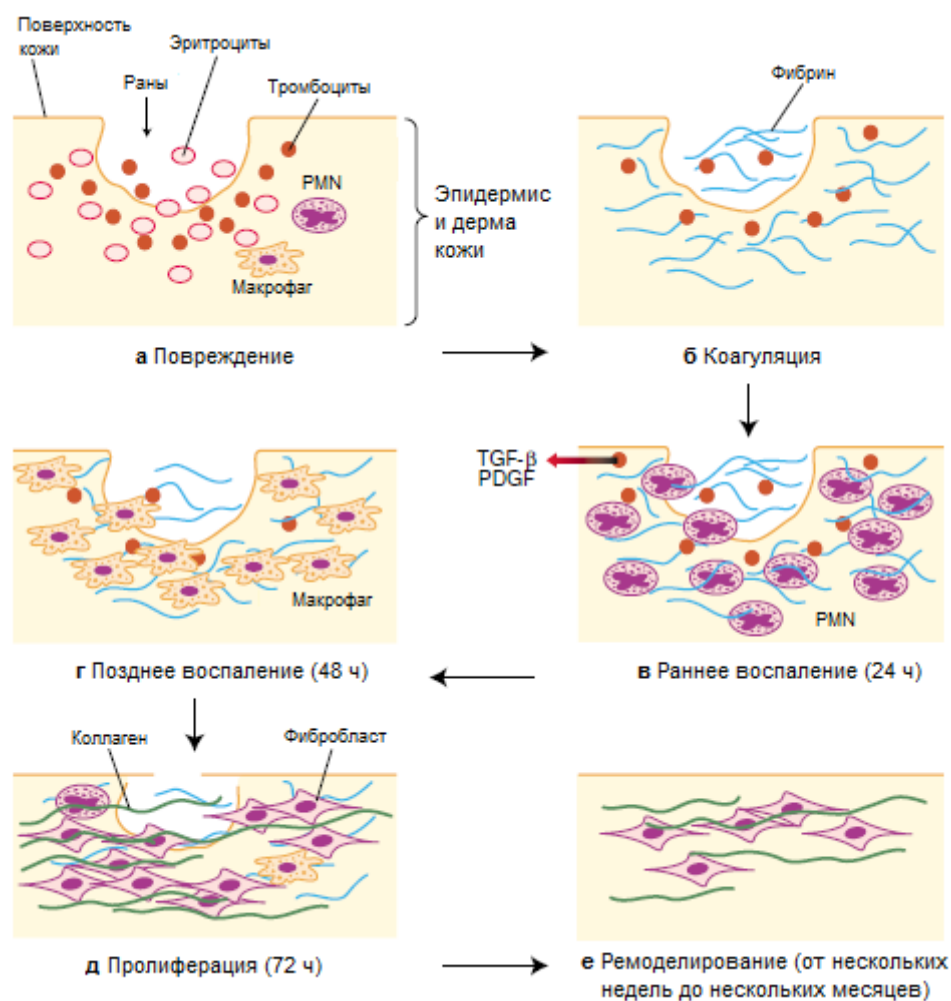


Рис. 3. Фазы заживления ран кожи.

Известно, что тромбоциты высвобождают многочисленные факторы для процесса заживления, такие как PDGF (*platelet-derived growth factor* – фактор роста тромбоцитов) и TGF β (*transforming growth factor beta* – трансформирующий фактор роста бета), которые привлекают нейтрофилы к ране, что свидетельствует о начале фазы воспаления (Рис. 3, 4). TGF β облегчает миграцию лейкоцитов из окружающих кровеносных сосудов. Роль лейкоцитов заключается в захватывании и переваривании возбудителей инфекций и отмерших клеток путем фагоцитоза. Лейкоциты достигают своих максимальных значений через 24-48 часов и начинают их выведение через 72 часа [Mercandetti et al., 2005; Beanes et al., 2004].

PDGF является хемотаксическим для фибробластов и, наряду с TGF β , является мощным модулятором фибробластического митоза, что

приводит к плодовой фибрилляции коллагена в более поздних фазах [Beanes et al., 2004].

Моноциты также проникают в участок раны и становятся активированными макрофагами (Рис. 3). Макрофаги продолжают очищающий процесс и производят различные факторы роста: FGF (*fibroblast growth factor* – фактор роста фибробластов), TGF α (*transforming growth factor alpha* – трансформирующий фактор роста альфа), TGF β и PDGF в течение 3-4 дней (Рис. 4). Они также выделяют IL1 (*interleukin* – интерлейкин) и TNF α (*tumor necrosis factor alpha* – фактор некроза опухоли альфа) [Singer, 1999].

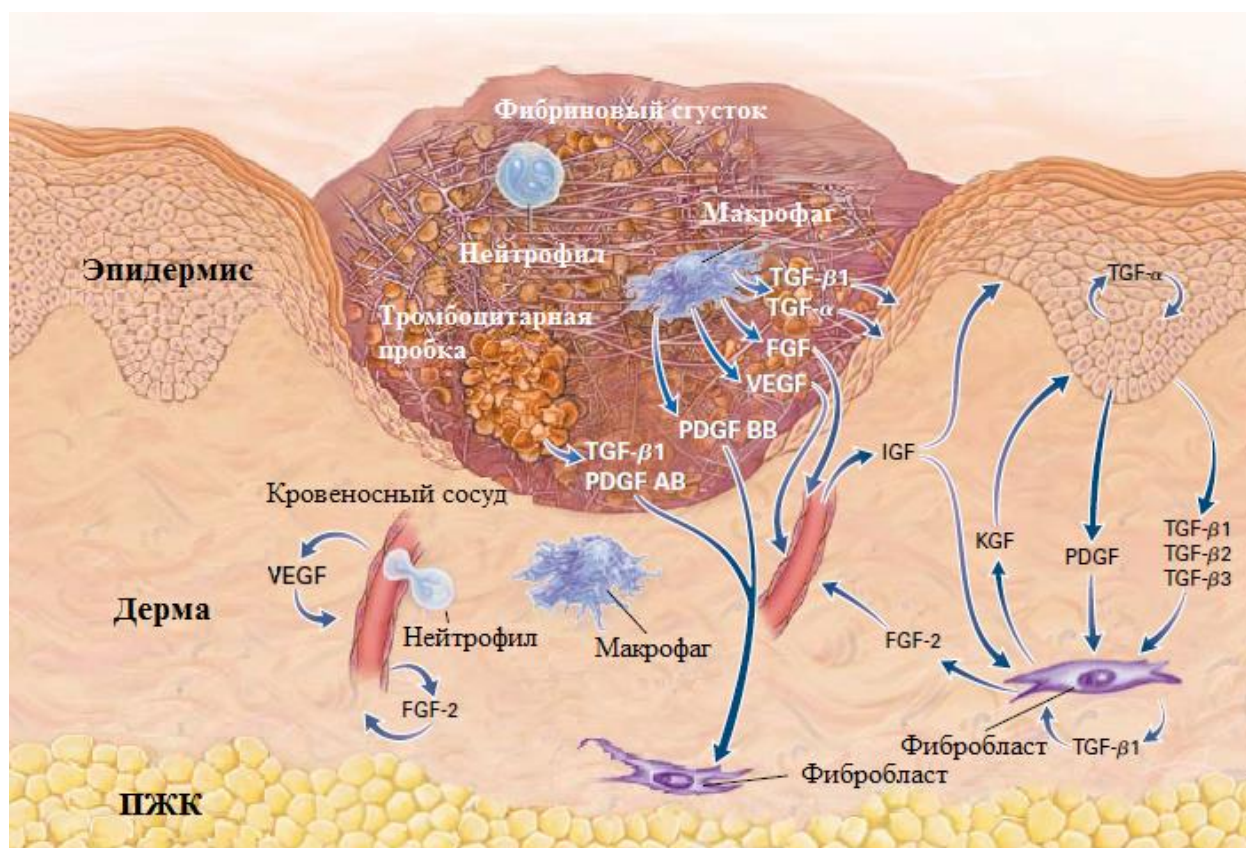


Рис. 4. Поражение кожи на 3 день после повреждения.

Показаны факторы роста, которые считаются необходимыми для перемещения клеток в рану. TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 обозначают трансформирующий фактор роста β 1, β 2 и β 3 соответственно; TGF α – трансформирующий фактор роста α ; FGF – фактор роста фибробластов; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; PDGF AB и PDGF BB –

тромбоцитарный фактор роста АВ и тромбоцитарный фактор роста ВВ соответственно; IGF – инсулиноподобный фактор роста; KGF – фактор роста кератиноцитов.

Макрофаги организуют размножение эндотелиальных клеток с прорастанием новых кровеносных сосудов, удвоением клеток гладкой мускулатуры. Образование кровеносных сосудов усиливает VEGF (*vascular endothelial growth factor* – фактор роста эндотелия сосудов), вырабатываемый клетками, а также FGF, который влияет не только на процесс ангиогенеза (*angiogenesis* – образование новых кровеносных сосудов), но и на реэпителизацию. Фаза воспаления длится до 3-5 дней [Mercandetti et al., 2005].

Вторая фаза – фаза пролиферации начинается примерно через 72 часа (Рис. 3). В эту фазу происходит восстановление сосудистой системы, заполнение раны грануляционной тканью (соединительная ткань, которая вместе с сосудами и лейкоцитам имеет розовый гранулярный вид).

Восстановление сосудистой системы, т.е. ангиогенез, имеет решающее значение для заживления ран и состоит из нескольких этапов (Рис. 5). Первый этап – вазодилатация (*vasodilatation* – увеличение просвета кровеносных сосудов) возникает в ответ на NO и повышенную проницаемость, индуцированную VEGF. Следующим этапом следует отделение перицитов (клетка Руже – отростчатая клетка соединительной ткани) от поверхности просвета, миграция эндотелиальных клеток в область. Далее идет пролиферация эндотелиальных клеток непосредственно позади передней границы мигрирующих клеток, ремоделирование в капиллярные трубки. Привлекаются периэндотелиальные клетки (перициты для маленьких капилляров и гладких мышечных клеток для крупных сосудов) для формирования зрелого сосуда, подавляется пролиферация и миграция эндотелия и отложение базальной мембраны [Kumar et al., 2012].



Рис. 5. Механизм ангиогенеза.

Заложение соединительной ткани на рубце происходит в два этапа: миграция и пролиферация фибробластов на место повреждения и отложение белков внеклеточного матрикса. Привлечение и активация фибробластов для синтеза белков соединительной ткани обусловлены факторами PDGF, FGFb (*basic fibroblast growth factor* – основной фактор роста фибробластов) и TGF β . Основным источником этих факторов являются воспалительные клетки, особенно макрофаги, которые присутствуют в местах повреждения и в грануляционной ткани. Участки воспаления богаты тучными клетками, также могут присутствовать лимфоциты. Каждый из этих типов клеток может секретировать цитокины и факторы роста, которые способствуют пролиферации и активации фибробластов. Грануляционная ткань постепенно накапливает фибробласты, которые синтезируют коллаген. Синтез коллагена, имеет решающее значение для развития прочности в месте заживления раны. Он начинается на раннем этапе заживления ран (дни 3-5) и продолжается в течение нескольких недель, в зависимости от размера раны. Известно, что при недостатке кислорода происходит нарушение продукции коллагена, что приводит к недостаточной прочности образующегося рубца. Для нормального заживления раны коллаген должен не только синтезироваться, но и разрушаться. Деградация коллагена запускается тканевыми коллагеназами, которые синтезируются воспалительными клетками, фибробластами и эпителиальными клетками. Старые волокна

коллагена разрушаются, а новые синтезируются, переплетаются между собой [Kumar et al., 2012].

Третья фаза – фаза эпителизации. В эту фазу наблюдаются два важных процесса: миграция и пролиферация клеток эпителия – независимые друг от друга стадии. Причем миграция клеток эпителия является доминирующим процессом. Известно, что поверхностные раны регенерируют очень быстро. Однако более глубокие раны, которые затрагивают не только эпидермис, но и дерму, как, например, ожоговые, требуют больше времени на регенерацию.

Независимо от типа повреждения, миграция начинается в базальном слое эпидермиса и в глубоко расположенных волосяных фолликулах и потовых железах. Стимулы для миграции и пролиферации эпителиальных клеток не известны, но есть несколько предположений. Отсутствие соседних клеток на краю раны (эффект «свободного края») может сигнализировать как о миграции, так и о пролиферации эпителиальных клеток. Мигрирующие эпителиальные клетки рассекают рану, отделяя высушенный струп от здоровой ткани. Если клетки эпидермиса должны мигрировать между дермисом и фибриновым сгустком, необходима деградация внеклеточного матрикса, которая зависит от производства коллагеназы, а также активации плазмина активатором плазминогена, продуцируемого эпителиальными клетками. Плазминоген является предшественником плазмина – протеазы, которая разрушает фибрин, а также активирует матричные металлопротеиназы (ММР – *matrix metalloproteinase*), которые могут разрушать коллагеновые нити. Это означает, что он вдвойне участвует в ремоделировании внеклеточного матрикса. Преобразование плазминогена в плазмин осуществляется активатором плазминогена типа урокиназы – u-РА и активатором плазминогена тканевого типа – tРА. uРА находится на эндотелиальных клетках и очень активен во время ангиогенеза. tРА находится в кровотоке, где он активирует фибринолиз (процесс растворения тромбов и сгустков

крови) и образование пламина. Пламиноген и пламин регулируют образование коллагена в ранах. С одной стороны, они разрушают фибрин, который в противном случае частично активирует миофиibroбласты для образования коллагена, а с другой стороны активируют скрытый $TGF\beta 1$, который пытается активировать указанные миофиibroбласты [Kallioniemi, 2010] (Рис. 6).

Через несколько дней после миграции переместившиеся клетки начинают делиться. Местное высвобождение факторов роста $FGFb$, EGF , KGF , $TNF\alpha$ и повышенная экспрессия рецепторов фактора роста также могут стимулировать процессы миграции и пролиферации [Singer, 1999].

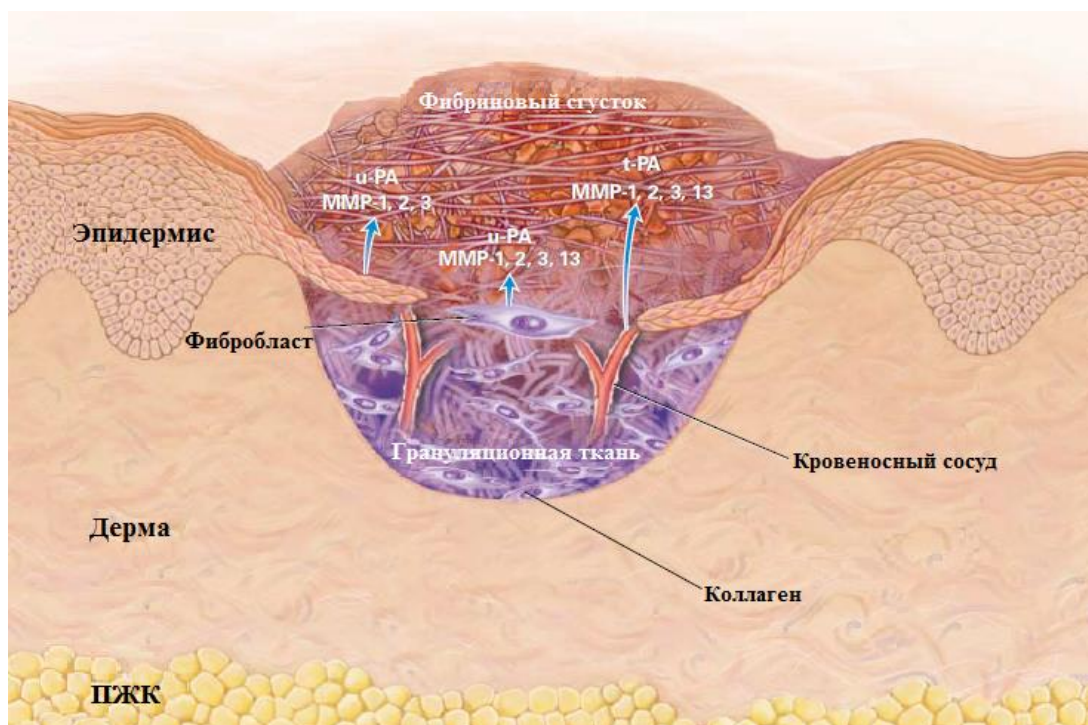


Рис. 6. Поражение кожи на 5 день после повреждения.

В кровеносных сосудах видны прорастания в фибриновый сгусток, так как эпителиальные клетки выходят на поверхность раны. Показаны протеиназы, необходимые для движения клеток. $u-PA$ – активатор пламиногена типа урокиназы; $MMP-1, 2, 3, 13$ – матричные металлопротеиназы 1, 2, 3, 13 (коллагеназа 1, желатиназа А, стромелизин 1

и коллагеназа 3 соответственно); t-РА –активатор плазминогена тканевого типа.

В результате эпителизации образуется тонкий слой эпителиальных клеток, который стягивает рану. Стягивание раны связано со сложным и великолепно организованным взаимодействием клеток, внеклеточного матрикса и цитокинов. В течение второй недели лечения фибробласты приобретают фенотип миофибробластов, характеризующийся большими пучками актинсодержащих микроволокон, расположенных вдоль цитоплазматической поверхности плазматической мембраны клеток. Появление миофибробластов соответствует началу уплотнения соединительной ткани и стягиванию раны. Максимальная прочность на растяжение раны достигается на 12-й неделе, и рубец имеет только 80% прочности на растяжение от исходной кожи, которую он заменил. Считается, что эпидермальные факторы роста играют ключевую роль в этой фазе заживления ран. Этот процесс может длиться до 4 недель в чистой и незагрязненной ране. В конечном счете грануляционная ткань развивается в рубец, состоящий из преимущественно неактивных веретенообразных фибробластов, плотного коллагена, фрагментов эластичной ткани и других компонентов внеклеточного матрикса (Рис. 3) [Mercandetti et al., 2005; Beanes et al., 2004].

В зависимости от природы и размера раны считается, что заживление ран кожи происходит первичным или вторичным натяжением. Одним из простейших примеров восстановления раны является заживление чистого, неинфицированного хирургического разреза, приближенного к хирургическому шву (Рис. 7).

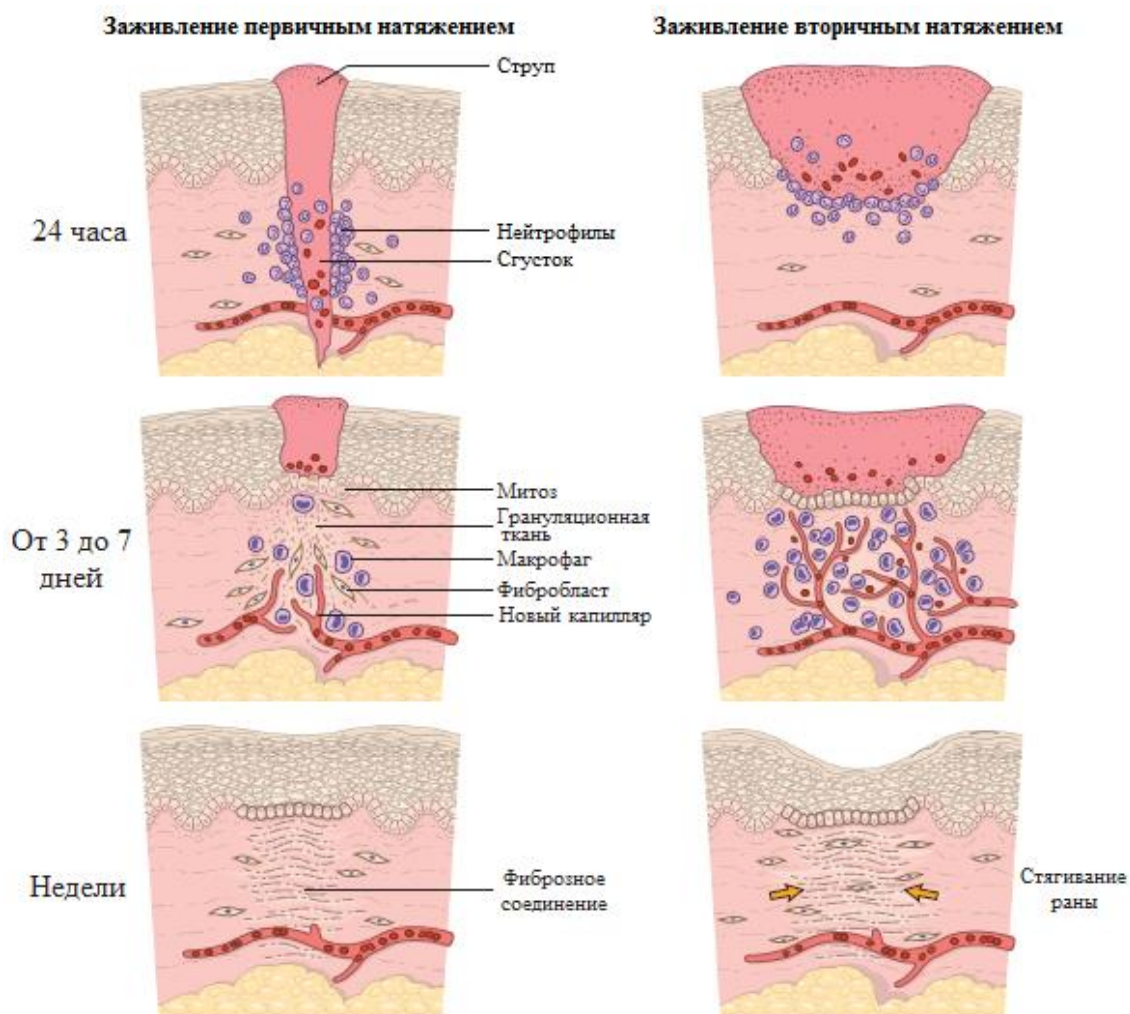


Рис. 7. Шаги в заживлении ран первичным натяжением (слева) и вторичным натяжением (справа).

Этот процесс заживления называется первичным натяжением. Разрез вызывает только очаговое нарушение целостности эпителиальных подповерхностных мембран и гибель относительно немногих эпителиальных и соединительнотканых клеток. В результате эпителиальная регенерация является основным механизмом восстановления. Образуется небольшой рубец, но наблюдается минимальное стягивание раны.

Когда потеря клеток или тканей более обширна при больших ранах, процесс восстановления проходит более сложно и включает в себя не только процессы регенерации, но и рубцевания. Такой тип заживления называется вторичным натяжением (рис. 6). При нем воспалительная

реакция более интенсивна, развивается обильная грануляционная ткань с последующим стягиванием раны, опосредованным действием миофибробластов. Вторичное натяжение отличается от первичного исцеления в нескольких отношениях. Во-первых, на поверхности раны образуется более крупный сгусток, богатый фибрином и фибронектином. Во-вторых, воспаление более интенсивно. В-третьих, большее воспаление требует большего объема грануляционной ткани. В-четвертых, большой объем грануляционной ткани обычно приводит к большей массе рубцовой ткани. И в-пятых, вторичное натяжение включает стягивание раны [Kumar, 2012].

Следует отметить, что в литературе приведено достаточное количество данных, показывающих сходство строения кожи, а также процессов заживления кожных покровов у человека и мышей [Dunn et al., 2013; Kallioniemi, 2010]. Поэтому, можно предположить, что биологические эффекты фуллерена, показанные на мышинных моделях, будут проявляться и у человека.

В данном разделе мы рассмотрели основные этапы, происходящие после поражения клеток кожи. Для понимания механизмов действия факторов роста, высвобождаемых различными клетками, необходимо проанализировать и оценить роль основных маркеров регенерации, ангиогенеза и воспаления, характерных для разных стадий заживления кожных ран.

1.3.2. Факторы роста и цитокины, участвующие в процессе регенерации

Факторы роста, участвующие в заживлении ран

Большинство факторов роста функционируют путем связывания специфических рецепторов клеточной поверхности и запуска биохимических сигналов в клетках. Основные внутриклеточные сигнальные пути, индуцированные рецепторами фактора роста, сходны с

такowymi многих других клеточных рецепторов, которые распознают внеклеточные лиганды. В целом, эти сигналы приводят к стимуляции или репрессии экспрессии генов. В данном разделе будет говориться об основных факторах роста, участвующих в заживлении ран.

Как говорилось выше, ангиогенез – один из важных механизмов, осуществляющих кровоснабжение пораженных тканей. Рассмотрим факторы роста, участвующие в этом процессе.

Среди них семейство факторов роста VEGF. Оно включает в себя сигнальные белки VEGF-A, -B, -C, -D и -E и PlGF (*placental growth factor* – плацентарный фактор роста). VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A* – фактор роста эндотелия сосудов типа A) обычно называют VEGF и он является основным индуктором ангиогенеза после травмы. VEGF-B и PlGF участвуют в развитии сосудов у эмбрионов. VEGF-C и -D стимулируют как лимфангиогенез, так и ангиогенез. Белки VEGF экспрессируются в большинстве тканей взрослого человека, но наибольшая экспрессия наблюдается в эпителиальных клетках [Kumar et al., 2012]. Кроме того, VEGF также повышает выработку активных факторов роста и цитокинов, необходимых для заживления ран [Fan et al., 2015].

VEGF-A продуцируется многими типами клеток, которые участвуют в заживлении ран: эндотелиальные клетки, фибробласты, тромбоциты, нейтрофилы и макрофаги [Bao et al., 2009]. Он играет ключевую роль в естественном заживлении кожных ран, привлекая клетки воспаления и стимулируя клеточную пролиферацию [Nafiu et al., 2015]. Также VEGF-A повышает проницаемость сосудов, индуцирует ангиогенез и васкулогенез (*vasculogenesis* – возникновение кровеносной сосудистой системы), способствует росту эндотелиальных клеток, способствуя миграции клеток и ингибированию апоптоза (*apoptosis* – запрограммированная гибель клеток), осуществляет регуляцию внеклеточного матрикса [Creuzet et al., 2002; Godwin et al., 2015].

Существенным признаком нормального заживления раны является образование грануляционной ткани, т.е. сосудисто-волокнистой ткани, содержащей фибробласты, коллаген и кровеносные сосуды. На месте раны новые сосуды появляются уже на 3-й день после поражения. Известно, что VEGF-A ускоряет образование кровеносных сосудов вокруг пораженной кожи. Он функционирует как митоген эндотелиальных клеток, хемотаксический агент. Были описаны другие факторы ангиогенного роста, такие как bFGF и TGF β , но VEGF-A уникален тем, что способен воздействовать на несколько компонентов ранеисцеляющего каскада, включая ангиогенез, эпителизацию и осаждение коллагена. Известно, что VEGF-A непосредственно увеличивает секрецию коллагеназы (MMP-1) и желатиназы А (MMP-2), а также индуцирует замедленную экспрессию uPA и tPA. Ген, ответственный за выработку VEGF-A, локализован у мышей в 17 хромосоме [Bao et al., 2009].

Стоит отметить, при раневых поражениях было показано резкое увеличение уровня экспрессии VEGF-A в кожной ткани мышей на 3-7 день после иссечения, далее происходило его понижение, и на 14 день экспрессия соответствовала таковой у интактных животных [Bao et al., 2009; Godwin et al., 2015; Johnson et al., 2014].

Важным регулятором экспрессии VEGF-A является гипоксия – пониженное содержание кислорода в ткани. Гипоксия ран может быть либо результатом плохого поступления кислорода через циркуляцию, либо связана с повышенным использованием кислорода гиперметаболическими клетками [Xing et al., 2011]. Индуктором гипоксии является HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 alpha* – гипоксией индуцируемый фактор 1-альфа) [Vural et al., 2010]. В коже мышей и человека HIF-1 α конститутивно экспрессируется в базальном слое эпидермиса [Rezvani et al., 2011]. Он модулирует экспрессию гена VEGF-A [Deppe et al., 2016]. HIF-1 α взаимодействует с HIF-1 β (*hypoxia-inducible factor 1 beta* – гипоксией индуцируемый фактор 1-бета) и регулирует транскрипцию генов,

вовлеченных в процессы гликолиза, ангиогенеза и метастазирования. Экспрессия *HIF-1α* зависит от концентрации кислорода в клетке, в то время как *HIF-1β* экспрессируется постоянно [Нефедова и др., 2015]. Потеря *HIF-1α* из фибробластов приводит к задержке заживления ран, уменьшению сосудистого снабжения раны и существенному ухудшению кожной неоваскуляризации [Duscher et al., 2015].

HIF-1α имеет важнейшие системные функции: регуляция продуцирования эритропоэтина почками у мышей с конститутивной эпидермальной делецией *HIF-1α* и гиперваскулярность после гиперэкспрессии эпидермального *HIF-1α*. Местная роль *HIF-1α* состоит в гомеостазе кожи, особенно во время старения эпидермиса [Rezvani et al., 2011]. Loh S.A. с соавторами показали, что у стареющих мышей при снижении *HIF-1α* происходит нарушение заживления ран [Loh et al., 2009].

Chen L. с коллегами показали, что в условиях стресса наблюдается повышение уровня экспрессии *HIF-1α* в кожных ранах [Chen et al., 2012]. Ген *HIF-1α* локализуется в 12 хромосоме у мышей. У взрослых мышей линии MRL (*Murphy Roth Large*) *HIF-1 α* является центральной молекулой в процессе регенерации [Zhang et al., 2015].

Важную роль в заживлении ожоговых ран выполняют гипоксия и транскрипционный фактор HIF (*hypoxia-inducible factor* – гипоксией индуцируемый фактор). Xing D. с соавторами показали, что усиление экспрессии HIF в ранах связано с увеличением ангиогенеза и более быстрым стягиванием раны. Повышенная метаболическая активность растущих, дифференцирующих и мигрирующих клеток в передней зоне ожоговой раны снижает уровень тканевого кислорода и, таким образом, обеспечивает сигнал через HIF (Рис. 8), чтобы обеспечить образование новых кровеносных сосудов через ангиогенез и васкулогенез посредством модуляции нескольких ключевых факторов, таких как VEGF-A, FGFB [Calvani et al., 2006; Xing et al., 2011].

По известным данным, HIF может также играть важную роль во время реэпителизации [Kalucka et al., 2013]. Chen L. с коллегами показали, что стволовые клетки выделяют значительно большее количество факторов роста FGFb, VEGF-A и цитокина IL-6 в условиях гипоксии [Chen et al., 2012].

Было показано, что вне зависимости от гипоксии экспрессию HIF-1 α в воспалительных клетках индуцирует TNF α [Mace et al., 2007]. Он увеличивал содержание белка HIF-1 α в клетках, выделенных через 1 и 5 дней после повреждения [Albina et al., 2001].

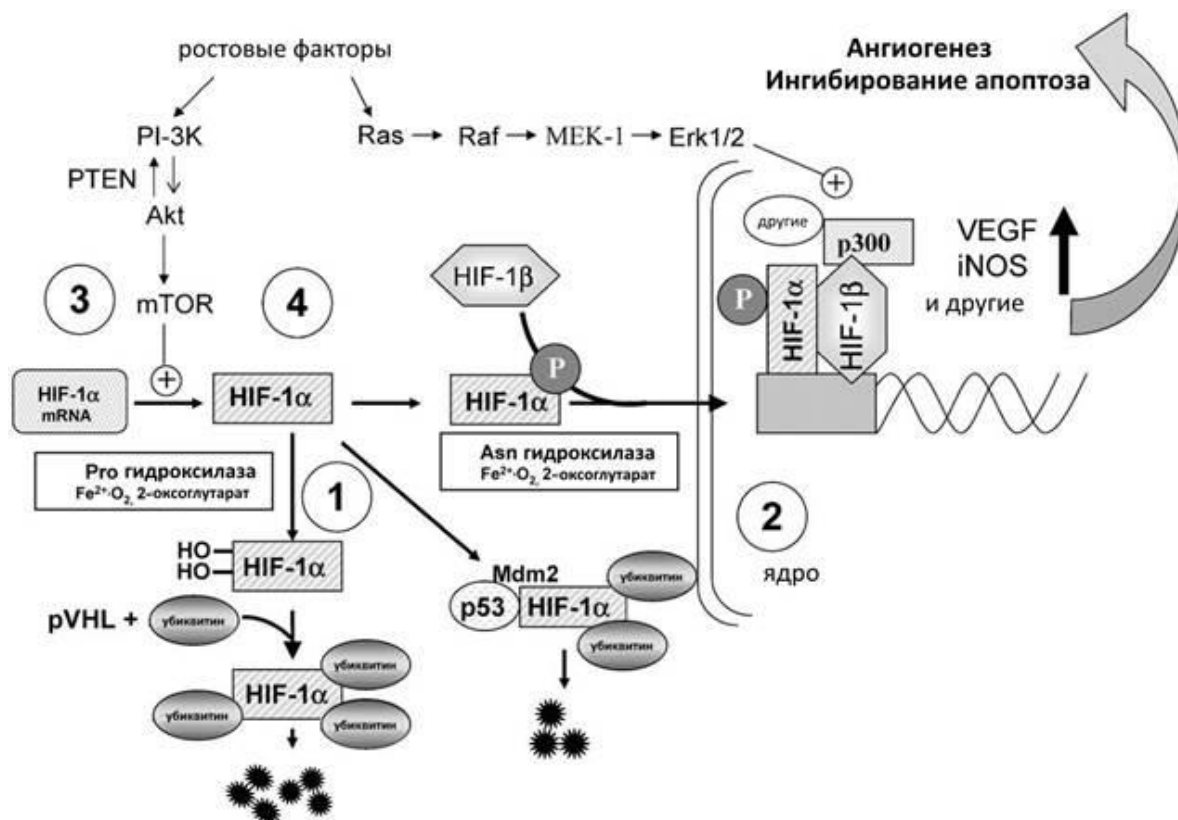


Рис. 8. Сигнальный путь HIF-1.

Существует четыре механизма регуляции HIF-1 α . 1 – убиквитинизация и деградация HIF-1 α посредством белка pVHL (protein von Hippel-Lindeau – белок Гиппеля-Линдау) или p53. 2 – трансаактивация HIF-1 уменьшается под действием Asn-гидроксилазы, которая уменьшает связывание с транскрипционным коактиватором p300. 3 – активация Akt

(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B – RAC-альфа серин/треонин-протеинкиназа, протеинкиназа B) и mTOR (mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина у млекопитающих) фосфатидилинозитол-3-киназой увеличивает уровень трансляции HIF-1 α . PTEN (phosphatase and tensin homolog – гомолог фосфатазы и тензина) является антагонистом. 4 – фосфорилирование p300 MAPK (mitogen-activated protein kinase — митоген-активируемая протеинкиназа) – сигнальным путем увеличивает формирование комплекса HIF-1/p300 [Proksch et al., 2017].

Другим семейством, отвечающим за образование кровеносных сосудов, является семейство факторов роста FGF. Оно насчитывает более 20 гепарин-связывающих белков. Наибольшей ангиогенной активностью обладает FGFb или FGF2. Он продуцируется многими типами клеток, в нормальной ткани присутствует в базальных мембранах и во внеклеточном матриксе кровеносных сосудов. FGFb участвует в ангиогенезе главным образом путем стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток. Он также способствует миграции макрофагов и фибробластов в поврежденную область и стимулирует миграцию эпителиальных клеток для покрытия эпидермальных ран [Kumar et al., 2012]. Стимулируя ангиогенез и рост фибробластов, он вызывает рост грануляционной ткани, заполняющей полость раны в начале заживления [Cao et al., 2003]. Результаты Nakamizo S. показывают, что FGFb также стимулирует пролиферацию кератиноцитов, особенно в среде с более низкой плотностью клеток, для восстановления кожной раны [Nakamizo et al., 2013]. В отличие от VEGF-A, высокие уровни экспрессии FGFb обнаруживаются сразу после ранения, но снижаются до исходного уровня на 3 день. FGFb высвобождается сразу после травмы, стимулируя экспрессию VEGF-A из соседних сосудистых гладких мышц и эндотелиальных клеток. Значительная экспрессия FGFb в раневой ткани начинается примерно через 8 дней после ранения, а пик экспрессии

отмечается на 12-14 дни. Влияние VEGF-A уменьшается, когда такие факторы, как FGFb, преобладают в регуляции более поздних стадий ангиогенеза, либо снижается гипоксия. Таким образом, VEGF начинает снижение до исходных уровней после первой недели, тогда как FGFb начинает свое второе увеличение из-за количества эндотелиальных клеток и фибробластов, высвобождающих FGFb [Bao et al., 2009].

Данные *in vivo* исследований показывают, что контролируемое высвобождение FGFb в ранах значительно ускоряет заживление ран, способствуя пролиферации клеток, стимулируя секрецию VEGF. Другие исследования показали, что FGFb регулирует высвобождение TGFβ1 [Wu et al., 2016], а также выступает в качестве триггера в заживлении ожоговых ран для повышения экспрессии TGFβ и VEGF [Fan et al., 2015]. Ген FGFb у мышей локализован в 3 хромосоме.

Третий важный фактор ангиогенеза – белок EGF (*epidermal growth factor* – эпидермальный фактор роста) [Safari et al., 2014]. EGF вырабатывается активированными макрофагами, слюнными железами, кератиноцитами и др. клетками. Он стимулирует образование грануляционной ткани, пролиферацию и миграцию кератиноцитов (клетки эпидермиса). Основная функция EGF состоит в стимуляции клеточного роста и клеточной дифференцировки эпителиального покрова. Он также участвует в процессе ангиогенеза [Kumar et al., 2012]. Известно, что EGF стимулирует синтез фибронектина, ангиогенез, фиброплазию и активность коллагеназы. Также было замечено улучшенное заживление ран в кожных ранах, которые обрабатывались EGF местно и подкожно. Ген, кодирующий белок EGF, локализован в 3 хромосоме у мышей. Известно, что EGF ингибируется TGFβ1.

Еще одним компонентом регенеративного процесса в ткани является белок из группы ядерных негистоновых белков HMG – HMGB1 (*high-mobility group box 1 protein* – белок высоко мобильной группы бокс 1) [Zhang et al., 2012].

Grellner и его коллеги показали, что белок HMGB1 способствует ускоренному заживлению ран [Grellner, 2002]. Важно отметить, что HMGB1 нарушает синтез коллагена, что в свою очередь, значительно снижает риск образования рубцовой ткани на месте раневого поражения. Ranzato E. с соавторами показали, что HMGB1 также способствует заживлению фибробластов путем индукции пролиферации и миграции клеток. Белок HMGB1 функционирует также, как цитокин и стимулирует заживление раны [Ranzato et al., 2010].

HMGB1 оказывает хемотаксическое действие на фибробласты кожи и кератиноиды *in vitro* [Straino et al., 2008]. Внеклеточные уровни HMGB1 оказывают влияние на качество заживления кожной раны [Dardenne et al., 2013]. Ген, кодирующий белок HMGB1, находится в 5 хромосоме у мышей.

Цитокины, участвующие в заживлении ран

Цитокины также могут функционировать как факторы роста и участвовать в образовании рубцов. Например, IL1 воздействует на фибробласты, стимулируя синтез коллагена, также может усиливать пролиферацию и миграцию фибробластов [Kumar et al., 2012]. Также к наиболее значимым цитокинам, участвующим в заживлении ран, относятся TGF β 1 (*transforming growth factor beta 1* – трансформирующий фактор роста бета 1), TNF α , IL1 α , IL1 β и IL6. Далее рассмотрим действие каждого из цитокинов на процесс регенерации кожного покрова.

Наиболее важным является цитокин TGF β 1. Он относится к семейству гомологичных полипептидов (TGF β 1, - β 2 и - β 3). Изоформа TGF β 1 широко распространена и обычно упоминается как TGF β . Этот цитокин вырабатывается тромбоцитами, Т-лимфоцитами, макрофагами, эндотелиальными клетками, кератиноцитами, гладкими мышечными клетками и фибробластами. TGF β 1 представляет собой противовоспалительный цитокин, который осуществляет ограничение и прекращение воспалительных реакций. Он делает это путем

ингибирования пролиферации лимфоцитов и активности других лейкоцитов. Мыши, лишенные $TGF\beta$, демонстрируют широкое воспаление и обильную пролиферацию лимфоцитов. $TGF\beta 1$ осуществляет хемотаксис для лейкоцитов и фибробластов, стимулирует выработку коллагена и ингибирует его деградацию; участвует в образовании рубцов после травмы [Kumar et al., 2012], отрицательно влияет на реэпителизацию, способствует пролиферации кератиноцитов в месте раны [Gurtner et al., 2008].

Фактор $TGF\beta 1$ является многофункциональным и играет роль во всех трех фазах раневого процесса. Он способствует проникновению воспалительных клеток, пролиферации фибробластов, миграции эпителия и производству внеклеточного матрикса [Godwin et al., 2015; Nafiu et al., 2015]. Он также повышает образование грануляционной ткани [Fan et al., 2015]. Сам ген $TGF\beta$ кодирует белок в 7 хромосоме у мышей.

Ангиогенез при заживлении ран сопровождается миграцией фибробластов в рану с последующим отложением коллагена. Фибробласты отвечают за синтез, осаждение и ремоделирование внеклеточного матрикса. Фактор роста $TGF\beta 1$ стимулирует фибробласты ткани вокруг раны. Число фибробластов в ране достигает пика на 7-14 дни после ранения, в то время как пик экспрессии гена $TGF\beta 1$ приходится на 14 день [Godwin et al., 2015].

Следующим провоспалительным цитокином является $TNF\alpha$. Представляет собой внеклеточный белок, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами. Влияет на липидный метаболизм, коагуляцию, устойчивость к инсулину, функционирование эндотелия, активирует лейкоциты, один из важных факторов защиты от внутриклеточных паразитов и вирусов. $TNF\alpha$ оказывает противовоспалительный эффект на ранней стадии ожога при низкой концентрации, а при высокой концентрации может вызвать синдром системного воспалительного ответа [Fan et al., 2015].

В различных исследованиях показано, что уровень TNF α значительно увеличен у людей, предрасположенных к нарушенному заживлению ран. Замедленное заживление острых ран у человека связано с увеличением уровня TNF α . Нейтрализация TNF α в воспаленном участке значительно ускорила скорость заживления ран [Ashcroft et al., 2012]. В то же при дефиците TNF α у мышей усиливаются процессы, которые сопровождаются усиленной экспрессией VEGF на месте раны [Werner et al., 2003]. Godwin A. с коллегами показали, что у мышей после раневого поражения максимальный уровень экспрессии гена TNF α наблюдался на 7 день, после чего происходило его снижение [Godwin et al., 2015]. В то же время данные Albina J.E. с соавторами показывают максимальную экспрессию TNF α на 10 день [Albina et al., 2001]. Ген TNF α расположен в 17 хромосоме у мышей. Известно, что TNF α стимулирует продукцию IL1, IL6, IL8, IFN γ (*interferon* – интерферон).

IL1 – цитокин, медиатор воспаления и иммунитета. Существует 2 формы данного цитокина: IL1 α и IL1 β . Доминирующей формой у человека является IL1 β , у мышей – IL1 α . IL1 α вырабатывается активированными макрофагами, нейтрофилами, эпителиальными и эндотелиальными клетками. Он играет важную роль в иммунорегуляторных процессах, а также в процессах метаболизма и кроветворения. IL1 α поддерживает повреждение различных тканей [Rider et al., 2011]. IL1 β продуцируется активированными макрофагами. Он является важным медиатором воспалительной реакции, также участвует в клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Arai K.Y. с соавторами показали, что эпидермис кожи экспрессирует высокие уровни мРНК IL1 α и относительно низкие уровни мРНК IL1 β . Фибробласты экспрессируют низкие, но не незначительные уровни IL1 β только в присутствии кератиноцитов, IL1 α не обнаруживается в фибробластах [Arai et al., 2014]. По результатам Gragnani A. с коллегами IL1 β был более выражен при большом ожоге, чем при небольшом [Gragnani et al., 2014]. Во время воспалительной фазы

заживления наблюдается повышение экспрессии цитокинов IL1 α , IL1 β и TNF α [Werner et al., 2003].

Уровень экспрессии гена IL1 β достиг пика на 7 день после раневого поражения по данным Godwin A. [Godwin et al., 2015], на 10 день – по данным Albina J.E. [Albina et al., 2001]. Оба гена IL α и IL1 β локализованы во 2 хромосоме у мышей [16].

Другой интрелейкин, высвобождаемый TNF α – IL6. Основное его свойство предусмотрено двумя противоположными действиями: провоспалительным и противовоспалительным. IL6 синтезируется активированными макрофагами и Т-клетками, стимулирует иммунный ответ. Особенно его роль велика при поражениях ткани, ожогах и других повреждениях, ведущих к воспалению. IL6 является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления [Krook, 2008]. Замечено, что у мышей при полном отсутствии IL6 ухудшалось заживление ран (наблюдалась задержка в реэпителизации), чрезмерные уровни IL6 вызывали зарубцевание [Werner et al., 2003]. Godwin A. с соавторами показали, что у мышей после раневого поражения уровень экспрессии гена IL6 принял два пика на 1 и на 7 день [Godwin et al., 2015]. Ген, кодирующий цитокин IL6, расположен в 5 хромосоме у мышей.

Недавние исследования показали, что провоспалительные цитокины, такие как IL1 α , IL1 β , IL6 и TNF α , активируются в келоидных тканях, что может привести к развитию хронического воспаления. Повышенные уровни этих цитокинов в коже говорят о развитии воспалительных заболеваний кожи [Ogawa, 2017].

1.3.3. Клеточный ответ на поражение кожного покрова

При моделировании ожоговых повреждений кожи имеет огромное значение исследование крови. Известно, что любой патологический процесс может в той или иной степени отразиться на количественных и качественных особенностях состава циркулирующей крови.

Кровь представляет собой жидкую подвижную соединительную ткань внутренней среды организма, которая состоит из плазмы и форменных элементов: лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов.

Лейкоциты представляют собой белые кровяные тельца. Главная их функция заключается в защите организма путем фагоцитоза. Известно, что при химических ожогах наблюдается лейкопения – уменьшение общего числа лейкоцитов. Это говорит о значительном снижении числа защитных клеток крови на фоне истощения организма после ожогового поражения [Ажикова и др., 2016].

Второй тип форменных элементов крови – это эритроциты (красные клетки крови). Они участвуют в транспортировке кислорода, который нужен всем органам и тканям. Известно, что на 3 день после ожога у животных наблюдалась эритроцитопения – снижение количества эритроцитов периферической крови. Белок, который обратимо связывается с кислородом, перенося его в ткани, называется гемоглобином. Он содержится в эритроцитах у позвоночных животных. При ожогах уровень гемоглобина снижается, что говорит о присутствии анемии. Объем эритроцитов в крови определяется таким показателем, как гематокрит. Он показывает способность крови переносить кислород. При ожогах объем циркулирующих эритроцитов уменьшается вследствие разрушения их в поврежденных тканях в момент травмы. У животных развивается анемия, вследствие чего сохраняется недостаточность обеспечения тканей кислородом [Ажикова и др., 2016].

Третий тип форменных элементов крови – тромбоциты (небольшие безъядерные сферические красные пластины крови), участвующие в свертывании крови. Они формируют тромбоцитарный агрегат, покрывающий место повреждения сосуда. Известно, что число тромбоцитов увеличивается (тромбоцитоз) в участках микрососудов с повреждёнными стенками при ожогах, травмах и кровопотерях.

Среди лейкоцитов выделяют гранулоциты (лейкоциты, содержащие в цитоплазме гранулы) и агранулоциты (лейкоциты, которые не содержат гранул в цитоплазме). В свою очередь, гранулоциты (полиморфноядерные лейкоциты) существуют трех подвидов: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы.

Нейтрофилы являются профессиональными фагоцитами и могут выделять продукты, которые активируют моноциты и макрофаги. Эти клетки усиливают фагоцитоз и образование АФК. Основным видом нейтрофилов являются зрелые сегментоядерные нейтрофилы, циркулирующие в крови. Они составляют от 13 % до 30 % общего количества лейкоцитов крови у мышей и имеют сегментированное ядро. Сегментоядерные клетки участвуют в захвате патологических организмов, как в крови, так и в тканях. Нейтрофилы, имеющие палочкообразное ядро без характерной для зрелых нейтрофилов сегментации, называются палочкоядерными. Они составляют в норме 1-5 % лейкоцитов крови. Функция палочкоядерных нейтрофилов заключается в созревании до сегментоядерных. Они не могут проходить сквозь стенку сосуда и не передвигаются к месту поражения.

Что касается эозинофилов, то они участвуют преимущественно в разрушении опухолевых клеток, а также способствуют восстановлению поврежденной ткани. Базофилы же высвобождаются из костного мозга после попадания инфекции в организм и перемещаются к месту заражения. Они способны высвобождать медиаторы воспаления, в том числе, гистамин, который вызывает расширение и повышение проницаемости капилляров вблизи базофила [Kariyawasam et al., 2006].

К агранулоцитам относятся моноциты и лимфоциты. Моноциты представляют собой крупные зрелые одноядерные клетки. Они являются наиболее активными фагоцитами периферической крови. Активированные моноциты осуществляют противоопухолевый, противовирусный, противомикробный, противозачаточный и противопаразитарный

иммунитет. На фоне истощения организма, стрессов, ожогов и травм наблюдается уменьшение моноцитов – моноцитопения. Как правило, она сочетается с уменьшением лейкоцитов.

Лимфоциты составляют 60-78% от всего числа лейкоцитов в крови мышей. Главная функция лимфоцитов состоит в узнавании чужеродного антигена и участии в иммунном ответе организма. По происхождению лимфоциты подразделяются на: Т-лимфоциты и В-лимфоциты. При подсчете лейкоцитарной формулы рассчитывается относительное (процентное) содержание как Т-, так и В-лейкоцитов, поэтому увеличение или снижение лимфоцитов не может отражать истинный (абсолютный) лимфоцитоз или лимфопению, а быть только следствием снижения или повышения абсолютного числа лейкоцитов других видов (например, нейтрофилов).

Таким образом, кровеносные сосуды оказываются наиболее уязвимым объектом для действия продуктов свободнорадикального окисления липидов. Однако известно, что такое вещество, как фуллерен C₆₀ является природным антиоксидантом и может заметно ускорять заживление кожного покрова при различных повреждениях [Zhou et al., 2010].

1.3.4. Терапия кожных поражений

Терапия кожных поражений – одна из актуальных задач современности. На сегодняшний день существует огромное количество лекарственных препаратов, улучшающих регенерацию тканей. В данной работе использовались два лекарственных средства: «Д-пантенол» (ООО «Нижфарм», Россия) и «Бепантен плюс» (GP Grenzach Produktions, Германия).

Активным веществом препаратов «Д-пантенол» и «Бепантен плюс» является декспантенол (R-2,4-дигидрокси-N-(3-гидроксипропил)-3,3-

диметилбутанамид). По химической структуре он является производным пантотеновой кислоты (витамин B5) (Рис. 9) [Proksch et al., 2017].

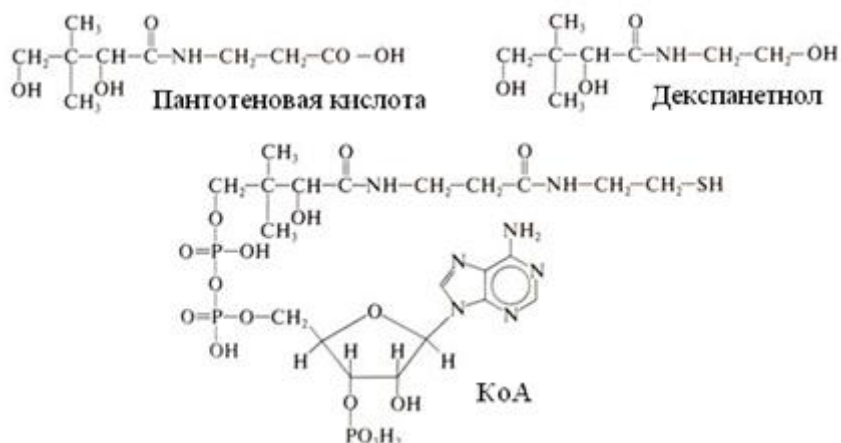


Рис. 9. Химические структуры пантотеной кислоты, декспантенола и КоА

В организме декспантенол переходит в пантотеновую кислоту, которая является составной частью кофермента А (КоА). КоА необходим для полноценного обмена в тканях, нормального клеточного метаболизма, так как участвует в процессах ацетилирования, углеводном и жировом обменах, синтезе ацетилхолина, стеролов, стероидных гормонов и порфинов. Кофермент А стимулирует регенерацию кожи, слизистых оболочек, нормализует клеточный метаболизм, ускоряет митоз и увеличивает прочность коллагеновых волокон. Таким образом, «Д-пантенол» и «Бепантен плюс» устраняют недостаток пантотеновой кислоты в дерме, благодаря этому улучшается регенерация поврежденного эпидермиса и дермы, проявляется слабый противовоспалительный эффект [Proksch et al., 2017].

«Бепантен плюс» помимо декспантенола содержит антисептик хлоргексидин (1,6-ди-(пара-хлорфенил-гуанидо)-гексан), который является дихлорсодержащим производным бигуанида (Рис. 10).

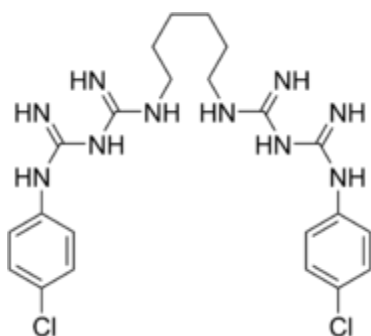


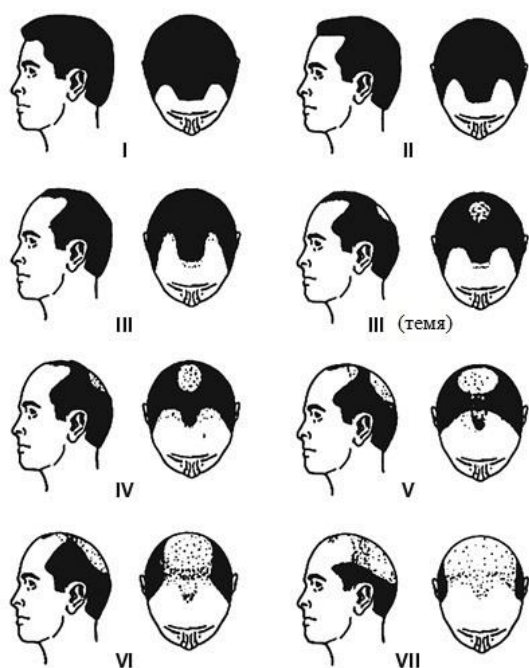
Рис. 10. Химическая структура хлоргексидина

Хлоргексидин активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Его механизм действия заключается во взаимодействии с фосфатными группами на поверхности клетки бактерий, в результате происходит смещение осмотического равновесия, нарушение целостности клетки и её гибель. Таким образом, «Бепантен плюс» обладает противомикробным, противовоспалительным действием и улучшает регенерацию тканей [Proksch et al., 2017].

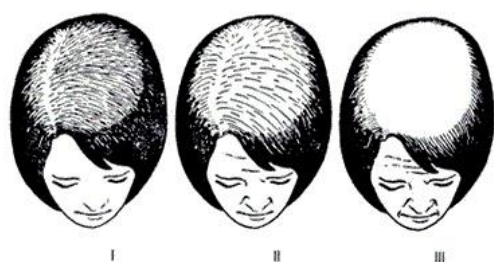
1.4. Алопеция

Алопеция (лат. alopecia – облысение) – патологическое состояние, характеризующееся усиленным выпадением волос главным образом на волосистой части головы в результате морфофункциональных изменений волосяных фолликулов [Самцов и др., 2008]. Установлено, что окислительный стресс является важным фактором, вносящим свой негативный вклад в развитие алопеции.

Различают алопеции врожденные и приобретенные (андрогенетическая, очаговая, диффузная, рубцовая и др.) [Солошенко, 2009]. На рис. 11 представлены основные виды приобретенных алопеций.



Андрогенетическая алопеция по шкале
Гамильтона-Норвуд (мужской тип облысения)



Андрогенетическая алопеция по шкале Людвиг
(женский тип облысения)



Очаговая алопеция



Диффузная алопеция



Рубцовая алопеция

Рис. 11. Виды алопеций.

1.4.1. Патогенез развития алопеций

В развитии облысения важную роль играют нарушения работы нервной, эндокринной систем, изменения иммунного статуса, дисбаланс микроэлементов, наличие хронических инфекций, генетическая предрасположенность, а также наличие хронического воспалительного процесса в организме. Перечисленные факторы влияют на цикл развития волоса. Ежедневно, в норме, человек теряет до 100 волос. При потере

большого количества волос и невозможности компенсации возникает облысение [Иванов и др., 2006].

Согласно данным на 2008 год, облысением страдают примерно 1,7 % населения планеты. В таблице 1 представлена распространенность алопеций в различном возрасте среди мужчин и женщин.

Табл. 1. Заболеваемость алопециями (на 100 000 человек).

	Мужчины							Женщины						
Возраст, лет	0-1	1-3	3-14	14-25	25-40	40-60	60+	0-1	1-3	3-14	14-25	25-40	40-60	60+
Количество заболевших, чел.	2	5	27	309	309	567	709	0,5	2	18	272	272	491	608

Среди данного заболевания наиболее распространенной является андрогенетическая форма (androgenetic alopecia), на которую приходится примерно 95% всех случаев облысения у мужчин и от 20 до 90% у женщин (по разным источникам). Прослеживается зависимость между появлением облысения и этнической принадлежностью: например, китайцы лысеют в 2 раза реже, чем мужчины Кавказа, еще реже облысение встречается у представителей негроидной расы.

Андрогенетическая алопеция (АГА) характеризуется очагами облысения в лобной и теменной областях у мужчин, а также разрежением волос в этих же областях у женщин [Rashid et al., 2010].

Патология связана, главным образом, с генетически обусловленными нарушениями метаболизма андрогенов в коже волосистой части головы [Самцов и др., 2008]. АГА обычно начинается в пубертатном периоде. Ведущую роль в развитии данного облысения играют дисфункции эндокринных желез (гипо- или гиперфункция гипофиза, гипо- или гипертиреозидизм, гипопаратиреоз, заболевания надпочечников, синдром склерокистоза яичников) и генетические факторы. Чаще других в патогенезе АГА участвуют тестостерон, альдостендиол, дегидроэпиандростерон [Иванов и др., 2006].

Патогенез АГА сложен, однако можно выделить, по меньшей мере, три механизма его развития. Первый механизм, имеющий место, как у мужчин, так и у женщин заключается в следующем. Под действием фермента 5-альфа-редуктазы, обнаруженного в клетках волосяной луковицы и волосяного сосочка, тестостерон трансформируется в более активный андрогенный гормон — 5-альфа-дигидротестостерон (ДГТ) (рис. 2) [Inui et al., 2013]. Гормон проникает в клетку и образует «активированный комплекс» с цитоплазматическим белком. Этот андроген-рецепторный комплекс переходит в клеточное ядро и после ряда биохимических реакций нарушает синтез протеинов. В результате чего происходит уменьшение размеров волосяных фолликулов с постепенной трансформацией жестких волос в пушковые. У женщин развитие алопеции связано с ферментом ароматазой, трансформирующим тестостерон в эстрадиол, а ДГТ — в эстрон (Рис. 12). Образующиеся при этом эстрогенные гормоны оказывают модулирующий эффект на действие андрогенов. Помимо описанных двух типов развития андрогенной алопеции, выделяют еще третий тип, механизм которого основан на выявлении «периферического андрогенизма». Он характеризуется тем, что сродство рецепторов волосяных фолликулов к тестостерону и активность 5-альфа-редуктазы в лысеющих участках выше, чем в нелысеющих, именно поэтому в лысеющих участках в 5-альфа-дегидротестостерон превращается большее количество тестостерона, чем в норме. По данному механизму идет развитие АГА у мужчин на фоне нормального уровня андрогенов в периферической крови — в отличие от женщин, у которых АГА в подавляющем большинстве случаев развивается на фоне гиперандрогении. При слабо выраженной гиперандрогении развивается алопеция по женскому типу, при значительной гиперандрогении — по мужскому типу [Солошенко, 2009].

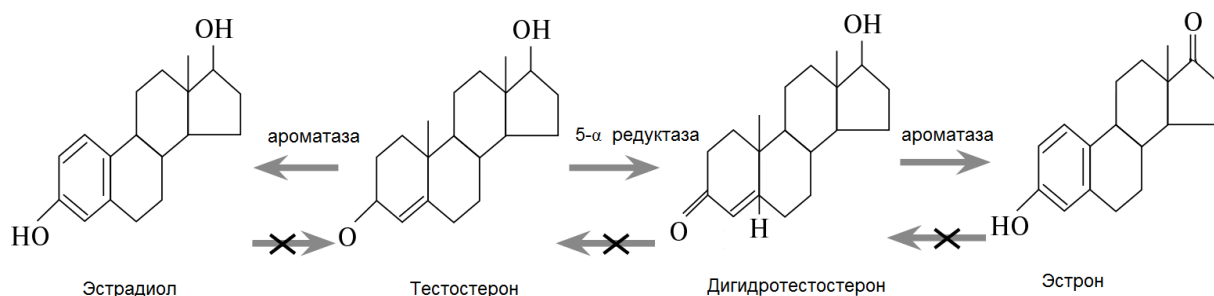


Рис. 12. Превращение тестостерона в дигидротестостерон и эстрадиол, ДГТ в эстрон

Вторым по распространенности видом является диффузная (симптоматическая) алопеция (*alopecia effluviums*). Согласно данным, опубликованным в 2005 году, среди пациентов с диагнозом «диффузная алопеция» 57% составляли мужчины и 43% — женщины [Овчаренко, 2009]. Это заболевание характеризуется распространенным диффузным выпадением волос, связанным с нарушением физиологической смены фаз роста волоса [Самцов и др., 2008]. Данное облысение может являться осложнением тяжелых общих заболеваний: сифилиса и болезней соединительной ткани, эндокринопатии, или развиваться при лихорадке, родах, недостаточном питании, отравлении, длительной цитостатической терапии или лучевом воздействии [Иванов и др., 2006].

Другой вид алопеции — очаговая алопеция (*alopecia areata*). Частота эпизодического проявления данной формы заболевания варьируется от 0,5 до 2,5% в зависимости от популяции и географического региона. Очаговая алопеция проявляется выпадением волос преимущественно на волосистой части головы и на лице, или потерей волос во всех областях тела. В 1-2 % случаев облысение может распространяться на всю кожу головы [Wasserman et al., 2007].

Основными причинами заболевания являются генетическая предрасположенность, атопия, органоспецифические аутоиммунные

реакции, эмоциональные стрессы и очаговая инфекция [Martinez-Mir et al., 2007].

В патогенезе заболевания важную роль играют нарушения нервной системы, дисфункции эндокринных желез, нарушения системы гемостаза и другие. При очаговой алопеции нарушается динамика цикла роста волоса с преждевременным вступлением части волосяных фолликулов в фазу телогена. Для объяснения причины возникновения данного заболевания предложены две гипотезы. Первая предполагает, что возникновение очага облысения происходит в результате перехода фолликулов в фазу телогена от одной точки к периферии по типу расходящихся волн. Другая гипотеза объясняет возникновение алопеции тем, что в патологический процесс одновременно вовлекаются только те волосяные фолликулы, которые находятся в 6 периоде фазы анагена, характеризующиеся наивысшей митотической активностью [Самцов и др., 2008].

На долю рубцового облысения (scarring alopecia) приходится около 1-2% от всех случаев алопеций. Данные алопеции встречаются у мужчин и женщин всех возрастов [Rash et al., 2010]. Рубцовая алопеция развивается в результате физических повреждений (ожогов), а также бактериальных (туберкулез, сифилис, карбункул, фурункул и других), вирусных (опоясывающий лишай, ветряная оспа), грибковых инфекций (глубокая трихофития, фавус), болезни соединительной ткани (красная волчанка, склеродермия) [Самцов и др., 2008].

В данном разделе мы рассмотрели патогенез, этиологию и клинические признаки алопеций. Для понимания механизмов роста и развития фолликулов, а также для детального изучения патогенеза заболевания, необходимо проанализировать и оценить роль основных маркеров алопеции, характерных для каждого конкретного вида патологии.

1.4.2. Рост и развитие фолликул

Волосяной фолликул (ВФ) (folliculus pili), или волосная луковица (bulbus pili) – это расширение конечной части корня волоса, состоящее из эпителиальных клеток. Он находится в гиподерме (hypodermis) кожи – третий слой кожи после эпидермиса и дермы (Рис. 13). Волосная луковица состоит из трех сегментов: нижнего, перешейки и воронки [Афанасьев и др., 2012].

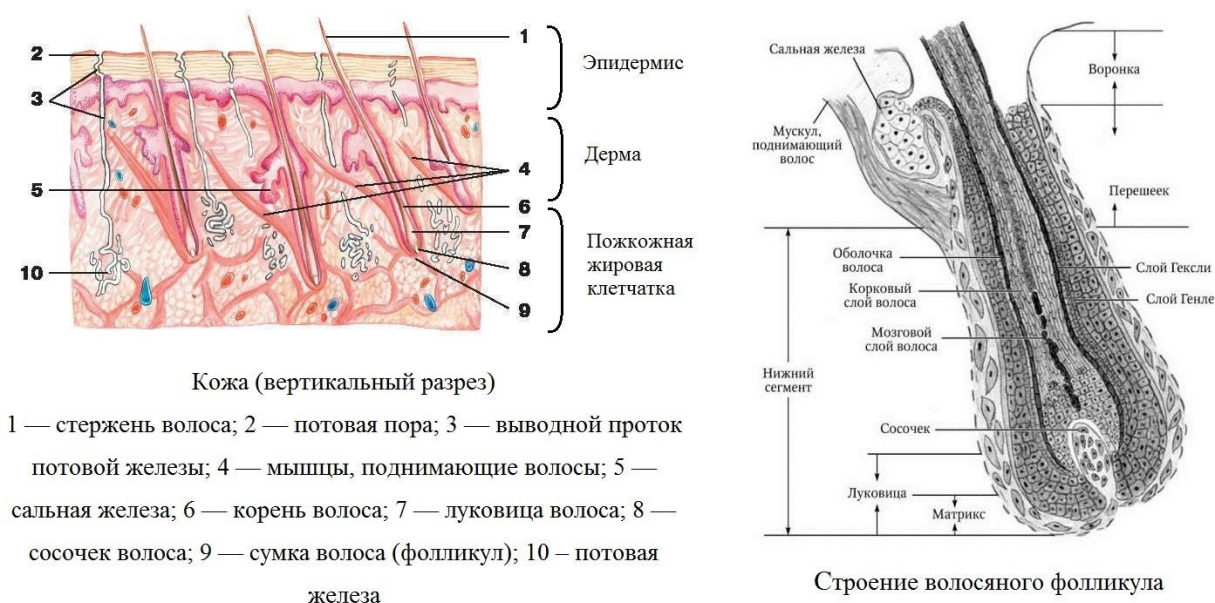


Рис. 13. Расположение и строение волосного фолликула

Нижний сегмент (inferior) расположен между основанием фолликула и местом прикрепления мышцы, поднимающей волос. Он представляет собой волосную луковицу, с которой сливаются внутреннее и наружное корневые влагалища. Нижняя часть волосной луковицы называется матриксом и состоит из недифференцированных клеток фолликулярного эпителия, среди которых встречаются меланоциты и клетки Лангерганса. В нижнюю часть луковицы также вдается соединительнотканый (волосной) сосочек, богато снабженный сосудами. Внутреннее корневое влагалище простирается от матрикса до места впадения протока сальной железы, формируется эпителиальными клетками луковицы и состоит из

кутикулы внутреннего влагалища, гранулосодержащего слоя Гексли и бледно-клеточного слоя Генле. А наружное корневое влагалище образовано неороговевающими фолликулярными клетками, соединяющимися в области впадения протока сальной железы с клетками эпидермиса, который в области воронки своими эпидермоцитами образует верхнюю часть влагалища. Перешейка (istmus), или средняя часть волосяного фолликула локализована между участком прикрепления мышцы, поднимающей волос, и местом впадения выводного протока сальной железы. Третья часть фолликула представлена воронкой (infundibulum), которая соединяет место впадения протока сальной железы с устьем фолликула. Она представляет собой стержень, окруженный наружным корневым влагалищем, который является продолжением эпидермиса [Самцов и др., 2008].

В луковице происходит активное митотическое деление фолликулярных клеток. Оно обеспечивает рост волоса со скоростью 1 см в месяц и длится от 2 до 7 лет (фаза анагена) (Рис. 14). В эту фазу идет активное образование пигмента – меланина, обуславливающее окраску волосяного стержня. После фазы анагена наступает промежуточная фаза катагена (2-4 недели), во время которой меланин не образуется, фолликул несколько сокращается и его основание перемещается вверх по направлению к поверхности кожи. После этого волос переходит в стадию отдыха (фаза телогена), продолжающуюся 3-6 месяцев. Во время телогена волос может легко выдергиваться или спонтанно выпадать. С момента самопроизвольного выпадения начинается рост нового волоса из того же фолликула. Из каждого волосяного фолликула может вырасти от 20 до 30 волос. Выпадение волос является нормальным процессом обновления эпидермиса [Афанасьев и др., 2012]. В норме 80-90% волос находятся в фазе роста (анагене), 1-2% – в фазе деградации (катагене), и около 10-15% – в фазе отдыха (телогене) [Нажмутдинова и др., 2010].

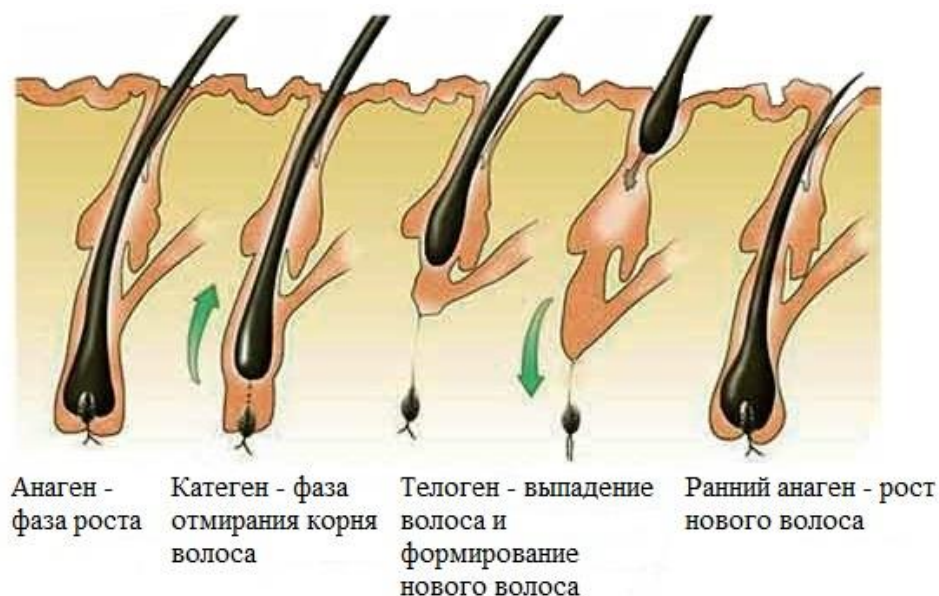


Рис. 14. Фазы роста волос.

В развитии алопеции задействован ряд факторов, регулирующих рост и развитие волосяных фолликул. Самый важный из них – Wnt10b (wingless-type MMTV (Mouse mammary tumor virus) integration site family, member 10B – семья «бескрылого» типа связанного сайта мышиного вируса рака молочной железы, член 10b) – белок семейства Wnt. У мышей семейство Wnt насчитывает 19 представителей. А ген *Wnt10b* локализован в 15 хромосоме.

В ряде исследований стало известно, что Wnt10b стимулирует рост волос [Lei et al., 2014; Oujj et al., 2006], и экспрессия этого гена сильнее в фазе анаген, чем в фазах катаген и телоген [Li et al., 2011]. Lim с соавторами показали, что экспрессия *Wnt10b* снижается у людей с очаговой и андрогенетической алопецией [Leiros et al., 2012].

Для передачи сигнала внутрь клетки белки семейства Wnt связывают соответствующий рецептор или группу рецепторов на поверхности клетки, образуя таким образом – Wnt-сигнальный путь. Среди рецепторов для Wnt-лигандов, первыми были открыты рецепторы семейства Fz (в переводе с англ. frizzled – «кудри», «завитой»). Белки Fz относят к обширной группе рецепторов, связанных с G-белками, или GPCR (G-protein-coupled receptors

– G-белковые рецепторы). Они осуществляют передачу сигнала внутрь клетки посредством влияния на гетеротримерные G-белки [Lim et al., 2014].

Помимо Fz-рецепторов на поверхности клетки расположены и другие белки, способные акцептировать лиганды Wnt. Среди них — семейство рецепторных молекул LRP (LDL (Low-density lipoprotein)-receptor-related protein – ЛПНП (липопротеин низкой плотности)-рецептор связанный белок). Белки LRP содержат единственный трансмембранный домен, который и обеспечивает передачу Wnt-сигнала внутрь клетки [Tamaï et al., 2000]. У позвоночных выделены два члена семейства LRP (LRP5 и LRP6), способные связывать белки Wnt [Pinson et al., 2000].

Передача сигнала от лигандов Wnt может также осуществляться с помощью альтернативных рецепторов Ror1, Ror2 (Retinoid acid-related orphan receptors – рецепторы, ассоциированные с рецепторами ретиноевой кислоты) и Ryk (Receptor related to tyrosine kinase – рецепторы, связанные с тирозинкиназой). Ror1 и Ror2, рассматривают как корецепторы неканонического сигнального пути Wnt. Являясь структурно близкими гомологами, они принадлежат к семейству рецепторных тирозиновых киназ RTK (receptor tyrosine kinase – рецептор тирозинкиназы) [Gordon et al., 2006].

Комбинация Wnt, его рецептора и корецептора определяет тип запускаемого сигнального каскада. На настоящий момент выделяют три сигнальных каскада, активируемых белками семейства Wnt. Среди них один канонический, или β -катениновый сигнальный путь, и два неканонических: Wnt/Ca²⁺-сигнальный путь и путь клеточной поляризации (PCP – planar cell polarity).

Среди сигнальных каскадов канонический сигнальный путь Wnt изучен наиболее подробно. Он задействован в широком спектре биологических процессов, начиная с эмбрионального развития и заканчивая регенерацией тканей взрослого организма. На клеточном

уровне канонический сигнальный путь вовлечен в регуляцию пролиферации и дифференцировки, а также в поддержание популяции стволовых клеток [Clevers, 2006].

Ключевым событием при активации канонического сигнального каскада Wnt является стабилизация β -catenina (β -катенина), в связи с чем данный сигнальный путь также называют β -катениновым сигнальным путем. В отсутствие активирующего сигнала концентрация β -катенина в ядре и цитоплазме поддерживается на сравнительно низком уровне. Это достигается при помощи специального белкового комплекса «деструкции», включающего белки Axin и APC (adenomatous polyposis coli – аденоматозная полипозная палочка) и протеинкиназу GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β). В составе комплекса β -катенин подвергается фосфорилированию, что служит сигналом для его последующей деградации [Weeraratna, 2005].

Активация канонического сигнального пути Wnt (Рис. 15) связана с образованием тройственного комплекса, состоящего из Wnt-лиганда, рецептора из семейства Fz и корецептора LRP5/6 [Tamai et al., 2000]. Формирование тройственного комплекса приводит к транслокации на мембрану ряда белков, среди которых Dvl (в переводе с англ. disheveled – «растрепанный»), Axin и GSK-3 β , а также к разрушению комплекса «деструкции» и ингибированию фосфорилирования β -катенина [Bilic et al., 2007]. Стабилизированный β -катенин накапливается в цитоплазме, после чего транслоцируется в ядро, где активирует Т-клеточные факторы (TCF – T-cell factors) направляющие β -катенин на гены-мишени Wnt, регулирующие экспрессию множества генов [Weeraratna, 2005].

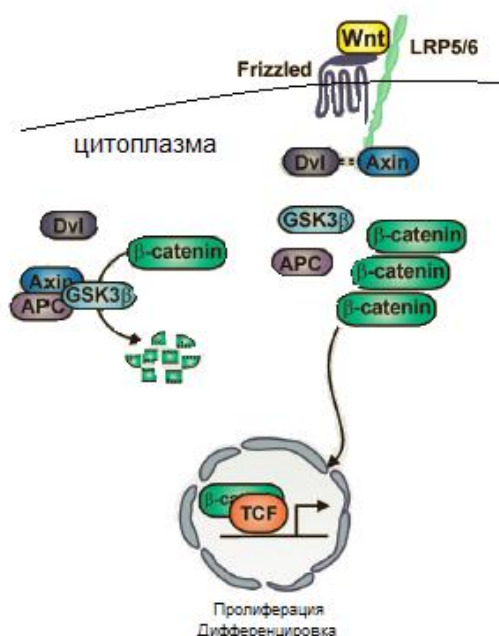


Рис. 15. Канонический Wnt-сигнальный путь

Одним из важных активаторов АГА является DKK1 (dickkopf-related protein 1 – dickkopf-связывающий белок, в переводе с нем. dickkopf – «толстая голова» или «упрямец») [Kwack et al., 2008]. Он является ингибитором Wnt-сигнального пути: DKK1 конкурентно связывается с LRP5/6 и привлекает белок-рецептор Kremen, это взаимодействие способствует клатрин-опосредованной интернализации, что приводит к инактивации LRP, а GSK3β, Axin, APC формируют комплекс деструкции β-катенина, препятствуя, таким образом, Wnt-сигналикации [Mao et al., 2002]. Стало известно, что DKK1 ускоряет вступление волоса из стадии анаген в катаген, тем самым вызывая облысение [Kwack et al., 2012]. Мышиный DKK1 локализован в 19 хромосоме.

Не менее важное значение принадлежит Srd5a2 (steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 2) – 5-альфа-редуктаза 2) – гену, который кодирует фермент 5-альфа-редуктазу 2 в 17 хромосоме у мышей. 5-альфа-редуктаза 2 участвует в выработке андрогенов – гормонов, которые участвуют в мужском половом развитии [Kim et al., 2002]. Фермент отвечает за химическую реакцию,

которая преобразует гормон тестостерон в ДГТ в мужских репродуктивных тканях. Во время полового созревания эти два гормона также играют важную роль в развитии вторичных мужских половых признаков, таких как рост волос на лице и на теле, увеличение мышечной массы, и понижение тембра голоса. Как упоминалось ранее, данный фермент участвует в развитии АГА, переводя тестостерон в ДГТ, образование которого ведет к нарушенному синтезу белков.

Последние исследования показали, что такой фактор, как TNF α (tumor necrosis factor alpha – фактор некроза опухоли альфа) играет центральную роль в торможении роста ВФ и их в апоптозе при очаговой алопеции [Ruckert et al., 2000]. Shah с соавторами показали, что у пациентов с воспалительными заболеваниями применение анти-TNF α препаратов вызывает меньшее выпадение волос, однако механизмы не ясны [Shah et al., 2015]. Анализ TNF α -дефицитных мышей показал задержку в наступлении фазы катаген и было высказано предположение о том, что TNF α вызывает апоптоз в начале катагена [Mikkola, 2008]. Ген TNF α расположен в 17 хромосоме у мышей.

Немаловажное значение в АГА играет ген Foxp3 (forkhead box P3, в переводе с англ. forkhead – «вилочатая голова», box – «коробка»). Rossi с соавторами показали, что экспрессия этого гена понижена у пациентов с очаговой алопецией. Ген Foxp3 играет важнейшую роль в развитии и функционировании регуляторных Т-клеток, которые способствуют снижению иммунного ответа [Zhang et al., 2007], но в то же время сам ген играет важную роль в предотвращении аутоиммунных реакций. Ген Foxp3 расположен в X-хромосоме у мышей.

Foitzik с соавторами показали, что в индукции фазы катаген важную роль играет такой фактор, как TGF β 1 (transforming growth factor beta 1 – трансформирующий ростовой фактор бета 1), возможно, вследствие ингибирования пролиферации кератиноцитов и индукции апоптоза [Foitzik et al., 2000]. Также было показано, что ВФ мезенхимальных стволовых

клеток человека дифференцируются в клетках гладкой мускулатуры в ответ на TGF β , однако, точные механизмы процесса пока не ясны [Liu et al., 2013]. Сам ген TGF β 1 кодирует белок в 7 хромосоме у мышей и выполняет множество клеточных функций, в том числе процессы клеточного роста, пролиферации, дифференцировки и апоптоза [Ghadami et al., 2000].

Особая роль в росте ВФ принадлежит гену Shh (ген назван в честь персонажа видеоигры, в переводе с англ. *sonic hedgehog* означает «звуковой еж»). Он играет ключевую роль в регуляции органогенеза позвоночных, например, в росте пальцев на конечностях, росте зубов [Dassule et al., 2000] и организации мозга [Rash et al., 2011; Scholpp et al., 2006]. Он контролирует деление стволовых клеток у взрослых организмов и участвует в развитии некоторых видов рака [DeSouza et al., 2014]. Ген Shh локализован в 5 хромосоме у мышей.

Активация Shh пути индуцирует переход волосяного фолликула из телогена в анаген [Schmidt-Ullrich et al., 2005]. При активации этого пути белок Shh связывается со своим трансмембранным рецептором – Ptc (в переводе с англ. *patched* – «заштопанный»). В ответ на связывание Shh с Ptc, второй трансмембранный белок Smo (в переводе с англ. *smoothened* – «сглаженный») активируется и стабилизируется (Рис. 16). Активированный Smo инициирует сигнальный каскад. Smo генерирует внутриклеточные сигналы, которые регулируют несколько протеинкиназ. Данные протеинкиназы активизируют класс транскрипционных факторов, известных как белки: Ci (*Cubitus interruptus*, в переводе с лат. *cubitus* – локоть, *interruptus* – адрес) и Gli (*Glioblastoma* – глиобластома). Активированный Smo усиливает транскрипцию Gli-генов, которые необходимы для правильной дифференциации и пролиферации клеток во время эмбрионального развития. Генетические исследования показали, что Shh-путь опосредуется через активацию четырех белков: Ptc, Fu (в

переводе с англ. fused – «плавленный»), Cos-2 (costal-2, в переводе с англ. costal – «реберный») и Ci/Gli [Choudhry et al., 2014].

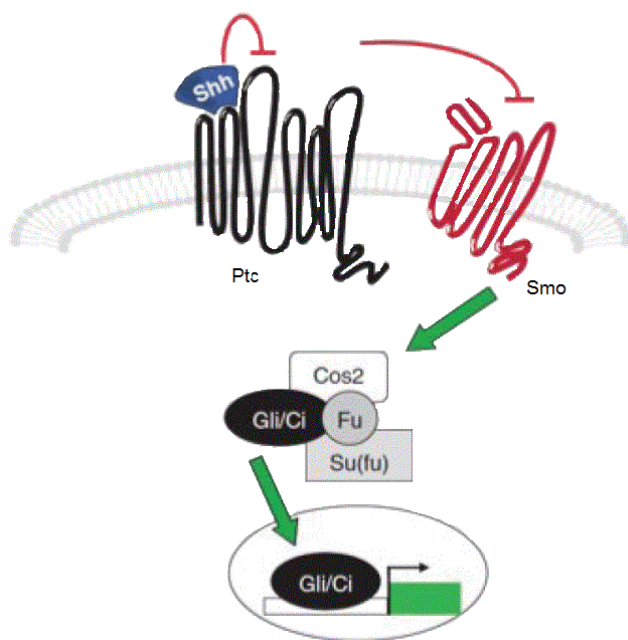


Рис. 16. Активация Shh-пути.

Было показано, что мощными индукторами выпадения волос являются IL1a (Interleukin-1 alpha – интерлейкин 1 альфа) и IL1b (Interleukin-1 beta – интерлейкин 1 бета) [Lu et al., 2013, Tazi-Ahnini et al., 2001]. IL1a вырабатывается активированными макрофагами, нейтрофилами, эпителиальными и эндотелиальными клетками. Он играет важную роль в иммунорегуляторных процессах, а также в процессах метаболизма и кроветворения [Barland et al., 2004]. Есть предположение, что IL1b может ингибировать рост эпителиального матрикса волос паракринным способом регуляции [Ruckert et al., 2000]. IL1b продуцируется активированными макрофагами. Он является важным медиатором воспалительной реакции, также участвует в клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Увеличение производства IL-1b вызывает ряд различных аутовоспалительных синдромов [Masters et al., 2009]. Оба этих гена у мышей локализованы во 2 хромосоме.

Антагонистом IL1a и IL1b является IL1RN (interleukin 1 receptor antagonist – интерлейкин 1 рецептор антагонист). Он ингибирует деятельность IL1a и IL1b [Perrier et al., 2006], активируя рост волос [Lu et al., 2013; Tazi-Ahnini et al., 2001]. IL1RN секретируется различными типами клеток, включая клетки иммунной системы, эпителиальные клетки, адипоциты. Мышиный IL1RN локализован во 2 хромосоме.

В месте образования нового ВФ должна образоваться новая кровеносная сеть для его питания. В образовании кровеносной сети участвуют нижеперечисленные факторы.

VEGF-A (vascular endothelial growth factor A – фактор роста эндотелия сосудов A) специфически воздействует на эндотелиальные клетки и обладает различными эффектами, в том числе повышает проницаемость сосудов, индуцирует ангиогенез (процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани), васкулогенез (возникновение кровеносной сосудистой системы) и рост эндотелиальных клеток, способствуя миграции клеток и ингибированию апоптоза (запрограммированная гибель клеток) [Creuzet et al., 2002].

Yano с соавторами показали, что ген VEGF способствует перифолликулярной васкуляризации у мышей (обеспечение кровеносными сосудами ВФ) во время фазы роста волос (анаген). Помимо этого, он увеличивает темп роста волос и фолликул в размере. Блокада VEGF-опосредованного ангиогенеза приводит к нарушению роста волос [Yano et al., 2001]. Мышиный VEGF-A локализован в 17 хромосоме.

Другим фактором, отвечающим за образование кровеносных сосудов, является FGFb или FGF2 (basic fibroblast growth factor – основной фактор роста фибробластов). В нормальной ткани FGFb присутствует в базальных мембранах и в субэндотелиальном внеклеточном матриксе кровеносных сосудов. Одной из важнейших функций FGFb является стимуляция роста эндотелиальных клеток и ангиогенеза. FGFb является более мощным ангиогенным фактором, нежели VEGF. Помимо этого,

данный фактор является важным участником процесса заживления ран. Стимулируя ангиогенез и рост фибробластов, он вызывает рост грануляционной ткани, заполняющей полость раны в начале заживления [Cao et al., 2003]. Zechel с соавторами показали, что FGFb участвует в регуляции синаптической пластичности и процессах, отвечающих за память [Zechel et al., 2010]. Ген FGFb у мышей локализован в 3 хромосоме.

Lin с соавторами показали, что FGFb способствует росту волос у мышей путем индукции фазы анаген в состоянии покоя. Кроме того, он индуцирует β -катенин и Shh в ВФ [Lin et al., 2015]. Carnicero с соавторами показали, что FGFb резко увеличивает количество клеток, экспрессирующих ранние маркеры волосяных клеток во время эмбрионального развития у птиц [Carnicero et al., 2004].

Еще одним фактором, усиливающим кровообращение кожи головы и восстанавливающим ВФ, является EGF (epidermal growth factor – эпидермальный фактор роста). Кроме того, он стимулирует пролиферацию и миграцию кератиноцитов. EGF ингибируется TGF β 1. Исследования Mak и Chan показали, что непрерывная экспрессия EGF предотвращает вхождение ВФ в фазу катаген, предположительно из-за того, что эпидермальный фактор роста выступает в роли выключателя, который включается и выключается в ВФ в начале и в конце фазы анагена цикла волос [Mak et al., 2003], в то время как более ранние исследования сообщали о том, что EGF задерживает развитие ВФ. Основная функция EGF состоит в стимуляции клеточного роста и клеточной дифференцировки эпителиального покрова. Ген EGF локализован в 3 хромосоме у мышей.

На сегодняшний день ведутся активные исследования влияния генов, вовлеченных в патогенез развития ВФ. Так, например, Schneider с соавторами, изучая морфогенез ВФ, показали, что развитие ВФ у мышей может быть разделено на три фазы: индукция, органогенез и дифференцировка клеток (Рис. 17) [Schneider et al., 2009].

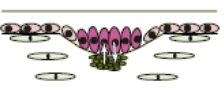
Индукция		Органогенез		Дифференцировка
Стадия 0	Стадия 1 (плакода)	Стадия 2 (зародыш)	Стадии 3-5 (колышек)	Стадии 6-8 (луковица)
				
Взаимодействие активаторов и ингибиторов, создающих индуктивное поле в эпидермисе (предросток). Специализированные кожные фибробласты собираются под предростком.	Видимый росток волос (плакода). Активация роста плакод: <i>Wnt/β-катенин</i> . Ингибирование роста плакод вблизи клетки: <i>Dkks (Dkk1, 2 и 4)</i> .	Пролиферация зародышевых клеток эпидермиса волос: <i>Shh, Wnt (10b, 10a), FGFs</i> . Формирование кожного сосочка: <i>Shh</i> .	Наружная оболочка корня: <i>Sox9, Shh/Smo</i> . Внешняя оболочка корня: <i>GATA3, Cutl1 (CDP), BMPs/BMPR1a, Shh/Smo, Notch1/Jagged/Delta/ RBP-Jk</i> . Волосной стержень: <i>β-катенин, Wnt's и Lef-1, VDR (Рецептор витамина D)*, BMPs/BMPR1a, Shh/Smo, msx1 и 2, FoxN1/Nude, HoxC13, Notch1/Jagged/Delta/RBP-Jk*</i> . Формирование ВФ: <i>Shh**</i> , <i>Igfbp5, Eda A1, Krox-20, FoxE1, Runx3, Sox18</i> . Иннервация: <i>β-катенин, NCAM</i> . Пигментация: <i>FoxN1/Nude, SCF/c-kit, Notch</i> . Область луковицы: <i>BMPs/BMPR1a, Lhx2, Sox9, NFATc1, p63, Tcf3***, Rac1</i> , интегрины <i>α3b1</i> и <i>α6b4</i> . * только в постнатальном цикле волос ** асимметричный, поляризованный характер экспрессии в матрице волос *** без активации Wnt	

Рис. 17. Развитие волосяного фолликула

В фазу индукции на стадии образования плакоды большое значение имеют такие факторы как Wnt и β -катенин, которые запускают Wnt-сигнальный каскад. Основным фактором, регулирующим каскад на данной стадии развития ВФ, являются Dkk-белки. Начальная фаза органогенеза ВФ контролируется кроме β - катенина и Wnt10 такими генами ранних стадий развития ВФ, как Shh, FGF и TGF β . В фазу дифференцировки ВФ гены формирования плакоды и зародышевых листков уступают свою лидирующую роль ряду иных генов, участвующих уже в процессах формирования стержня волоса.

Изучение морфогенеза ВФ является необходимым этапом не только для понимания патогенеза заболеваний, связанных с выпадением волос, но и для разработки новых эффективных лекарственных средств для терапии алопеций.

1.4.3. Подходы к терапии заболеваний, связанных с потерей волос

Лечение облысения – одна из актуальнейших задач современности. Основные стратегии лечения строятся на использовании препаратов, блокирующих 5α -редуктазу или андрогенные рецепторы. Из лекарственных препаратов, на сегодняшний день, только два клинически доказали свою эффективность и безопасность при лечении андрогенетической алопеции и получили одобрение Европейского медицинского агентства (European Medicines Agency) и Управления контроля качества продуктов и лекарств в США (U.S. Food and Drug Administration) — препарат для топического (наружного) применения миноксидил и препарат для внутреннего применения финастерид (торговая марка проpecia), который рекомендуется только мужчинам.

Финастерид – препарат из класса антиандрогенных средств стероидной природы. Препарат является специфическим ингибитором 5α -редуктазы, причем вначале был разработан как лекарство для лечения гиперплазии простаты. Прием мужчинами финастерида 1 мг в сутки способствовал значительному увеличению общего количества волос по сравнению с плацебо [Van Neste et al., 2000]. Среднее увеличение количества волос по сравнению с исходным за 12 месяцев составило от 3,6% до 29,1% на верхушке головы и от 3,3% до 4,9% в лобной зоне [Price et al., 2006]. Прекращение приема финастерида обуславливает рецидив симптомов. Эффективность финастерида у женщин доказана не была [Price et al., 2000].

По химическому строению финастерид (N-трет-Бутил-3-оксо-4-аза-5альфа-андрост-1-ен-17бета-карбоксаимид) представляет собой гетероциклический стероид (4-азастероид) (рис. 8). 5α -редуктаза способствует переходу тестостерона в ДГТ, что постоянно происходит в ряде тканей (предстательная железа, ВФ) (Рис. 18). Известно, что основной механизм действия финастерида состоит в конкурентном ингибировании

5 α -редуктазы и снижении внутриклеточного содержания ДГТ в клетке, что предотвращает выпадение волос [Харкевич, 2010].

Финастерид активен при приеме внутрь и через 8 ч вызывает снижение уровня ДГТ, которое длится 24 ч. Препарат хорошо всасывается из пищеварительного тракта (около 60%). Метаболизируется в печени примерно 8 ч. Действие сохраняется до 24 ч. Выделяется почками и кишечником. Кроме того, препарат имеет ряд побочных эффектов, таких как гинекомастия, нарушение половой функции, тошнота, рвота, головная боль, депрессии, появление на лице пятен коричневого цвета, избыточное отложение кальция в костях и задержка их роста. Финастерид противопоказан при беременности и лактации, анемиях, нарушении функции печени и диабете [Аляутдин, 2004; Харкевич, 2010].

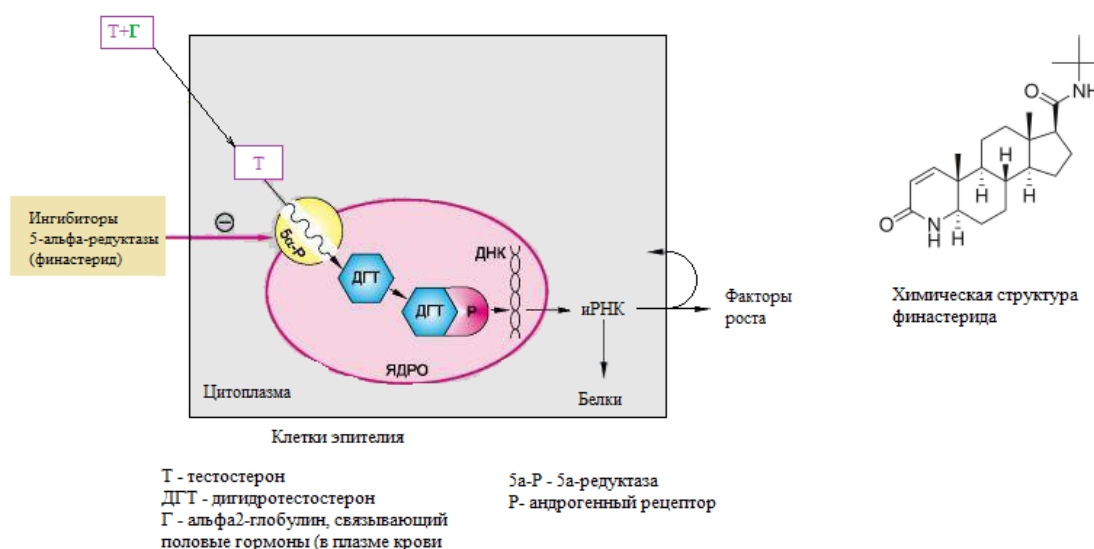


Рис. 18. Механизм действия и химическая структура финастерида.

Вторым препаратом для лечения АГА является миноксидил (6-(1-пиперидинил)-2,4-пиримидиндиамин-3-оксид) (Рис. 19). Миноксидил, в отличие от финастерида, который применяется орально, является топическим препаратом (применяется в виде 2 и 5% раствора). Миноксидил используется для восстановления роста волос при андрогенной и очаговой алопеции.

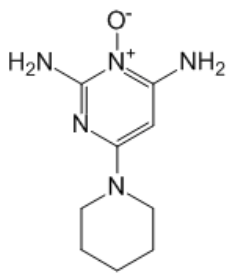


Рис. 19. Химическая структура миноксидила.

Изначально препарат был разработан как гипотензивное средство, но в 1982 г американский дерматолог Альфред Клигман обнаружил его стимулирующее влияние на рост волос. Активной формой препарата является миноксидил-сульфат, поскольку под действием фермента сульфотрансферазы непосредственно в коже головы осуществляется трансформация миноксидила [Аляутдин, 2004].

Показано, что данный препарат увеличивает скорость пролиферации клеток дермального сосочка ВФ, пролонгирует фазу анагена и укорачивает телоген, т. е. замедляет процесс облысения. Кроме того, показано, что миноксидил обладает выраженным сосудорасширяющим действием, благодаря которому значительно улучшается кровоснабжение волосяных фолликулов. Он влияет на транспорт ионов калия через клеточные мембраны (активатор калиевых каналов), что обуславливает повышение концентрации окиси азота и влияет на тонус сосудов [Rogers et al., 2008]. Однако следует отметить, что детально молекулярный механизм действия миноксидила не установлен.

Среди побочных эффектов препарата известны: раздражение, зуд, контактные дерматиты, крапивница, опухание, аллергия, снижение либидо и эректильной функции. После отмены препарата в течение 6 месяцев волосы могут опять начать выпадать. Любопытный феномен открыли исследователи из Германии. В экспериментах на мышах они обнаружили, что стресс сильно замедляет рост волос, запуская иммунные повреждения

фолликул, и миноксидил является лекарством против этого стресса [Arck et al., 2003].

В исследованиях на животных показано, что миноксидил сокращает фазу телогена, вызывая преждевременное вступление ВФ в фазу анагена. Миноксидил может также вызвать продление анагена и увеличивать размер волосяного фолликула. Существует ряд доказательств, что стимулирующий эффект миноксидила на рост волос также связан с открытием калиевых каналов сульфатом миноксидила, но на сегодняшний день это не доказано [Messenger et al., 2004].

В настоящее время в мире ведутся активные разработки перспективных методов восстановления волос при андрогенетическом облысении. Наибольшие ожидания у интересующихся этим вопросом связаны с технологиями клонирования волос и стимуляции роста новых волос.

Суть первой технологии состоит в клонировании волосяных фолликулов, взятых из андрогеннезависимых зон поверхности головы, с последующим внедрением полученных клонов в облысевшие участки кожи головы по специальной методике.

Разработки второй технологии основываются на установленном факте, что при заживлении ран на участках кожи с волосами активизируется белок, обозначаемый как Wnt, который способствует появлению на месте ранения новых волосяных фолликулов. Волосы, появляющиеся из них, нормально проходят все циклы развития. Ученые считают, что можно заставить Wnt производить новые фолликулы и на неповрежденной коже.

Известно, что такое вещество, как фуллерен C₆₀ является природным антиоксидантом и проявляет противовоспалительную активность, способствуя купированию окислительного стресса, который зачастую способствует развитию алопеции. Следует отметить, что в литературе приведено достаточное количество данных, показывающих

сходство процессов роста и развития волос у мыши и у человека [Zhou et al., 2009]. Поэтому, можно предположить, что биологические эффекты фуллерена, показанные на мышинных моделях заболеваний, будут проявляться и у человека.

1.5. Герпес-вирусные инфекции

1.5.1. Эпидемиология герпес-вирусных инфекций

Вирус простого герпеса (ВПГ) имеет очень широкое распространение в человеческой популяции, им инфицированы до 80-95% населения в разных регионах мира. Существует две разновидности ВПГ – вирус простого герпеса типа 1 (ВПГ1) и вирус простого герпеса типа 2 (ВПГ2). ВПГ1 передается главным образом через оральный контакт и вызывает в большинстве случаев оролабиальный герпес («простуда на губах»). Однако новые данные свидетельствуют о том, что ВПГ1 также является причиной генитального герпеса. ВПГ2 обычно передается половым путем, в результате непосредственного контакта и вызывает генитальный герпес. Распространенность ВПГ1 огромна, этим вирусом инфицированы более 3,7 млрд. человек в возрасте до 50 лет, или 67% населения. На территории России и СНГ различными формами герпесвирусной инфекции (ГВИ) ежегодно инфицируется около 20 млн. человек. Все вышеизложенное позволяет считать ГВИ, и в частности ВПГ-инфекции, важной медико-социальной проблемой современного здравоохранения.

1.5.2. Клинические особенности

Особенно опасна ВПГ-инфекция для лиц со сниженным иммунитетом. К группам риска относятся беременные женщины, ВИЧ-инфицированные лица, новорожденные дети. У новорожденных детей ВПГ-инфекция может вызвать хориоретиниты, микроцефалию, респираторные дисфункции, задержку развития, энцефалиты,

инвалидность и смерть. ГВИ урогенитального тракта являются одной из причин бесплодия, что негативно влияет на демографическую ситуацию. Первичная инфекция может протекать как в относительно легкой, так и в клинически тяжелой форме, вплоть до смертельного исхода. У большинства взрослых здоровых людей первичная ГВИ переходит в латентную форму, при которой вирус находится в нервных клетках в неактивном состоянии. Под влиянием многих факторов различной природы происходит реактивация ВПГ, приводящая к репликации вируса, к появлению клинически выраженных заболеваний, часто – в рекуррентной форме. ВПГ1/2 способны поражать различные органы и ткани, в том числе ЦНС, кожные покровы, слизистые оболочки. При диссеминированной инфекции приблизительно у 60% пациентов наблюдаются повреждения кожных покровов и развиваются тяжелые заболевания.

1.5.3. Подходы к терапии герпес-вирусных инфекций

Основные методы медикаментозного лечения заболевания сводятся к подавлению репродукции ВПГ в период обострения в виде мазей, гелей, суппозиториев. В то же время, известные специфические противовирусные препараты («Ацикловир»), используемые для лечения герпес-вирусных инфекций, имеют ряд существенных недостатков. Основной проблемой существующих терапевтических препаратов является устойчивость вируса к их действию, которая развивается в связи с появлением мутаций при длительном применении препаратов и при рекуррентных формах заболеваний.

1.6. Обоснование гипотез механизма действия фуллерена C₆₀

1.6.1. Об антиоксидантной активности фуллерена C₆₀

Механизм действия фуллеренов недостаточно изучен, в том числе неясно, каким образом происходит взаимодействие фуллерена с иммунной системой, поэтому антиоксидантные свойства фуллерена могут играть

важную роль. Воздействие стрессовых факторов стимулирует избыточный синтез свободных радикалов, таких как анион супероксида ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал (ОН) и нерадикальная перекись водорода (H_2O_2), что приводит к перекисному окислению липидов, белков, повреждению ДНК и гибели клеток. В ответ на окислительную атаку клетки выработали систему антиоксидантной защиты для поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза клеток и их защиты от повреждений. Классические антиоксидантные ферменты, которые могут напрямую инактивировать АФК и предотвращать реакции, инициируемые АФК, включают супероксиддисмутазу (СОД), каталазу и глутатионпероксидазу (GPx), глутатион (GSH) [Шершакова, 2016; Gharbi et al., 2005].

Имеются данные о том, что предварительная обработка фуллереном предотвращает отрицательные эффекты окислительного стресса за счет повышения активности антиоксидантных ферментов и/или прямого удаления АФК. Было продемонстрировано, что полигидроксिलированные производные фуллерена индуцируют эндогенные антиоксидантные ферменты фазы II через Nrf2/ARE-зависимые механизмы и ослабляют опосредованную окислительным стрессом гибель клеток, тем самым обеспечивая новое понимание механизмов антиоксидантных свойств фуллерена [Piotrovsky et al., 1998; Wakabayash et al., 2003].

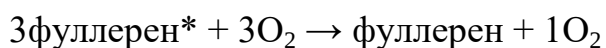
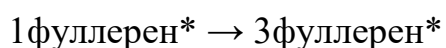
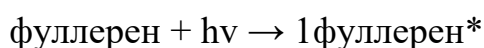
Цис-регуляторные элементы ответа на гипоксию (HRE) и антиоксидантного ответа (ARE), служащие мишенями транскрипционных факторов HIF1 и Nrf2, соответственно, опосредуют активацию транскрипции генов в ответ на гипоксию и окислительный стресс, свойственные многим солидным опухолям. На этом свойстве основано применение элементов HRE и ARE в конструкциях для генной терапии рака с целью обеспечения опухолеспецифической экспрессии терапевтических трансгенов или репликации онколитических аденовирусов [Shepelev et al., 2019].

Введение крысам чистого водного коллоидного раствора фуллерена C60 (C60FAS) в условиях стресса способствует накоплению Nrf2 в ядре и запуску экспрессии антиоксидантных ферментов фазы II через сигнальный путь Nrf2/ARE. C60FAS влияет на эндогенный гомеостаз глутатиона путем модуляции биосинтеза глутатиона, а также на защиту от перекисей посредством повышения активности и экспрессии белков GSH-родственных ферментов: γ -глутамат-цистеинлигазы (γ -GCL), GPx и глутатион-S-трансферазы (GST). При стрессовом воздействии C60FAS усиливает антирадикальную защиту за счет активизации супероксиддисмутазы марганца в клетках головного мозга и поддерживает его содержание в миокарде на контрольном уровне, что показывает, что использование C60FAS может представлять интерес в качестве потенциальной терапевтической стратегии для коррекции стрессовых состояний, вызванных окислительным стрессом [Михеев, диссертация, 2018; Gharbi et al., 2005].

Известно, что проведенные эксперименты на крысах показали, что водная дисперсия C60 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 интоксигировали CCl₄, что приводило к образованию трихлорметильного радикала CCl₃•, 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 интоксигированные CCl₄, не получали повреждения печени. Этот факт подтвердили и гистологические исследования, поэтому фуллерен C60 можно рассматривать как эффективное защитное средство против свободных радикалов.

Сравнительный анализ антиоксидантных свойств по отношению к кератиноцитам кожи человека различных производных фуллерена - PEG-

C60, PVP-C60, CD-C60, фуллеренол и C60-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., 2002; Chen Y. et al., 2004] на различных типах клеток, таких как нейронные клетки [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-дезоксид-рибозу (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 (1O_2) 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 1O_2 , 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 гидроксильная водорастворимая форма $C_{60}(OH)_{24}$, имеет низкую эффективность генерации 1O_2 по сравнению с чистым фуллереном C_{60} [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 цитрулина. Еще одно водорастворимое производное C_{60} 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].

1.6.2. О взаимодействии фуллерена C60 с арил-углеводородным рецептором

Арил-углеводородный рецептор

Арил-углеводородный рецептор (АУР) представляет собой лиганд-зависимый фактор транскрипции, который регулирует экспрессию генов в ряде клеток, включая иммунные и эпителиальные клетки. В здоровой коже передача сигналов АУР играет неотъемлемую роль в поддержании гомеостаза кожи, регулируя иммунную сеть кожи, дифференциацию кератиноцитов, функцию кожного барьера и пигментацию, а также реакцию на окислительный стресс [Bessede et al., 2014; Haas et al., 2016; Phadnis-Moghe et al., 2016].

АУР имеет решающее значение для поддержания гомеостаза, опосредуя ответы на ксенобиотики, и активируется широким спектром низкомолекулярных лигандов эндогенного и экзогенного происхождения. Однако функция этого рецептора не обязательно совпадает с функцией лигандов в общих иммунных ответах. Вероятно, это связано с тем, что АУР функционирует как регулятор транскрипции независимо от присутствия лигандов, а его функция дополнительно ими регулируется [Mimura et al., 1999].

В зависимости от конкретного лиганда связывание с АУР может приводить к индукции или репрессии различных генов, вызывая различные биологические ответы в многочисленных типах тканей. Например, связывание комплекса АУР-лиганд-ARNT с XRE (xenobiotic response element) в регуляторных областях различных генов-мишеней АУР,

индуцирует транскрипцию генов, кодирующих ферменты метаболизма ксенобиотиков, относящихся к энзимам первой фазы детоксикации: цитохромы P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP1B1 [Juricek et al., 2017; Larigot et al., 2018; Shepelev et al., 2019].

Количество белка, экспрессируемого генами–мишенями, снижается на 80–95% во многих моделях клеточных культур в течение 4 часов после обработки лигандом. После выхода из ядра АУР быстро разрушается в цитоплазматическом компартменте протеасомой. Протеасомная деградация АУР включает его ковалентное связывание с убиквитином [Matsumura, 2009].

Помимо прямого воздействия на транскрипцию генов, АУР может передавать сигналы через другие факторы транскрипции, такие как ядерный фактор κB (NF κ b) и фактор 2, связанный с ядерным эритроидным фактором (NRF2), чтобы модулировать экспрессию гена. Повышенная экспрессия NRF2 может приводить к активации сигнального пути NRF2 / HO–1, что, в свою очередь, может увеличивать антиоксидантную способность клеток [Miao et al., 2005].

То, как разные лиганды активируют АУР, вызывая разнообразные ответы, было областью исследований в течение многих лет. Хотя молекулярные механизмы связывания АУР и нижестоящей передачи сигналов еще предстоит полностью выяснить, его терапевтический потенциал при кожных заболеваниях, в частности атопического дерматита [Шершакова и др., 2016; Edamitsu et al., 2022], находится в центре внимания, учитывая растущие доказательства важной роли передачи сигналов АУР в регуляции воспалительных реакций и гомеостаза кожи.

Поскольку АУР необходим для нормальной дифференцировки и активации нескольких типов иммунных клеток, вполне вероятно, что общее противовоспалительное воздействие активации АНР, наблюдаемое *in vivo*, отражает его регулирующую роль в отношении Treg, Th17 и дендритных клеток. Характер про– или противовоспалительного действия

лигандов АУР может в значительной степени зависеть от типа клеток, на который они воздействуют. Многочисленные исследования показывают, что лиганды АУР участвуют в продукции медиаторов воспаления как в нормальных, так и в опухолевых эпителиальных клетках [Matsumura, 2009; Mitamura et al., 2018; Muku et al., 2017].

Гипотеза «О взаимодействии фуллерена C60 с арил-углеводородным рецептором»

Многие экспериментальные факты говорят о том, что фуллерен C60 и его производные проявляют разнообразные биологические эффекты, включая противовоспалительные, противовирусные, противоаллергические, противоопухолевые, антиканцерные, радиопротекторные и ряд других [Goodarzi et al., 2017]. Однако, ни механизм его биологического действия, ни его первичные молекулярные мишени в клетке, до настоящего времени так и не были установлены.

Молекула фуллерена C60 содержит 32 ароматических кольца и способна формировать комплексы с разнообразными соединениями, содержащими ароматические кольца за счет π - π -стекинг и ван-дер Ваальсовского взаимодействия (белки, нуклеиновые кислоты (НК) и клеточные мембраны другие биоконпоненты), некоторый вклад могут давать и водородные связи. Однако, подобные взаимодействия должны быть по определению неспецифичными. Например, известно, что НК и белки взаимодействуют с фуллереном, формируя корону на C60 кластерах в водной среде [Belgorodsky et al., 2006]. Важным представляется вопрос о возможности ли существование на или в клетках специфического рецептора для фуллерена, обеспечивающего соответствующий сигналинг?

Ароматическая природа молекул фуллерена предполагает их сходство с естественными ароматическими лигандами, для которых рецепторы известны. Так, например, известно, что арил-углеводородный рецептор (АУР или АНР) является транскрипционным фактором и активируется полиароматическими углеводородами (ПАУ) и

родственными структурами, связывание с которыми стимулирует транскрипцию генов, кодирующих ферменты, связанных с детоксикацией ксенобиотиков, особенно семейство белков цитохрома P450 [Fujii-Kuriyama et al., 2005]. АУР, также называемый диоксиновым рецептором, интенсивно экспрессируется на эпидермальных кератиноцитах. Комплекс ферментов P450 участвует в окислении многочисленных соединений, как эндогенных, так и экзогенных. Однако, поскольку рецептор способен активировать и эндогенные соединения, то его функция намного шире, чем просто детоксикация ксенобиотиков. Существование эндогенных лигандов дает основание считать, что АУР играет важную роль в обеспечении естественных физиологических функций клетки, обеспечивая адаптивный и врожденный ответ клетки на внешнее химическое воздействие и поддержание естественного метаболизма клетки [Puga et al., 2009]. Так, например, известно, что инициация экспрессии естественного защитного белка кожи филагрина в нормальных эпидермальных кератиноцитах происходит путем активации АУР, который стимулирует экспрессию гена OVOL1 [Tsuji et al., 2017].

АУР локализован как в цитоплазме, так и в ядрах большинства клеток позвоночных, причем рецептор способен связывать как природные, так и синтетические лиганды: флаваноиды, полифенолы, полициклические ароматические углеводороды и диоксиноподобные соединения и множество других. Все клетки кожи экспрессируют АУР. Самые высокие его уровни обнаруживаются во внешних слоях эпидермиса, меланоцитах, фибробластах и клетках Лангерганса [Esser et al., 2013]. В настоящее время уже известны сотни соединений, способных связываться с АУР [Stejskalova et al., 2011]. При этом не все лиганды являются агонистами, некоторые конкурентно ингибируют передачу сигнала от АУР [Savouret et al., 2001]. АУР обладает плеiotропной функциональностью, например, некоторые эффекторные лиганды стимулируют генерацию регуляторных клеток Treg, или пролиферацию Th17-клеток. Так АУР участвует в метаболизме

эндогенного триптофана, превращая его в важный фактор клеточного цикла, никотинамид адениндинуклеотид (НАД) [Van Voorhis et al., 2013; Quintana et al., 2008]. Установлено, что активация АУР важна и для иммунного ответа, подавления воспалительных процессов путем репрессии генов провоспалительных цитокинов и повышения экспрессии генов белков кожного барьера, филагрина и лорикрина [Hirano et al., 2017; Noakes et al., 2015]. Известно, что полиароматические соединения могут оказывать противовоспалительный эффект. Так, каменноугольные смолы еще в древности использовались при кожных воспалениях, особенно при лечении псориаза, хотя о механизме их действия мало что известно. Смола представляет собой чёрную вязкую жидкость, содержащую сложную смесь ароматических углеводородов и гетероциклических соединений (более 10000). По эффективности терапии мягкой и умеренной форм атопического дерматита она сравнима с 1% гидрокортизон-ацетатом. Схожий эффект имеет и смола Gleeter, получаемая из соевых бобов, она известна в Японии с 1924 г [McLean et al., 2013] и применяется для лечения кожных воспалений. Она обладает сильной антиоксидантной активностью и сходна по механизму действия с высокоэффективным эндогенным лигандом FICZ (6-формилиндоло(3,2-b)карбазол). Данные соединения, связываясь с АУР, способствуют увеличению экспрессии гена OVOL1 при моделировании АД, что сопровождается повышенной экспрессией гена белка филагрина. Вероятно, сигнальный путь «АУР – OVOL1 – филагрин» является весьма перспективной терапевтической мишенью для терапии АД [Takei et al., 2015].

Интересно отметить, что процедура получения указанных смол, высокотемпературная возгонка (900-1200 С) с конденсацией образуемого коксового газа в смолу, напоминают методики получения фуллерена, основанные на конденсации паров углерода при сгорании углеводородов при высокой температуре [Ozawa et al., 2006]. Не исключено, что указанные смолы могут содержать и фуллерен. Было также показано, что

ген OVOL1, связанный с активацией АУР, также экспрессируется в оболочке волосяного фолликула и регулирует его нормальную дифференцировку (рост волос) и влияет на структуру волосяного стержня. Экспрессия OVOL1, в свою очередь, координируется опосредовано Wnt-сигнальной цепью при развитии фолликула. У OVOL1-дефицитных мышей наблюдались явные нарушения роста волос и развития фолликулов [Takamichi et al., 2016], так что вероятно, именно активация АУР стимулирует рост волос вероятно через экспрессию OVOL1, который является перспективной мишенью при лечении алопеций [Tsuji et al., 2012].

Другими исследователями было показано, что при терапевтическом воздействии активные углеродные компоненты активируют АУР-сигнальный путь, что приводит к естественному дифференцированию эпидермальных клеток, повышению уровня филагтрина, лорикрина и торможению экспрессии генов, связанных с патологией АД (IL-4, STAT-6) [van den Bogaard et al., 2013]. Последние исследования показали, что нарушение барьерной функции имеет исключительное значение для развития не только атопического дерматита (АД), но и других аллергических заболеваний, включая астму, аллергический ринит и пищевую аллергию. Нормализация этой функции сильно зависит от характера активации АУР, определяемого природой лиганда [Hirano et al., 2017].

Одна из важных функций АУР также связана с окислительно/восстановительными реакциями, регуляцией редокс-гомеостаза клетки [Noakes et al., 2015].

Ранее было показано, что водные дисперсии фуллерена C60 обладают радиопротекторными свойствами, способны модулировать цитокиновый ответ и снижать аллергическое воспаление [Dellinger et al., 2009; Башкатова и др., 2012]. Недавно мы установили, что водный раствор кластеров фуллерена (ВРФ) проявляет лечебный эффект в

экспериментальной модели атопического (аллергического) дерматита, тормозя продукцию воспалительных цитокинов, а также значительно повышая экспрессию гена филагтрина [Shershakova et al., 2016]. Здесь прослеживается аналогия с противовоспалительными эффектами, описанными для экстракта полыни и смолами, описанными выше, в механизме действия которых задействован сигналинг через АУР. Следует отметить, что возможное взаимодействие фуллерена C60 с АУР может приводить к активации сигнального пути Nrf2/HO-1, что, в свою очередь, увеличивает антиоксидантную способность клеток и может обуславливать противовоспалительную активность фуллерена C60. Интересно, что в 2007 году Shin и др. [Shin et al., 2007] показали, что фармакологическая активация NRF2 с помощью CDDO-Im, 1-(2-циано-3,12,28-триоксоолеана-1,9(11)-диен-28-ил)-1H-имидазола, индуцирует экспрессию мРНК АУР (AHR) и экспрессию мРНК генов-мишеней первой фазы детоксикации ксенобиотиков Cyp1A1 и Cyp1B1 в эмбриональных фибробластах мыши (MEF), что указывает на то, что NRF2 напрямую регулирует транскрипцию AHR.

Известно, что экспрессия АУР может усиливаться при различных вирусных инфекциях, в том числе при герпесе и цитомегаловирусе [Chen et al., 2021]. В текущем году в журнале NATURE COMMUNICATIONS Giovannoni F. с соавторами АУР был предложен даже в качестве потенциальной терапевтической мишени для противовирусной терапии, в том числе COVID-19. В предварительных экспериментах по оценке изучению противовирусной активности ВРФ нами была показана его активность в отношении некоторых герпес-вирусов [Klimova et al., 2020]. Известно также, что комплекс фуллерена C60 с поли(N-винилпирролидоном) –C60/ПВП на модели вируса гриппа типа А (РНК-содержащий вирус) проявлял противовирусную активность, сравнимую с известным противогриппозным препаратом римантадином, но только в высокой концентрации (500 мг/мл и выше). Поскольку ПВП, используемый

в качестве матрицы для получения комплекса, сам по себе не обладает противовирусной активностью, то обнаруженную активность можно отнести на счет самого фуллерена, а дозу комплекса можно пересчитать на количество C60 [Piotrovsky et al., 1998.].

Рассматривая модель связывания C60 с АУР необходимо обратить внимание, что модель докинга комплекса АУР с сильным лигандом, тетрахлордibenзодиоксином, демонстрирует наличие его контактов с основным с гидрофобными аминокислотами АУР: фенилаланином- 318, изолейцином-319, аланин-328, метионин-342, лейцин-347 и 348, а также с гистидином-320. Рассчитано, что размер хороших лигандов должен быть около 12.0 Å, причем его планарность не обязательное требование, желательно его поляризуемость и электроотрицательность [Stejskalova et al., 2011]. С другой стороны известна единственная экспериментальная модель специфического связывания фуллерена с ВИЧ-протеазой, где фуллерен выступает как ее ингибитор. Установлено, что ВИЧ-протеаза имеет активный сайт в виде гидрофобной полости диаметром 10 Å, этот же примерный размер имеет и фуллерен. Благодаря высокой гидрофобности он прочно связывается с активный центр протеазы [Saleh et al., 2014]. Физическое сходство активных центров АУР и ВИЧ-протеазы указывает на возможность специфического связывания фуллерена с АУР.

Суммируя изложенные факты, мы предполагаем, что фуллерен может являться лигандом для АУР, как первичной мишени, и он способен активировать сигнальные пути, связанные с регуляцией воспалительных процессов. В этом контексте экзогенные АУР-лиганды можно подразделить на лечебные антиоксидантные (соевые и угольные смолы, фуллерен) и на воспалительные окислительные (диоксины) [Furie et al., 2015]. В случае первых их связывание с АУР приводит к усилению дифференцировки эпидермальных клеток, повышению уровня филагтрина и ингибированию IL-4/STAT6-сигнального пути.

Таким образом, при подтверждении представленной гипотезы о взаимодействии молекул фуллерена C60 с АУР возможно будет обосновать, в том числе, не только противовоспалительный, но и противовирусный и фолликулостимулирующий эффекты фуллерена C60.

Следует отметить, на сегодняшний день в литературе пока нет сведений о фуллерене C60, как вероятном лиганде для АУР за исключением наших публикаций [Shershakova et al., 2022; Ткачев и др., 2019.].

1.6.3. Роль макрофагов в иммунном ответе и обоснование гипотезы механизма противовоспалительной и ранозаживляющей активности фуллерена C60 «О способности фуллерена C60 влиять на хемотаксис, активность и профиль экспрессии генов макрофагов»

Макрофаги составляют основную популяцию резидентных в тканях мононуклеарных фагоцитов и играют ключевую роль в распознавании и элиминации бактерий, а также в поляризации врожденного и адаптивного иммунитета. Как эффекторные клетки врожденной иммунной системы, макрофаги обеспечивают первую линию защиты организма. Роль макрофагов в элиминации патогенов сопряжена и поддерживается в тонком балансе с их способностью повреждать собственные ткани хозяина. Макрофаги также иногда участвуют в противовоспалительных реакциях, в поддержании гомеостаза организма за счет удаления мертвых клеток и дебриса и восстановлении тканей, реагируя на внутренние и внешние изменения в организме не только как фагоциты, но и посредством трофических, регуляторных и восстановительных функций. Как биологически активная молекула, фуллерен C60 проявляет антиоксидантную и противовоспалительную активности, и как ранее установлено [Shershakova et al., 2016] влияет на поляризацию Th1/Th2 клеток. В то же время его эффекты на макрофаги, как клетки врождённой

иммунной системы, остаются неизученными. Вопрос способности фуллерена C₆₀ влиять на поляризацию наивных макрофагов (до M1 или M2), и, как следствие, переключение иммунного ответа с провоспалительного профиля на противовоспалительный, является интересной фундаментальной задачей. Решение ее будет способствовать пониманию природы противовоспалительного эффекта фуллерена C₆₀.

Известно, что макрофаги играют также ключевую роль в процессах регенерации. На модели регенерации лапки аксолотля показано критическое значение скорости прибытия макрофагов в рану для дальнейшего процесса регенерации конечности. Так, показано, что в отсутствии макрофагов на месте ампутированной лапки образовывалась культя с рубцом, при нехарактерном для аксолотля позднем появлении макрофагов, регенерация была неполной, однако при появлении макрофагов в течение 24ч наблюдалась полная регенерация конечности [Godwin et al., 2013]. Авторы указывают на прямую взаимосвязь скорости прибытия макрофагов в рану и эффективности регенерации. Макрофаги млекопитающих прибывают в рану только через 48-96 часов после поражения. Прибытие макрофагов сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов, что необходимо для процесса заживления, затем - противовоспалительных цитокинов, которые подавляют воспаление, стимулируют образование сосудистого русла и деление клеток, привлекая в рану фибробласты. При заживлении глубоких поражений у млекопитающих, как правило, наблюдается образование рубца/шрама, что тоже, вероятно, может быть связано, в том числе, со скоростью прибытия в рану макрофагов. Ху Y с соавторами показали, что конъюгаты пептидов с фуллереном C₆₀ способны усиливать фагоцитирующую активность и хемотаксис моноцитов/макрофагов, увеличивая экспрессию молекул MHC-II, именно за счет присутствия молекулы фуллерена C₆₀ [Xu et al., 2011]. Авторы объясняют полученный эффект природой наночастицы. Следует отметить, что ранее в

экспериментах *in vitro* нами было показано, что при введении AFD в культуру макрофагов увеличивалась экспрессия такого хемокина, как CCL2/MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), который является мощным фактором хемотаксиса моноцитов/макрофагов в организме млекопитающих. Как показано Mizutani Y с соавторами, CCL2 значительно ускоряет процесс заживления [Mizutani et al., 2019]. Известно также, что при диабете скорость заживления раневых поражений значительно снижается, коррелируя с экспрессией CCL2 [Wood et al., 2014]. В своих *in vivo* экспериментах по изучению регенеративной активности фуллерена C60 мы продемонстрировали его ранозаживляющий эффект на моделях раневого и ожогового воспалений [Shershakova et al., 2022]. Вероятно, данный эффект может быть связан, в том числе, со стимуляцией процесса миграции макрофагов в очаг воспаления под действием фуллерена C60.

1.6.4. Обоснование гипотезы о механизме противовоспалительной активности фуллерена C60 «О способности фуллерена взаимодействовать с мембранными фосфолипидами и влиять на высвобождение арахидоновой кислоты»

Воспаление является важнейшим элементом патогенеза основных заболеваний человека. Его характер определяет принципиальное значение противовоспалительной терапии в современной концепции целенаправленного патогенетического лечения. Рациональный выбор противовоспалительных средств и разработка новых, перспективных препаратов немыслимы без четких знаний особенностей развития воспалительной реакции.

Известно, что основной движущей силой воспалительной реакции является окислительный стресс, сопровождающийся генерацией активных форм кислорода, основным источником которых является молекулярный кислород.

Постоянный приток O_2 необходим большинству тканей для поддержания их окислительного потенциала. Однако, даже в нормальных условиях, O_2 является источником токсичных веществ и небольших количеств активных форм кислорода (АФК). АФК – это сильные окислители или крайне реакционноспособные свободные радикалы, являющиеся молекулярными частицами, имеющими неспаренные электроны [Осколок и др., 2016]. Свободные радикалы с их прооксидантным действием необходимы для таких процессов как клеточная сигнализация, рост и дифференцировка клеток, разрушение инфицированных и злокачественных клеток, гибель болезнетворных организмов. В физиологических условиях процесс образования свободных радикалов сбалансирован с их утилизацией (восстановлением), также как содержание факторов, активирующих (прооксидантов) и подавляющих (антиоксидантов) этот процесс, поскольку как избыток свободных радикалов, так и их недостаток приводят к нарушению структуры и функции клеток [Горожанская, 2010]. Молекула кислорода является бирадикалом, поскольку содержит два неспаренных электрона. Однако они расположены так, что молекула O_2 остается относительно стабильной. Образование АФК является следствием неполного восстановления кислорода. При присоединении к O_2 одного электрона образуется высоко реакционноспособный супероксидный анион-радикал ($\cdot O_2^-$). При присоединении двух электронов образуется пероксид-анион ($\cdot O_2^{2-}$), который связывает протоны с образованием пероксида водорода (H_2O_2), не являющегося радикалом, но легко образующего радикалы. При присоединении трех электронов молекула пероксид-аниона расщепляется на ионы O^{2-} и O^- . O^{2-} присоединяет протоны с образованием воды. O^- присоединяет протон и образуется гидроксильный радикал ($\cdot OH$). Процесс полного, четырехэлектронного восстановления кислорода приводит к образованию воды. Этот процесс более энергозависим, чем процессы неполного восстановления, и осуществляется цитохром с-оксидазой,

конечным ферментом дыхательной цепи митохондрий. АФК это нестабильные соединения. Время их жизни от долей микросекунды до миллисекунды. Возможны реакции перехода одной формы в другую, проходящие спонтанно, с участием ионов металлов переменной валентности (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} и др.). В месте повреждения накапливаются свободные радикалы, и поскольку развивается дефицит энергии, снижается активность цитохром с-оксидазы, содержание прооксидантов увеличивается, а содержание антиоксидантов снижается. Кислородные радикалы инициируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) – цепную реакцию последовательного окисления жирных кислот или их остатков в составе других липидов (Рис. 20).

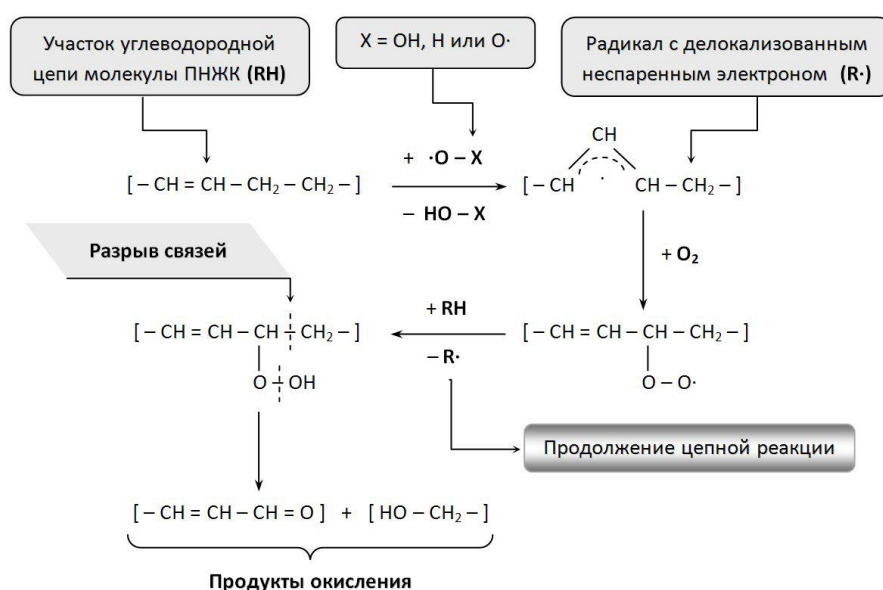


Рис. 20. Механизм перекисного окисления липидов.

Субстратами процессов ПОЛ в клеточных мембранах являются полиненасыщенные жирные кислоты (например, арахидоновая кислота). Кислородные радикалы отнимают водород из групп $-\text{CH}_2-$ полиненасыщенной жирной кислоты, находящихся рядом с двойной связью. Это для них энергетически более выгодно, поскольку происходит делокализация неспаренного электрона между тремя атомами углерода. Образуется радикал жирной кислоты, который легко присоединяет O_2 и

превращается в пероксидный радикал жирной кислоты. Этот радикал может отнимать водород от другой молекулы жирной кислоты. Возникает цепная реакция. Пероксиды легко распадаются с образованием альдегидов путем разрыва в жирной кислоте углерод-углеродной связи, соседствующей с пероксидной группой. Это энергетически более выгодно, поскольку эти альдегиды имеют систему сопряженных двойных связей ($C=C$, $C=O$).

Интенсивность ПОЛ регулируется соотношением прооксидантов и антиоксидантов. К прооксидантам относятся ионы металлов переменной валентности, свободные радикалы, образующиеся в процессе обмена веществ (эндоперекиси простагландинов, продукты метаболизма лейкотриенов, адреналина), НАДФН и НАДН, липоевая кислота. Аскорбиновая кислота в концентрации $10^{-3}M$ в присутствии Fe^{3+} и Cu^{2+} действует как прооксидант. Ионы Ca^{2+} в концентрации около $10^{-5} M$ активируют ПОЛ путем высвобождения ионов Fe^{2+} , связанных с отрицательно заряженными группами липидов, и тем самым увеличивая концентрацию каталитически активного Fe^{2+} в системе.

При повреждении клеток активность естественных прооксидантов усиливается, а активность антиоксидантной системы резко снижается. По-видимому, это связано с активным потреблением антиоксидантов, а также с их повреждением продуктами ПОЛ, ацидозом, липидными перекисями. Так, скорость генерации липидных метаболитов превалирует над скоростью их потребления (выведения), что обуславливает накопление продуктов ПОЛ в месте повреждения. Следует отметить, что активация ПОЛ может быть не только результатом его прямой интенсификации под влиянием патогенных воздействий, но и следствием первичного подавления антиоксидантных систем клеток.

Основным последствием активации ПОЛ для клеточных мембран является формирование в липидном бислое мембран сквозных полярных каналов (перекисных кластеров), что увеличивает пассивную

проницаемость мембран для ионов K^+ , H^+ , Na^+ , Ca^{2+} и воды, а также снижает электрическую стабильность мембран. Увеличивается внутриклеточное содержание ионов H^+ , Na^+ , Ca^{2+} и воды, но снижается внутриклеточное содержание ионов K^+ . Пробой липидной части мембраны приводит к её разрыву и гибели клетки. Изменяется количественный и качественный состав мембранных липидов (снижается содержание полиненасыщенных жирных кислот), происходит делипидизация, нарушение гидрофобной области липидного бислоя, увеличивается доступность липидов для фосфолипаз.

Фосфолипаза A2 (ФЛА2, PLA2) проявляет субстратную специфичность в отношении перекисленных фосфолипидов мембран и катализирует гидролиз фосфолипидных пероксидов в гидропероксиды жирных кислот. После высвобождения последние подвергаются действию глутатион-пероксидазы и в результате образуются стабильные восстановленные гидрокси-соединения. Эти реакции способствуют обрыву процесса ПОЛ [Узбеков, 2015].

Активность фосфолипазы A2 цитоплазматической мембраны (ЦПМ) контролируется гистамином, гормонами, цитокинами и другими факторами, действие которых сопровождается повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} . В результате гидролиза фосфолипидов ЦПМ происходит отщепление арахидоновой кислоты, при метаболизме которой образуются эйкозаноиды, которые путем активации тропных к ним мембранных рецепторов, находящихся в непосредственной близости от места их синтеза, регулируют функциональную активность, как синтезирующих их клеток, так и соседних клеток.

Фосфолипазы A2 (EC 3.1.1.4) состоят из Ca^{2+} -зависимого липид-связывающего C2-домена (Xxx-Cys-Gly-Xxx-Gly-Gly) и каталитического α/β -гидролазного домена, содержащего последовательность Asp-Xxx-Cys-Cys-Xxx-Xxx-His-Asp в активном центре. Оба домена соединены 5-8 дисульфидными связями (Рис. 21).

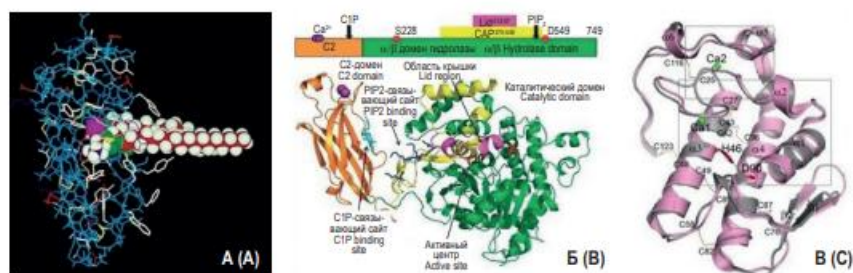


Рис. 21. Фосфолипаза A2 группы IA (PLA2). А – общий вид, Б – доменная структура, В – активный центр [de Luca et al., 2011; Deng et al., 2021]

Ионы кальция связываются с Asp-49 и атомами кислорода Tyr-28, Gly-30 и Gly-32. Фосфолипазы PLA2 гидролизуют в положении sn-2 фосфолипиды плазматической и мембраны митохондрий с образованием лизофосфолипидов, арахидоновой (ArK), лизофосфатидной кислот, простагландинов, лейкотриенов, тромбоксана, фактора активации тромбоцитов и неэтерифицированных жирных кислот. Секреторные sPLA2 также гидролизуют альвеолярный сурфактант и фосфолипиды бактерий. При этом активность и экспрессия sPLA2 регулируются фактором некроза опухолей- α (TNF α), интерлейкином-1 (IL-1), стероидами [Уразов и др., 2022].

Кроме того, секреторная PLA2-IIA гидролизует внеклеточные везикулы (EV) тромбоцитов, с выделением тромбоксансинтазы, гистамина, 12-липоксигеназы, циклооксигеназы и воспалительных эйкозаноидов [Chilton et al., 2002].

Эйкозаноиды (метаболиты полиненасыщенных жирных кислот) играют ключевую роль в процессе воспаления. Арахидоновая кислота может превращаться в эйкозаноиды по 2 путям (циклооксигеназному, главным ферментом которого является циклооксигеназа (простагландинсинтетаза), и липоксигеназному, с участием липоксигеназы (Рис. 22).

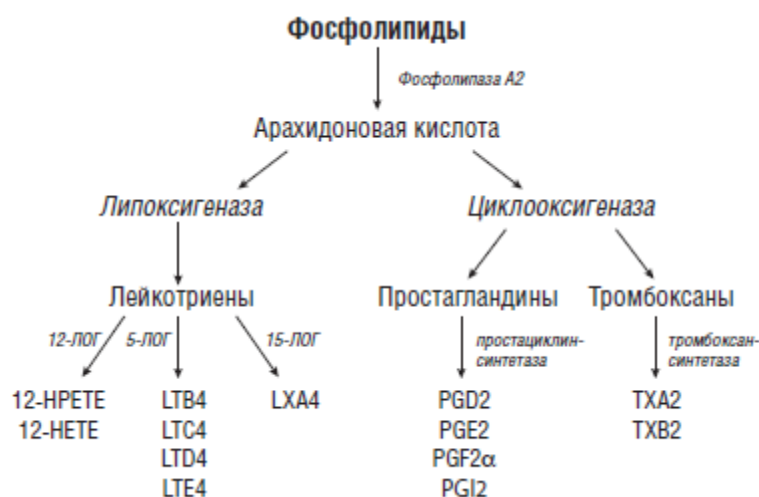


Рис. 22. Основные биологически активные метаболиты арахидоновой кислоты и ферментативные пути их образования. [Heller et al., 1998]

ЛОГ-липоксигеназа, PG-простагландины, НРЕТЕ-гидропероксиэйкозатетраеновая кислота, НЕТЕ-гидроксиэйкозатетраеновая кислота, ТХ-тромбоксаны.

В результате циклооксигеназного пути превращения арахидоновой кислоты образуются простагландины, простациклины и тромбоксаны. По липоксигеназному пути синтезируются лейкотриены.

Эйкозаноиды оказывают разнообразные и часто антагонистические биологические эффекты, что определяется их химической природой и особенностями рецепторов, с которыми они взаимодействуют. Так, простагландины, лейкотриены, эоксины и гепоксилины являются мощными медиаторами воспаления и боли, а липоксины, производные эпоксиэйкозатриеновой кислоты, резолвины, протектины, марезин и эндоканнабиноиды оказывают противовоспалительное и цитопротективное действие, способствуя разрешению воспалительной реакции [Каратеев и др., 2016].

Таким образом, развитие воспалительного процесса инициируется повреждением мембраны клетки, которое в свою очередь, вызывает интенсификацию ПОЛ, что приводит к резкому дефициту энергии и активации мембранных фосфолипаз и гидролаз лизосом. Высвобождение

же из мембранных фосфолипидов арахидоновой кислоты, которая быстро метаболизируется ферментами ЦОГ, липоксигеназой и системой цитохрома Р-450 является одним из исходных механизмов клеточного ответа при воспалении [Heller et al., 1998].

Процесс ПОЛ можно подавить путем использования стабилизаторов мембран (кетотифена и кромонов, блокирующих поступление ионов хлора внутрь тучных клеток, тем самым препятствуя входу в клетку ионов кальция, обеспечивающих процесс дегрануляции), а также препаратов, ингибирующих мембранные фосфолипазы и метаболизм арахидоновой кислоты (аналоги глюкокортикоидов, ацетилсалициловая кислота и др.). Кроме того, снижение интенсивности ПОЛ может быть достигнуто за счет, например, инактивации свободных радикалов при помощи антиоксидантов природного происхождения (α -токоферола, кофермента Q, церулоплазмينا, аскорбиновой кислоты, β -каротина) и синтетических препаратов (ионола, селен-метионина), а также антиоксидантных ферментов и тушителей АФК (супероксиддисмутазы, церулоплазмينا, маннитола, гистидина).

Известными антиоксидантами являются молекулы фуллерена C₆₀ и его производные. Именно с этим их свойством зачастую связывают наличие у фуллеренов противовоспалительной активности. Однако, точный механизм данной активности фуллеренов пока не ясен, как не ясна и непосредственная мишень, с которой они могут взаимодействовать в организме. В литературе есть данные о способности производных фуллерена C₆₀ ингибировать выработку различных факторов воспаления, в том числе острого, которое связано, прежде всего, с нарушением целостности мембран клеток. В частности, было показано, что лазер-индуцированное воспаление с образованием эритемы, ингибировалось введением производного фуллерена C₆₀ ((PVP)-fullerene). При этом было продемонстрировано снижение экспрессии мРНК фермента циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), как маркера воспаления [Fujimoto et al., 2012].

Авторы связывают полученный результат со способностью фуллерена поглощать АФК, что, по-видимому, обуславливает ингибирование процесса высвобождения из фосфолипидов мембраны клеток полиненасыщенных жирных кислот, которые являются субстратом для ЦОГ-2.

Lee с соавторами было показано, что производные фуллерена C60 (гликофуллерены) способны подавлять индуцированное твердыми частицами кожное воспаление и связанную с ним продукцию цитозольной фосфолипазы A2, циклооксигеназы-2, гемоксигеназы-1 и простагландина E2 [Lee et al., 2020]. Полученные эффекты авторы связывают с антиоксидантной активностью производных, которая способствует ингибированию процесса кожного воспаления за счет снижения активности указанных ферментов.

Развитие воспалительного процесса зачастую обуславливается накоплением АФК и инициацией процесса ПОЛ. Интересным является тот факт, что, как было показано, производные фуллерена C60 способны подавлять ПОЛ, причем эффективность ингибирования ПОЛ производными C60 определялась растворимостью этих соединений в воде. Так, максимальное ингибирующее действие проявляли наименее растворимые в водной фазе соединения [Богданова и др., 2012]. Экспериментальные данные показали, что наиболее гидрофобные соединения взаимодействуют с мембраной в области жирнокислотных остатков фосфолипидов, где преимущественно и протекают процессы ПОЛ, т.е. образуются АФК.

В продолжение данного умозаключения, можно предположить, что фуллерены, как гидрофобные молекулы, вероятно, способны ингибировать не только ПОЛ, но и процесс высвобождения арахидоновой кислоты (АК), в том числе, вероятно, за счет связывания с фосфолипидами мембран клеток. Можно предположить, что при взаимодействии с фосфолипидами фуллерен C60 экранирует их, препятствуя взаимодействию с ними

фосфолипазы A2, а также воздействию на них свободных радикалов. Важно отметить, что фуллерен C60, который исследуется в настоящей работе, находясь в свободной форме в виде дисперсии (ВРФ), имеет высокую степень гидрофобности по сравнению с большинством известных производных, что, вероятно, может предполагать и высокую эффективность ингибирования ПОЛ. Можно сделать также предположение о том, что противовоспалительный эффект может быть следствием взаимодействия молекул фуллерена C60 с фосфолипазой A2, которая отвечает за высвобождение арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот из фосфолипидов клеточной мембраны.

1.7. Токсикология фуллеренов

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 C60 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 сенсibilизирующих 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 C60 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 C60 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 C60 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 C60 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 C60 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 C60, при местной аппликации и внутрибрюшинном введении, не проявляет острой токсичности.

Длительный эксперимент был проведен на крысах [Baati et al., 2012], в диету которых добавляли фуллерен в виде раствора в оливковом масле (C60-Olive) (Рис. 23).

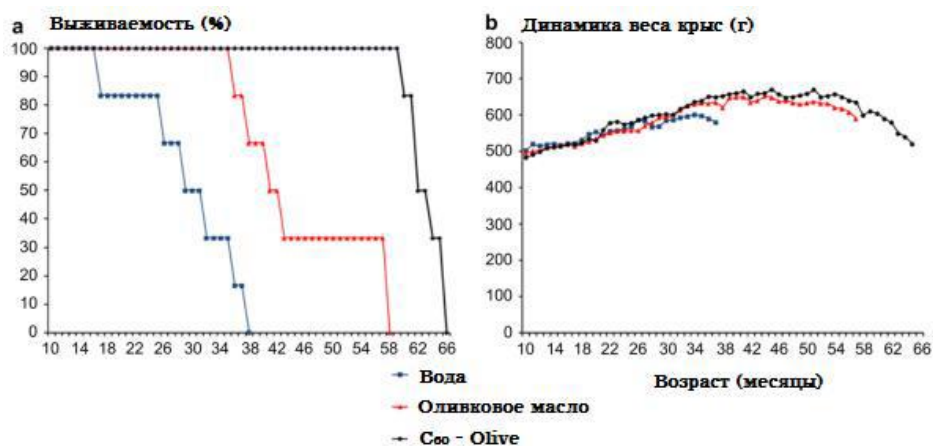


Рис. 23. Выживаемость и динамика веса крыс с использованием диет (как добавка к основной стандартной диете): фуллерен в оливковом масле (C60-Olive), Оливковое масло и вода [Baati et al., 2012].

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 C60. Анализ механизмов действия C60-Olive с использованием экспериментальной модели интоксикации крыс четыреххлористым углеродом (CCl₄), 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 LD₅₀ фуллеренола C60OH₁₈ при внутрибрюшинном введении мышам равна 1,2 г/кг [Ueng et al., 1997]. Парентеральное введение мышам аминокислотного производного C60-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)-п,п'-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 C60 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. C60/H₂O(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 C60 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. C60/H₂O(NMP) и VDF-60 не показали токсичности в экспериментах *in vivo* на клетках китайского хомячка линии V79 в исследуемом диапазоне концентраций C60 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 C60.

Исследование распределения фуллерена по органам и тканям крыс после однократного введения C60 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 кровоток 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 C60 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 C60 показатель LD50 для мышей составил 0,7 г/кг, а для крыс - 2 г/кг [Yamago et al., 1995]. Немодифицированный фуллерен C60 не влиял на жизнеспособность тимоцитов крысы, на накопление продуктов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени и мозга и устойчивость эритроцитов к гемолизу [Prylutska et al., 2007].

1.8. Данные мировой литературы о фармакокинетике водной дисперсии фуллерена C₆₀

Достаточно обширной информации о поведении немодифицированного фуллерена в организме, всасывании, распределения по органам, выведении и возможным метаболическим превращениям в современной литературе пока нет. Методы получения водных растворов (дисперсий) C₆₀ сильно различаются [Andreev et al., 2015], для диспергирования C₆₀ применяют ультразвук совместно с токсичными органическими растворителями, сурфактанты, амфифильные полимеры, белки, что влияет на конечную структуру C₆₀-наночастиц в водной среде. В водных средах фуллерен всегда существует в форме кластеров и их структура, химия поверхности, гидрофобные особенности, могут оказывать сильное влияние как на токсичность, так и на биораспределение, кинетику и клиренс.

Большинство исследований по фармакокинетике анализируют либо гидрофильные ковалентные производные (аддукты) фуллерена, либо его меченые препараты (флуоресцентная или радиоактивная метки). В настоящее время существует ограниченное число исследований по фармакокинетике свободной формы C₆₀. Например, изучение на крысах водной дисперсии C₆₀, стабилизированной твином 80 (25:75, соответственно), вводимой в дыхательные пути крыс путем ингаляции, показало что клиренс C₆₀ частиц имеет две фазы, первая быстрая, вторая медленная. Вероятно, часть частиц поглощалась макрофагами и эпителиальными клетками [Chang et al., 2014].

Так изучение фармакокинетики фуллерена C₆₀ меченного ⁹⁹Tc показало, что после однократного введения он распределяется в организме по всем тканям и органам, накопление фиксировалось в почках, костях, селезенке и печени. Уменьшение концентрации во всех тканях происходило после 24 часов, за исключением костей [Qingnuan et al., 2002]. ¹³C-обогащенный C₆₀ (диспергированный в водном растворе) внутривенно

вводили животным и затем количественно определяли с помощью масс-спектрометрии с использованием изотопов. Было показано, что C60 быстро выводится из кровообращения с периодом полураспада 14 минут, а также наблюдается его избирательное накопление в печени, селезенке и легких, с последующим снижением в течение 24 часов [Chang et al., 2014]. В исследовании [Baati et al., 2012] изучали фармакокинетику фуллерена при пероральном введении крысам раствора C60 в оливковом масле. При этом было показано, что фуллерен распределяется в организме и может накапливаться в тканях. Фармакокинетические исследования показывают, что C60 поглощается желудочно-кишечным трактом и выводится в течение нескольких десятков часов.

Таким образом, различные фармакокинетические данные были получены в результате разных методов исследования, путей введения и доз. Влияние поверхностной химии на биораспределение фуллерена также описано в исследованиях производных фуллерена [Xu et al., 2009; Sumner et al., 2015; Kubota et al., 2011]. Однако фармакокинетика немодифицированного фуллерена C60 при накожном и ином введении ранее в научной литературе описана не была.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение водного раствора фуллерена C₆₀

Водный раствор фуллерена C₆₀, полученный по уникальной запатентованной технологии: 1000 мг чистого порошка фуллерена C₆₀ (продукт NeoТес, Россия 99,95 %) растворяли (~3 ч) в 1600 мл N-метил-1-пирролидон (NMP, Sigma-Aldrich, 99,5 %). К полученному фиолетовому раствору добавляли 1600 мл деионизированной воды и пропускали через фильтр из стекловолокна (Sigma-Aldrich, 2,6 мм). Далее, полученную смесь подвергали ультрафильтрации через мембрану с размером пор 100 кДа (Pellicon 2 Membrane Ultracel, регенерированная целлюлоза) с использованием кассетного модуля для ультрафильтрации и держателя из нержавеющей стали (Millipore/Мерк). Замещающей средой являлся 0,01% раствор Pluronic F-127. Процесс удаления NMP из C₆₀-содержание фуллерена C₆₀ в ретентате контролировали путем количественного определения NMP спектрофотометрическим методом в пермеате. Завершение процесса ультрафильтрации происходило после исчезновения полосы при 190–210 нм, характерной для свободного поглощения NMP. Для концентрирования полученной дисперсии C₆₀ (ретентат) ультрафильтрацию продолжали без подачи замещающего раствора до достижения концентрации по фуллерену C₆₀ 1 г/л. Полученный раствор подвергали стерилизации и хранили при +10°C в защищенном от света месте. Содержание C₆₀ определяли спектрофотометрически (Cary 100, Agilent Technologies, ячейка 10 мм) с использованием калибровочной кривой. Молярный коэффициент экстинкции C₆₀ при 340 нм составлял 50 200 [Andreev et al., 2015].

2.2. Изучение противоаллергической активности ВРФ на модели атопического дерматита

2.2.1. Постановка эксперимента

В работе использовали самок мышей линии BALB/c весом 18-20 г., в

возрасте 6-8 недель, полученных из питомника ГУНЦБМТ РАМН. Вся работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с приказом МЗ РФ от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Положением об этическом отношении к лабораторным животным ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА России».

Аллергеном для сенсibilизации мышей с интактной барьерной функцией кожи являлся овалбумин (OVA) (Sigma). Моделирование АД осуществляли согласно отработанной ранее методике [Шершакова и др., 2011]. Мыши были разделены на 4 группы. На выбритую спину животным делали аппликации со стерильной марлей: мышам участки размером 2х1,5см, трем группам наносили стерильную марлю размером 1х1 см, пропитанной 0,1% раствором OVA, закрепляя ее специальным материалом (Bioclusive, Johnson and Johnson Medical Limited), который предохраняет от высыхания, контрольной группе наносили PBS (100 мкл). Через 7 дней повязки снимали. Аппликации повторяли еще 2 раза с 2х недельным интервалом. Между аппликациями с овалбумином осуществляли накожное (н/к) и подкожное (п/к) введение фуллерена C60 по схеме (Рис. 24). Доза при подкожном введении составляла 2 мкг/мышь, а при накожном – 20 мкг/мышь. После третьего этапа сенсibilизации проводили забор крови, селезенки и образцов кожи.

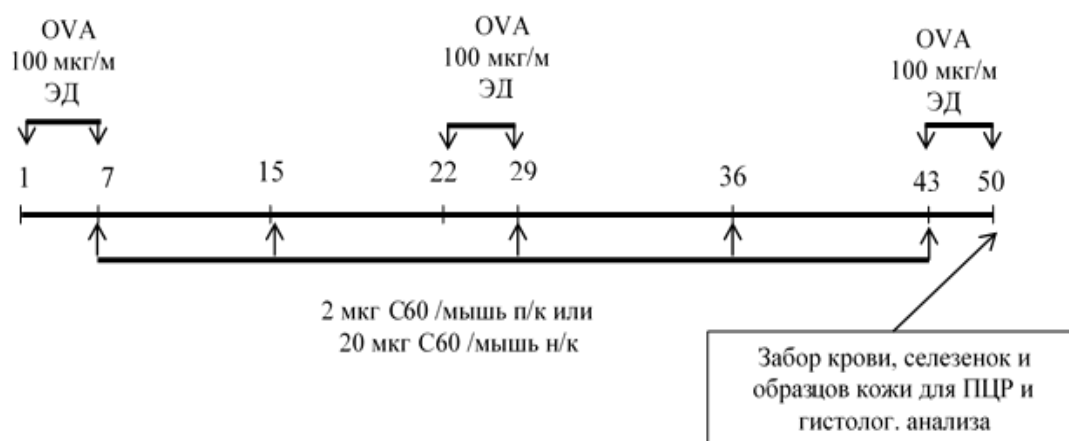


Рис. 24. Схема опыта.

2.2.2. Культура спленоцитов *in vitro*

Селезенка помещалась в охлажденную среду RPMI-1640. 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. Спленоциты высевали в 12-луночный планшет в концентрации 5×10^6 клеток/лунку и стимулировали OVA (4 мкг/мл). Сбор супернатантов для последующего анализа осуществляли через 72 часа после посева. В полученных супернатантах определяли уровень цитокинов.

2.2.3. Иммуноферментный анализ (ИФА)

В данной работе метод ИФА использовался для определения уровня специфических антител в сыворотке крови опытных животных, а также для количественного определения цитокинов. Уровни специфических IgE, IgG1 и IgG2a антител в индивидуальных сыворотках крови мышей тестировались согласно инструкции производителя (ELISA BD, США). Для получения сыворотки кровь отстаивали (10 мин), центрифугировали 10 мин (2 тыс об/мин,) и отбирали надосадочную жидкость. На полистироловую поверхность 96 - луночного планшета сорбировали OVA (10 мкг/мл) в ФСБ (фосфатно-солевой буфер) по 100 мкл на лунку, сутки инкубировали при +4°C. Отмывали планшеты отмывочным буфером (0,1% Tween 20 на PBS), вносили блокирующий раствор (обезжиренное молоко по 200 мкл на лунку), инкубировали 1 час при комнатной температуре. Затем отмывали 2 раза и вносили сыворотки. Инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Отмывали отмывочным буфером 3 раза, после чего внесли биотинилированные антитела против IgE, IgG1, IgG2a соответственно по 100 мкл на лунку и инкубировали час при комнатной температуре. Затем отмывали 4 раза отмывочным буфером и вносили пероксидазный конъюгат (Str-HRP) по 100 мкл на лунку, инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Отмывали 6 раз и вносили субстратный раствор (тетра-метил-бензидин) по 100 мкл на лунку, после чего

инкубировали 25-30 минут в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2н H₂SO₄ и результаты фиксировали с помощью спектрофотометра Reader MPR1 (ScoTech, Германия) при длинах волн 450 и 630 нм. Точную концентрацию анти-OA IgE в сыворотках крови мышей определяли по калибровочной кривой, полученной при титровании стандартного образца анти-OA IgE мыши (Serotec, Великобритания).

Количественное определение IL-4, IL-5, IL-12, в супернатантах стимулированных спленоцитов проводили с использованием наборов ELISA BD OptEIA™ (США) в соответствии с методическими рекомендациями производителя. На полистироловую поверхность 96 - луночного планшета сорбировали антитела к интерлейкинам 4,5,12 соответственно (1:250 в PBS) по 100 мкл на лунку, сутки инкубировали при +4С. Отмывали планшеты отмывочным буфером, вносили блокирующий раствор, инкубировали 1 час при комнатной температуре. Затем отмывали 2 раза и вносили супернатанты стимулированных спленоцитов. Инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Отмывали отмывочным буфером 3 раза, после чего вносили биотинилированные антитела против интерлейкинов 4,5,12 соответственно по 100 мкл на лунку и инкубировали час при комнатной температуре. Затем отмывали 4 раза отмывочным буфером и вносили стрептавидин, меченый пероксидазой хрена (Str-HRP) по 100 мкл, инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Отмывали 6 раз и вносили субстратный раствор (тетра-метил-бензидин) по 100 мкл, после чего инкубировали 25-30 минут в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2н H₂SO₄ и результаты фиксировали с помощью спектрофотометра Reader MPR1 (ScoTech, Германия) при длинах волн 450 и 630 нм. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочной кривой, полученной при титровании входящих в состав наборов стандартных образцов.

2.2.4. Выделение мРНК

Выделение общей РНК осуществляли с использованием коммерческого набора Rneasy Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции. Клетки лизировались в лизирующем буфере во время взятия материалов, после этого образцы хранили при температуре -70°C . В последующем образцы размораживали, добавляли 350 мкл (на 1 образец) 70% этанола, затем полученная смесь была перенесена в спин – колонки и подвергнута центрифугированию в течение 30 секунд при 10 тыс об/мин. Далее в колонку добавляли 700 мкл буфера RW1 для промывки, колонки центрифугировали в течение 30 сек (10 тыс об/мин), образовавшуюся жидкость сливали. В колонку вносили 500 мкл PRE-буфера, центрифугировали при тех же условиях. Колонки переносились в новую пробирку, в нее вносили 50 мкл воды (очищенную от РНК-аз) для элюирования. Центрифугировали 1 мин (10 тыс об/мин). Концентрацию полученной РНК в образце измеряли с помощью прибора NanoDrop 2000. Полученные образцы хранили при температуре -70°C .

2.2.5. Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора REVERTA-L (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Для этого готовили реакционную смесь на необходимое количество образцов. На 12 реакций добавляли 5 мкл RT-G-mix, vortexировали, добавляли 6 мкл ревертазы (MMIv). На 1 реакцию добавляли по 10 мкл реакционного раствора и 10 мкл мРНК – пробы, пипетировали и ставили на 30 мин в амплификатор при 37°C . После этого разбавляли в 2 раза, добавив 20 мкл ДНК-буфера к полученному раствору кДНК. Полученные образцы хранили при температуре -20°C .

2.2.6. Проведение RT-PCR

RT-PCR осуществляли с использованием набора реактивов Синтол (Россия) и амплификатора IQ5 (BioRad, США). Для этого готовили реакционную смесь на необходимое количество образцов. На один

образец: 7 мкл воды, 8 мкл 2.5х реакционной смеси, 1 мкл смеси праймеров (10 пМ) и флуоресцентного зонда (5 пМ), 1 мкл MgCl₂ (25 мМ) и 3 мкл исследуемой кДНК. Конечный объем составлял 20 мкл.

Реакцию проводили в амплификаторе в следующих условиях:

5 мин - 95C	}	(1 цикл);
20 сек – 58C;		(45 циклов)
20 сек – 72C;		
20 сек – 95C		

Измерение интенсивности флуоресценции происходило на второй стадии (58C) каждого цикла.

Методом RT-PCR изучали экспрессию генов Foxp3, FLG-F и IFN γ . В качестве нормализующего гена использовался ген HPRT. Последовательности праймеров и зондов к данным генам представлены ниже (Табл. 2).

Табл. 2. Праймеры и зонды изучаемых генов.

Название праймера	Последовательность 5'-3'
mHPRTf	GAAGAGCTACTGTAATGATCAGTCA
mHPRT _r	GTATCCAACACTTCGAGAGGTC
mHPRT _z	(FAM)GCTTTCCCTGGTTAAGCAGTACAGCC(RTQ1)
mIFN γ -F	AAATCCTGCAGAGCCAGATTAT
mIFN γ -R	GCTGTTGCTGAAGAAGGTAGTA
mFN γ -Z	(FAM)ACGCTTATGTTGTTGCTGATGGCC(RTQ1)
mFoxp3 - F	TTTCACCTATGCCACCCTTATC
mFoxp3 - R	GTAGGCGAACATGCGAGTAA
mFoxp3 - Z	(FAM) CGGAGAGGCAGAGGACACTGAATG (BHQ1)
mFLG-F	GCTCAGGAGGAAGAGGACAG
mFLG-R	ATTCATATCCTCCCTGACCACT
mFLG-Z	(FAM) CAAGTCCATTCTGGAGTCCAGGTCTG (BHQ1)

Уровень экспрессии указанных генов рассчитывался относительно выравнивающего гена.

2.2.7. Гистологический анализ кожи

Образцы кожи фиксировали в 10% растворе формалина. Обезвоживание и проводку образцов, заливку в парафин проводили ручным способом. Микротомирование парафиновых блоков для получения срезов толщиной 4 мкм осуществляли при помощи ротационного микротомы Reichert Jung. Полученные срезы окрашивали гемотаксин-эозином, заключали в пихтовый бальзам под покровные стекла для получения постоянных микропрепаратов. Микроскопический анализ гистологических препаратов кожи мышей разных групп проводили на микроскопе Opton (Германия).

Оценка степени патоморфологических изменений кожи осуществлялась по бальной системе. (Табл. 3, 4) Анализ гистологических срезов проводили по следующим параметрам: 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 геморрагий. Кроме того, была проанализирована клеточная инфильтрация дермы и ПЖК на предмет наличия эозинофилов, полинуклеарных лейкоцитов, лимфоцитов и тучных клеток.

Табл. 3. Оценка поражения кожи при АД в баллах.

Участок кожи	Критерий	Нет реакции (0 баллов)	Легкая степень поражения кожи (1 балл)	Умеренная степень поражения кожи (2 балла)	Тяжелая степень поражения кожи (3 балла)
Эпидермис	Утолщение эпидермиса	отсутствует	Слабое утолщение	Умеренное утолщение	Выраженное утолщение
	Некроз эпидермиса	отсутствует	присутствует	-	-
	Гиперкератоз эпидермиса	отсутствует	присутствует	-	-
Дерма	Пролиферация соединительно- тканых элементов	отсутствует	Слабая пролиферация	Умеренная пролиферация	Выраженная пролиферация
	Некроз дермы	отсутствует	присутствует	-	-
	Отек	отсутствует	присутствует	-	-
	Геморрагии	отсутствует	присутствует	-	-
Подкожная жировая ткань	Пролиферация соединительно- тканых элементов	отсутствует	Слабая пролиферация	Умеренная пролиферация	Выраженная пролиферация
	Некроз ПЖК и подлежащих тканей	отсутствует	присутствует	-	-
	Отек	отсутствует	присутствует	-	-
	Геморрагии	отсутствует	присутствует	-	-

Табл. 4. Таблица оценки клеточной реакции в баллах.

Участок кожи	Критерий	Нет реакции (0 баллов)	Легкая степень поражения кожи (1 балл)	Умеренная степень поражения кожи (2 балла)	Тяжелая степень поражения кожи (3 балла)
Дерма	Эозинофиллы	Отсутствует	Слабо	Умеренно	Выражено
	Полинуклеарные лейкоциты	Отсутствует	Слабо	Умеренно	Выражено
	лимфоциты	Отсутствует	Слабо	Умеренно	Выражено
Подкожная жировая клетчатка	Эозинофиллы	Отсутствует	Слабо	Умеренно	Выражено
	Полинуклеарные лейкоциты	Отсутствует	Слабо	Умеренно	Выражено
	лимфоциты	Отсутствует	Слабо	Умеренно	Выражено

Подсчет результатов проводился методом суммирования баллов, для наглядности результат приводили в виде гистограммы.

2.2.8. Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., USA), причем статистическую значимость устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Значения $p \leq 0,05$ принимались как статистически значимые.

2.3. Изучение противоаллергической активности фуллерена C60 на модели пищевой аллергии

2.3.1. Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей линии BALB/c весом 20-22 г., в возрасте 4-6 недель, полученных из питомника ГУНЦБМТ РАМН. Данная работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с приказом МЗ РФ от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Положением об этическом отношении к лабораторным животным ГНЦ «Института иммунологии» ФМБА России».

2.3.2. Моделирование ПА для оценки способности фуллерена C60 проявлять противоаллергическую активность

Аллергеном для сенсibilизации мышей являлся овальбумин (Sigma). Моделирование пищевой аллергии осуществляли согласно ранее отработанной методике. Мыши случайным образом были разделены на 6 групп. Первая группа являлась модель пищевой аллергии, группы со второй по четвертую получали фуллерен, пятая и шестая являлись контрольными. Подкожно в область спины животным делали введение аллергена: пяти группам мышей вводили 0,2 мл физиологического раствора с адъювантом (1 мг Al(OH)₃) и 10 мкг OVA, через две недели введение повторяли. Между первичной сенсibilизацией и челленджированием со второй по четвертую группу осуществляли интрагастральное (и/г) введение фуллерена C60. Доза при введении составляла 10 мкг/мл на мышь. Вторая группа получала один раз в неделю фуллерен (и/г), третья группа два раза в неделю и четвертая ежедневно, тем же методом соответственно. Через 7 дней, после повторной сенсibilизации, с первой по четвертую группу аллерген вводили и/г в дозе 15мг OVA в 150 мкл PBS в течение 7 дней. Пятой группе в качестве контроля вводили 150 мкл PBS. После семидневной сенсibilизации проводили забор крови, селезенки и образцов тощей кишки тонкого отдела кишечника.

2.3.3. Культура спленоцитов *in vitro*

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, +40C), а затем дважды промывали свежей средой. Спленоциты высевали в 12-луночный планшет в концентрации 5×10⁶ клеток/лунку и стимулировали OVA (4 мкг/мл). Сбор супернатантов для последующего анализа осуществляли через 72 часа после стимуляции. В полученных супернатантах определяли уровень цитокинов.

2.3.4. Иммуноферментный анализ

Метод ИФА использовался для определения уровня специфических антител в сыворотке крови опытных животных, а также для количественного определения цитокинов. Уровень специфического IgE антител в индивидуальных сыворотках крови мышей тестировался согласно инструкции производителя (ELISA BD, США). Для получения сыворотки кровь отстаивали (8-10 мин), центрифугировали 10 мин (1,5 тыс об/мин,) и отбирали надосадочную жидкость.

Приготовление растворов для ИФА. Буфер для промывки (Wash buffer) представляет собой 0,1% раствор Tween 20 в PBS. Буфер для разведения сыворотки и конъюгатов готовится путем разведения 3 таблеток PBS, Tween 20 0,05мл и 0,1г BSA в 100 мл дистиллированной воды. Для приготовления 100 мл блокирующего раствора необходимо 5 г сухого молока, Tween 20 и 100 мл PBS.

На полистироловую поверхность 96 - луночного планшета сорбировали OVA (10 мкг/мл) в PBS (фосфатно-солевой буфер) по 100 мкл

на лунку и инкубировали сутки при +4С°. Планшеты отмывали Wash buffer (буфер для отмывки) 3 раза (150 мкл/лун.). Вносили блокирующий раствор и инкубировали ночь при +4С°. От блокирующего раствора отмывали 3 раза Wash buffer и вносили образцы сыворотки. Инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Отмывали Wash buffer 5 раз, после чего вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора антител против IgE мыши, меченных биотином (biotin rat anti-mouse IgE «BD») в разведении 1:1000 и инкубировали 50 минут при комнатной температуре. Каждую лунку отмывали 6 раз Wash buffer. После добавляли по 100 мкл раствора стрептавидина, меченного пероксидазой хрена (SAv-HRP «BD») в разведении 1:1000, инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Отмывали 6 раз Wash buffer. В лунки добавляли по 100 мкл субстрата тетраметилбензидин (Substrat Reagent A и Substrat Reagent B «BD» в соотношении 1:1) с последующей инкубацией в течение 15-20 минут при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали внесением 50 мкл 2N раствора H₂SO₄. Анализ оптической плотности проводили на спектрофотометре Reader MPR1 (ScoTech, Германия) при длинах волн 450/630 нм. Количество анти-OVA IgE в сыворотках крови мышей определяли по калибровочной кривой, полученной при титровании стандартного образца анти-OVA IgE мыши (Serotec, Великобритания).

Количественное определение IL-4, IL-12, в супернатантах стимулированных спленоцитов проводили с использованием наборов ELISA BD OptEIA™ (США) в соответствии с методическими рекомендациями производителя. Количественное определение IL-5, IFN γ в супернатантах стимулированных спленоцитов проводили с использованием наборов ELISA eBioscience (США-Австрия) в соответствии с методическими рекомендациями производителя. Анализ оптической плотности проводили на спектрофотометре Reader MPR1 (ScoTech, Германия) при длинах волн 450/630 нм. Концентрацию

цитокинов определяли по калибровочной кривой, полученной при титровании входящих в состав наборов стандартных образцов.

2.3.5. Гистологический анализ тонкого кишечника

Образцы тонкого кишечника фиксировали в 10% растворе формалина. Гистологическую проводку: обезвоживание в спирте, замещение спирта хлороформом 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 при помощи автоматизированного ротационного микротомы Finesse E+ (Финляндия). Полученные срезы окрашивали гемотаксилином и эозином по общепринятой методике, заключали в монтирующую среду под покровные стекла для получения постоянных микропрепаратов. Микроскопический анализ гистологических препаратов тощей кишки тонкого отдела кишечника мышей разных групп проводили на микроскопе Leica DM 2000 (Германия).

2.3.6. Оценка диареи и изменение веса тела

Симптомы пищевой аллергии были оценены параметрами аллергической диареи и изменения веса тела. Аллергическая диарея была очевидна через 20-30 минут после введения. Диарею оценивали визуально по баллам, которые зависели от формы каловых масс, от 0 до 3: 0 – твердый стул, 1 – влажный несформированный стул, 2 – жидкий стул, 3 – водянистый стул.

Вес тела мышей измеряли перед введением OVA и после через 30-40 минут.

2.3.7. Статистический анализ

Для статистической обработки результатов применяли программу Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., США). Статистическую значимость различий

устанавливали при помощи t-критерия Стьюдента. Значения $p \leq 0,05$ принимались как статистически значимые.

2.4. Изучение противоаллергической активности фуллерена C60 на модели анафилактического шока

2.4.1. Лабораторные животные

См. пп. 2.3.1.

2.4.2. Протокол эксперимента

В эксперименте было сформировано десять экспериментальных групп. Первая группа являлась моделью анафилактического шока («Модель»), со второй по девятую получали исследуемые препараты, десятая являлась контрольной («Интактные»). Внутривенно животным проводили сенсibilизацию аллергеном: мышам вводили 20 мкг овальбумина с 2 мг гидроксида алюминия ($Al(OH)_3$) в 500 мкл PBS (фосфатно-солевой буфер) двукратно с интервалом 7 дней. После первичной и вторичной сенсibilизации группы 2 (2C60 4/28) и 4 (20C60 4/28) получали фуллерен C60 внутривенно (в/в) в дозе 2 мкг и 20 мкг соответственно. Также группы 6 (2Mel 4/28) и 8 (20Mel 4/28) получали в/в 2 мкг и 20 мкг мелатонина в этот же временной промежуток. Группы 3 (2C60 11/28), 5 (20C60 11/28) получали фуллерен, группы 7 (2Mel 11/28) и 9 (20Mel 11/28) мелатонин после вторичной сенсibilизации и за два дня до разрешающего введения (2 мкг и 20 мкг). На 28 день эксперимента перед разрешающим введением проводили забор крови. Через некоторое время после взятия крови, животные получали разрешающую дозу овальбумина в/в 500 мкг/мышь. В течение 1,5 часов животные находились под наблюдением для оценки симптомов анафилаксии у мышей.

2.4.3. Оценка симптомов анафилаксии у мышей

После разрешающего введения аллергена мы проводили визуальную оценку симптомов анафилактической реакции у мышей с помощью шкалы оценок Rura и Mine. Оценка производилась в баллах.

Отсутствие симптомов анафилактического шока оценивалось в 0 баллов. В 1 балл оценивали почесывание и отечность мордочки, легкий шок и замедленность движений. Наличие таких симптомов как диарея, набухание рта и парез глаз оценивалось в 2 балла. 3 балла - одышка, проблемы с дыханием, цианоз. Мыши, принимавшие боковое положение и страдающие тремором и конвульсиями оценивали на 4 балла. Летальный исход оценивался в 5 баллов.

2.4.4. Культура спленоцитов *in vitro*

См. пп. 2.3.3.

2.4.5. Анализ цитокинового профиля

Количественное определение цитокинов в супернатантах стимулированных спленоцитов проводили с использованием наборов фирмы BD OptEIA™ (США) в соответствии с методическими рекомендациями производителя. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочной кривой, полученной при титровании входящих в состав наборов стандартных образцов интерлейкинов мыши.

2.4.6. Иммуноферментный анализ

См. пп. 2.3.4.

2.4.7. Статистический анализ

См. пп. 2.3.4.

2.5. Изучение ранозаживляющей активности ВРФ

2.5.1. Реактивы и материалы

Кристаллический фуллерен C60 имел чистоту 99,9% (Sigma, США). Получение водорастворимого фуллерена C60 осуществлялось по следующей схеме [Андреев и др., 2014]. 20 мг кристаллического C60 растворяли в 25 мл N-метил-пирролидона (Sigma), используя магнитную мешалку, и полученный коричнево-фиолетовый раствор смешивали с раствором стабилизирующего агента (40 мг L-аланина (Sigma) в 100 мл дистиллированной воды). Полученный темно-красный прозрачный раствор

перемешивали 1 час 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 коричневато-желтый раствор. Концентрация фуллерена в получаемом исходном ВРФ составляла 100-130 мкг/мл. С целью повышения его концентрации в готовой мази, проводили концентрирование ВРФ в 2–7 раз путем удаления воды в вакууме.

Фуллеренол синтезировали методом, описанным ранее Li J. с коллегами с небольшой модификацией [Li et al., 1993]. Раствор фуллерена в толуоле (80 мг в 60 мл) смешивали с 0,2 мл 0,1 М раствора ТЭАГ (тетраэтиламмоний гидроксид) и 2 мл концентрированного раствора NaOH в деионизованной воде. Смесь энергично перемешивали 5 минут до образования осадка, слой толуола декантировали и остаток сушили в вакууме, после чего к нему добавляли 10 мл деионизованной воды и полученную суспензию энергично перемешивали на протяжении 10 часов. Далее к суспензии добавляли ещё 20 мл деионизованной воды для растворения остатка. Смесь фильтровали через 0,45 мкм нитроцеллюлозный фильтр и затем добавляли 50 мл метанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, супернатант декантировали и отбрасывали. Операцию экстракции метанолом и декантирования проводили троекратно и оставшееся твёрдое вещество высушивали. Выход фуллеренола составлял 65 мг. Для приготовления мази 8,1 мг фуллеренола растворили в 9 мл деионизованной воды.

Для приготовления мазей концентрированный водный раствор фуллерена (40 мкг) или водный раствор фуллеренола (40 мкг) смешивали с вазелином (378 мкг) в качестве основы, затем добавили 80 мкг стабилизирующей добавки (L-аланин), 22 мкг пальмитата сахарозы, 1 мкг нипазола и 1 мкг нипагина. Для получения однородности применяли гомогенизатор ULTRA-TURRAX T25 digital, перемешивали 10 минут без нагревания.

В качестве контроля использовали мазь, которая вместо активного компонента содержала PBS (*Phosphate buffered saline* – фосфатно-солевой буфер).

2.5.2. Лабораторные животные и компоненты для моделирования воспалений кожного покрова

См. пп. 2.3.1.

Для моделирования химического ожогового воспаления кожного покрова использовали 12,5 н. гидроксид натрия (NaOH) (Merck, Германия) и 99,5% ледяную уксусную кислоту (CH₃COOH) (Panreac, Испания). Мышам накладывали на выбритую область спины ватные диски размером 1х1 см, смоченные указанными химическими веществами в течение 60 секунд.

Для моделирования раневого воспаления кожного покрова мышам было произведено иссечение кожного покрова на спине. Размер иссечения составлял приблизительно 1х1 см. Все манипуляции с животными проводили в то время, когда они находились под эфирным наркозом.

2.5.3. Протоколы экспериментов

Для достижения поставленных задач по оценке способности фуллерена влиять на регенерацию кожного покрова, было проведено 3 *in vivo* эксперимента на мышах. Перед началом проведения экспериментов у мышей всех групп был полностью удален шерстяной покров в области спины путем выбривания.

Для проведения первого эксперимента по изучению способности фуллерена C₆₀ влиять на заживление кожного покрова после раневого поражения мышам проводили иссечение кожи спины. Лабораторные животные были разделены на 5 групп (по 8 мышей). Терапию кожных поражений начинали на следующий день после иссечения кожи. В экспериментах использовали мазь, содержащую фуллерен C₆₀ (группа «фуллерен C60») и мазь, содержащую фуллеренол C₆₀(OH)_n (группа «фуллеренол C60-OH»). Препараты в 1 г мази содержали 40 мкг активного

компонента. Контролем естественной регенерации являлась группа мышей, которым на пораженный участок кожи наносили мазь на основе PBS (группа «самозаживление»). В качестве препарата сравнения использовали крем «Бепантен плюс» (группа «Бепантен плюс»). Отрицательным контролем являлась группа мышей без поражений кожного покрова (группа «интактные»). Мази наносили с помощью металлического шпателя в достаточном количестве для полного покрытия раны ежедневно в течение 11 дней. На 12 день производили забор образцов кожи для ПЦР.

Лабораторные животные второго эксперимента были разделены на 7 групп (по 8 мышей). При моделировании кислотного или щелочного ожогов мышам наносили мазь, содержащую фуллерен C60 – группа «фуллерен C60», мазь «Д-пантенол» – группа «Д-пантенол», мазь на основе PBS – группа «самозаживление». Группа мышей без поражений кожного покрова (группа «интактные») являлась отрицательным контролем. Через 5 часов мышам всем групп начинали терапию. Препараты наносили ежедневно в течение 14 дней мышам, подвергшихся щелочному ожогу и 18 дней мышам с кислотным ожогом. На 15 и 19 день, соответственно, производили забор крови для гематологического анализа, а также образцов кожи для ПЦР и гистологического исследования.

Для проведения третьего эксперимента лабораторные животные были разделены на 4 группы (по 8 мышей). У мышей трёх групп («фуллерен C60», «Д-пантенол», «самозаживление») моделировали химический ожог кожи путем накладывания 12,5 н. NaOH в течение 60 секунд. Терапию кожных поражений проводили в течение 10 дней. На 11 день производили забор крови для гематологического анализа и образцов кожи для ПЦР.

2.5.4. Оценка ранозаживляющей эффективности

При изучении регенеративных свойств исследуемых препаратов на модели химического ожогового воспаления и раневого поражения у мышей проводили измерение раневой поверхности продольно и поперечно

(в мм) в начале и в конце эксперимента. Далее производили расчет площади поражения по формуле: $S_{эл} = \pi ab$, где $S_{эл}$ – площадь эллипса, a – большая полуось (половина длинного диаметра или поперечное измерение), b – малая полуось (половина короткого диаметра или продольное измерение). Ранозаживляющую эффективность (X) рассчитывали в процентах по формуле: $X = 100 - (S_k \times 100 / S_{ис})$, где S_k – конечная площадь раны, $S_{ис}$ – исходная площадь раны [Молчанова и др., 2012].

2.5.5. Гематологическое исследование

Забор крови производили из венозного синуса глазниц мышей. Кровь помещали в пробирки MiniCollect (Greiner Bio-One, Австрия), содержащие антикоагулянт EDTA-K2. Общее клиническое исследование крови проводили на полностью автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). Определялись следующие показатели крови: лейкоциты (WBC), эритроциты (RBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), тромбоциты (PLT). Также производился подсчет лейкоцитарной формулы (нейтрофилы (палочкоядерные, сегментоядерные), эозинофилы, базофилы, моноциты, лимфоциты).

2.5.6. Выделение мРНК

Кожа хранилась в растворе тризола (Invitrogen, США) при температуре -70°C . Перед выделением мРНК образцы кожи гомогенизировали в буфере RLT объемом 1000 мкл набора Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). В последующем использовали набор для выделения мРНК Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Для этого к лизату клеток объемом 350 мкл было добавлено 350 мкл 70% спирта, затем полученная смесь была перенесена в колонку, которую центрифугировали в течении 30 секунд (10 000 об/мин), надосадочную жидкость отбрасывали. Затем в колонку добавили 700 мкл буфера RW1 для промывки, колонку центрифугировали в течении 30 сек (10 000 об/мин) также жидкость

сбросили. После в колонку внесли 500 мкл PRE-буфера, аналогично центрифугировали и сбросили жидкость. Повторили последнюю процедуру с центрифугированием в 2 мин при 10 000 об/мин. Колонка переносилась в новую пробирку, в нее вносили 50 мкл воды (очищенной от РНК-аз) для элюирования РНК, центрифугировали 1 мин (10 000 об/мин). Количество полученной мРНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 по поглощению при длине волны 260 нм.

2.5.7. Обратная транскрипция

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 содержит RT-G-mix-1, RT-mix – 0,125 мл, ревертазу (MMLv) и ДНК-буфер. Для приготовления реакционной смеси в пробирку с RT-mix вносили по 5 мкл RT-G-mix-1, тщательно перемешивали и центрифугировали в течение 5 с при 3000-5000 об/мин, для осаждения капель со стенок. К полученному раствору добавляли 6 мкл ревертазы MMLv и аккуратно перемешивали полученную смесь путем пипетирования. Затем было подготовлено необходимое количество микроцентрифужных пробирок объемом 0,6 мл для проведения реакции. В каждую пробирку вносили по 10 мкл приготовленной реакционной смеси, затем в пробирки добавляли по 10 мкл мРНК. Реакционную смесь инкубировали в твердотельном термостате в течение 30 мин при температуре 37°C. После окончания реакции смесь разбавляли ДНК-буфером (20 мкл). Полученная кДНК в последствие использовалась для постановки ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

2.5.8. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)

Для определения уровня экспрессии генов был выбран метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени.

Для этого готовили реакционную смесь на необходимое количество образцов. На один образец: 7 мкл воды, 8 мкл 2,5х-реакционной смеси, 1

мкл смеси праймеров (10 пМ) и флуоресцентного зонда (5 пМ), 1 мкл $MgCl_2$ (25 мМ) и 3 мкл исследуемой кДНК. Реакции проводили в объёме 20 мкл в стандартных 96-луночных стрипах в амплификаторе IQ5 Bio-Rad (США). Температурный профиль реакции:

95°C – 2 минуты	} 45
58°C – 20 секунд	
95°C – 40 секунд	

Измерение интенсивности флуоресценции происходило на второй стадии (58 °C) каждого цикла.

Методом ПЦР-РВ изучали экспрессию генов *HMGB1*, *HIF-1 α* , *VEGF-A*, *FGFb*, *EGF*, *TGF β 1*, *TNF α* , *IL6*, *IL1 α* , *IL1 β* . Образцы кДНК нормировали по гену *mHPRT* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* – гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза), который играет центральную роль в генерации пуриновых нуклеотидов.

В табл. 5 представлены последовательности праймеров и зондов, которые были использованы в работе. Учет и анализ результатов проводили при помощи программного обеспечения к прибору IQ5 Bio-Rad согласно инструкциям производителя.

Табл. 5. Последовательности праймеров и зондов.

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-3')	Ген-мишень
Reverse primer (mHPRT _r)	CTTTAATGTAATCCAGCAGGTCAG	HPRT
Forward primer (mHPRT _f)	TATACCTAATCATTATGCCGAGGAT	HPRT
Reverse primer (mEGF _r)	TGAAGACAAACTGTGCCGT	EGF
Forward primer (mEGF _f)	AGCCACGCTTACATTCATTC	EGF
Reverse primer (mFGF _r)	TGCCACATACCAACTGGAGT	FGFb
Forward primer (mFGF _f)	GTGTGCCAACCGGTACCT	FGFb
Reverse primer	GTTACTGTTGGTATCATAGACATG	HIF-1 α
Forward primer	AGAATGAAGTGCACCCTAAC	HIF-1 α

Reverse primer (mHMGB1r)	TGAGAAGTTGACAGAAGCATCC	<i>HMGB1</i>
Forward primer (mHMGB1f)	GGCAAAGGAGATCCTAAGAAGC	<i>HMGB1</i>
Reverse primer (mIL1ar)	GTCGGTCTCACTACCTGTGATG	IL1a
Forward primer (mIL1af)	CTCAGATTCACAACCTGTTCGTG	IL1a
Reverse primer (mIL1br)	TCTATCTTGTTGAAGACAAACCG	IL1b
Forward primer (mIL1bf)	GTAATGAAAGACGGCACACC	IL1b
Reverse primer (mIL6r)	GTTTCTGTATCTCTCTGAAGGACTC	IL6
Forward primer (mIL6f)	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGG	IL6
Reverse primer (mTGFβ1r)	CTGATCCCGTTGATTTCCAC	TGFβ1
Forward primer (mTGFβ1f)	CTGAACCAAGGAGACGGAAT	TGFβ1
Reverse primer (mTNFαr)	CTGGGCCATAGAACTGATGAG	TNFα
Forward primer (mTNFαf)	GCTCTTCTGTCTACTGAACTTCG	TNFα
Reverse primer (mVEGF-Ar)	GTGATGTTGCTCTCTGACGTG	VEGF-A
Forward primer (mVEGF-Af)	CTTCAAGCCGTCCTGTGTG	VEGF-A
HPRT-FAM (mHPRTz)	TCCTCATGGACTGATTATGGACAGG ACT-BHQ1	HPRT
EGF-FAM (mEGFz)	GCTCCGTCCGTCTTATCAGGCATC- BHQ1	EGF
FGFb-FAM (mFGFbz)	GACGGCTGCTGGCTTCTAAGTGTGT- BHQ1	FGFb
HIF-1a-FAM (mHIF- 1az)	CCGGGGGAGGACGATGAACATCAA G-BHQ1	HIF-1a
<i>HMGB1</i> -FAM (m <i>HMGB1</i> z)	GCCGGGAGGAGCACAAGAAGAAG- BHQ1	<i>HMGB1</i>
IL1a-FAM (mIL1az)	CGTGTTGCTGAAGGAGTTGCCAGA- BHQ1	IL1a
IL1b-FAM (mIL1bz)	GCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGC- BHQ1	IL1b
IL6-FAM (mIL6z)	CTGGTCTTGAGTACCATAGCTACCT GG-RTQ1	IL6

TGFβ1-FAM (mTGFβ1z)	GCGCTCACTGCTCTTGTGACAGC- BHQ1	TGFβ1
TNFα-FAM (mTNFαz)	TGAGAAGTTCCCAAATGGCCTCCC- BHQ1	TNFα
VEGF-A-FAM (mVEGF-Az)	CTGTGCAGGCTGCTGTAACGATG- RTQ1	VEGF-A

2.5.9. Гистологическое исследование кожи

Образцы для гистологического анализа готовили по общепринятой методике. Образцы кожи фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали и уплотняли в спиртах восходящей концентрации, хлороформе и парафине при помощи гистопроцессора SLEE Mainz (Германия). Изготавливали срезы на роторном микротоме Finesse E+, Thermo Fisher Scientific (Финляндия). Срезы окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином, а также методом по ван Гизону с целью визуализации соединительной ткани. Просмотр гистологических препаратов осуществляли на микроскопе Leica DM 2000 (Германия) при увеличении 50, 100 и 400.

Оценка степени патоморфологических изменений кожи осуществлялась по бальной системе (Табл. 6). Анализ гистологических срезов проводили по следующим параметрам: степень утолщения эпидермиса, наличие некроза, стратификация кератиноцитов, степень пролиферации соединительно-тканых элементов дермы и подкожно-жировой клетчатки (ПЖК), а также присутствие в этих слоях некроза и лейкоцитарной инфильтрации.

Табл. 6. Оценка поражения кожи после ран и ожогов в баллах.

Участок к кожи	Критерий	Нет реакции (0 баллов)	Есть реакция (1 балл)	Степень поражения кожи		
				Тяжелая (1 балл)	Умеренная (2 балла)	Легкая (3 балла)
Эпидермис	Утолщение эпидермиса	выраженное	—	умеренное	слабое	отсутствует
	Стратификация кератиноцитов	отсутствует	присутствует	—	—	—
	Некроз эпидермиса	присутствует	отсутствует	—	—	—
Дерма	Пролиферация соединительно- тканых элементов	выраженная	—	умеренная	слабая	отсутствует
	Лейкоцитарная инфильтрация	выраженная	—	умеренная	слабая	отсутствует
	Некроз дермы	присутствует	отсутствует	—	—	—
Подкожная жировая клетчатка	Пролиферация соединительно- тканых элементов	выраженная	—	умеренная	слабая	отсутствует
	Лейкоцитарная инфильтрация	выраженная	—	умеренная	слабая	отсутствует
	Некроз ПЖК и подлежащих тканей	присутствует	отсутствует	—	—	—

Подсчет результатов проводился путем суммирования баллов. Для наглядности результат был представлен в виде гистограммы.

2.5.10. Статистический анализ

См. пп. 2.3.4.

2.6. Изучение фолликулостимулирующей активности ВРФ

2.6.1. Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей линии Balb/c и линии Nu/nu весом 18-20 г., в возрасте 6-8 недель, полученных из питомника ГУНЦБМТ РАМН. Вся работа с лабораторными животными проводилась в

соответствии с приказом МЗ РФ от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Положением об этическом отношении к лабораторным животным ГНЦ «Института иммунологии» ФМБА России».

2.6.2. Протоколы экспериментов

Для достижения поставленных задач по оценке способности фуллерена на функционирование ВФ, было проведено два *in vivo* эксперимента на мышах.

Для проведения первого эксперимента были использованы мыши инбредной линии Balb/c. Она считается не раковой. Окрас шерсти мышей указанной линии белый, цвет глаз красный (эффект гена альбинизма). Лабораторные животные были разделены на 4 группы (по 5 мышей в каждой). Перед началом эксперимента у мышей всех групп был полностью удален шерстяной покров в области спины путем выбривания. Затем первой группе животных вводили фуллерен C60 подкожно по 2 мкг/мышь ($V=100$ мкл), второй группе вводили PBS в том же объеме. Третья группа получала фуллерен C60 накожно (в виде мази) по 20 мкг действующего вещества на мышь, четвертая группа являлась контролем к третьей, и мыши этой группы получали основу мази без фуллерена C60. Подкожные введения и накожные аппликации повторяли на 1-й, 3-й, 5-й, 7-й, 9-й, 11-й, 13-й и 15-й дни опыта. На 16 день производили забор образцов кожи для ПЦР и гистологического исследования.

Для проведения второго эксперимента были использованы мыши линии Nu/nu. Линия считается раковой. Мыши указанной линии имеют поврежденный тимус или не имеют тимуса вообще, вследствие чего у них снижено число Т-лимфоцитов. Фенотип мышей линии Nu/nu характеризуется отсутствием шерсти. Для опыта животные были поделены на две группы – опытную и контрольную (по 6 мышей в каждой). Опытная группа мышей получала фуллерен C60 подкожно по 3 мкг/мышь в объеме 100 мкл, контрольной группе животных вводили PBS в том же объеме.

Подкожные введения осуществляли на 1-й, 3-й, 5-й, 7-й, 9-й и 11-й дни опыта. На 14-й день производили забор образцов кожи для ПЦР и гистологического исследования.

Для проведения третьего эксперимента в рамках изучения характера роста волос и анализа эффекта стимуляции роста при длительном введении ВРФ, а также после отмены введения ВРФ были использованы мыши линии Nu/nu. Для опыта животные были поделены на две группы – опытную и контрольную. Опытная группа мышей получала фуллерен C60 подкожно по 3 мкг/мышь в объеме 100 мкл, контрольной группе животных вводили PBS в том же объеме. Подкожные введения осуществляли через день на протяжении 33 дней. На 34-й день введение ВРФ было отменено. На 51-й день было решено однократно ввести ВРФ с последующей повторной отменой. Отмена длилась до 78-ого дня эксперимента. При этом фотографирование животных проводилось периодически на протяжении всего эксперимента (на 22-й, 37-й, 40-й и 79-й дни) для документирования наличия эффекта стимуляции роста волос и характера их роста.

2.6.3. Выделение мРНК

См. пп. 2.5.6.

2.6.4. Обратная транскрипция

См. пп. 2.5.7.

2.6.5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для оценки степени и характера влияния фуллерена C60 на функционирование ВФ нами была проанализирована экспрессия ряда генов. Для определения уровня экспрессии был выбран метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Для проведения реакции использовали реакционную смесь, праймеры (primer) и флуоресцирующие зонды (НПК “Синтол”, Россия). Прямой (f – forward) и обратный (r – reverse) праймеры представляли собой короткие фрагменты нуклеиновой кислоты, длиной 18-24 нуклеотида, комплементарные ДНК-мишени, а флуоресцирующие зонды –

олигонуклеотид, к которому присоединены молекула флуорофора и молекула гасителя флуоресценции. Флуорофором являлся FAM (Карбоксифлуоресцеин), с максимальным поглощением, равным 492 нм и максимальной флуоресценцией – 520 нм. Для генов *HPRT*, *Foxp3*, *Wnt10b*, *Srd5a2*, *TNF α* , *IL1a*, *IL1b*, *IL1RN*, *FGFb*, *EGF* в составе зонда был гаситель BHQ-1 (4'-(2-нитро-4-толуолдиазо)-2'-метокси-4''-(N,N-дигидроксиэтил)-5'-метилазобензол) с максимальным поглощением, равным 535 нм и диапазоном гашения, равным 480-580 нм. Для генов *DKK1*, *Wnt10b*, *Shh*, *VEGF-A*, *TGF β 1* гасителем являлся RTQ-1 (4'-(2-нитро-4-толуолдиазо)-2'-метокси-4'''-(p-N,N-дигидроксиэтил) фенил-5'-метилтетразобензол) с максимальным поглощением, равным 520 нм и диапазоном гашения, равным 470-570 нм.

В таблице 2 представлены последовательности праймеров и зондов, которые были использованы в работе. Образцы кДНК нормировали по гену mHPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase – гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза), который играет центральную роль в генерации пуриновых нуклеотидов.

Табл. 7. Последовательности праймеров и зондов.

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-3')	Ген-мишень
Reverse primer (mHPRT _r)	CTTTAATGTAATCCAGCAGGTCAG	HPRT
Forward primer (mHPRT _f)	TATACCTAATCATTATGCCGAGGAT	HPRT
Reverse primer (mFoxp3 _r)	TTCTGAAGTAGGCGAACATG	Foxp3
Forward primer (mFoxp3 _f)	TCACCTATGCCACCCTTATC	Foxp3
Reverse primer (mWnt10b _r)	GCTGTCGCTTACTCAGTCCG	Wnt10b
Forward primer (mWnt10b _f)	CTTCGACATGCTGGAGGAG	Wnt10b
Reverse primer (mDKK1 _r)	GCAGTACTCGTCAGAGCCG	DKK1

Forward primer (mDKK1f)	TCAGTTCTCATCAATTCCAACG	DKK1
Reverse primer (mShhr)	CATAGTGTAGAGACTCCTCTGAATGA	Shh
Forward primer (mShhf)	CGACATCATATTTAAGGATGAGGA	Shh
Reverse primer (mSrd5a2r)	CTATGCAGAAGGCAGTGGC	Srd5a2
Forward primer (mSrd5a2f)	CTCCGCACATTACTTCCACA	Srd5a2
Reverse primer (mTNF α r)	CTGGGCCATAGAACTGATGAG	TNF α
Forward primer (mTNF α f)	GCTCTTCTGTCTACTGAACTTCG	TNF α
Reverse primer (mIL1ar)	GTCGGTCTCACTACCTGTGATG	IL1a
Forward primer (mIL1af)	CTCAGATTCACAACTGTTCGTG	IL1a
Reverse primer (mIL1br)	TCTATCTTGTTGAAGACAAACCG	IL1b
Forward primer (mIL1bf)	GTAATGAAAGACGGCACACC	IL1b
Reverse primer (mIL1RNr)	CAAAACGATCTGATTTGGATATTC	IL1RN
Forward primer (mIL1RNf)	TCATTGTCTCATGGTGCCT	IL1RN
Reverse primer (mVEGF-Ar)	GTGATGTTGCTCTCTGACGTG	VEGF-A
Forward primer (mVEGF-Af)	CTTCAAGCCGTCCTGTGTG	VEGF-A
Reverse primer (mFGFbr)	TGCCACATACCAACTGGAGT	FGFb
Forward primer (mFGFbf)	GTGTGCCAACCGGTACCT	FGFb
Reverse primer (mEGFr)	TGAAGACAAACTGTGCCGT	EGF
Forward primer (mEGFf)	AGCCACGCTTACATTCATTC	EGF
Reverse primer (mTGF β 1r)	CTGATCCCGTTGATTTCCAC	TGF β 1
Forward primer (mTGF β 1f)	CTGAACCAAGGAGACGGAAT	TGF β 1

HPRT-FAM (mHPRTz)	FAM- TCCTCATGGACTGATTATGGACAGGACT -BHQ1	HPRT
Foxp3-FAM (mFoxp3z)	FAM- CGGAGAGGCAGAGGACACTCAATG- BHQ1	Foxp3
<i>Wnt10b</i> -FAM (m <i>Wnt10bz</i>)	FAM- TTGGCTTTGTTCAGTCGGGCTCTAAG- RTQ1	<i>Wnt10b</i>
DKK1-FAM (mDKK1z)	FAM- TACCAGACTCTTGACAACCTACCAGCCCT AC-RTQ1	DKK1
Shh-FAM (mShhz)	FAM- GATGACTCAGAGGTGCAAAGACAAGTT AAATG-RTQ1	Shh
Srd5a2-FAM (mSrd5a2z)	FAM-TCATTGCTCACCAGAGGCAGGC- BHQ1	Srd5a2
TNF α -FAM (mTNF α z)	FAM-TGAGAAGTTCCCAAATGGCCTCCC- BHQ1	TNF α
IL1a-FAM (mIL1az)	FAM- CGTGTTGCTGAAGGAGTTGCCAGA- BHQ1	IL1a
IL1b-FAM (mIL1bz)	FAM-GCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGC- BHQ1	IL1b
IL1RN-FAM (mIL1RNz)	FAM- CTGTCGTCGCTGGAGATTGACGTAT- BHQ1	IL1RN
VEGF-A-FAM (mVEGF-Az)	FAM-CTGTGCAGGCTGCTGTAACGATG- RTQ1	VEGF-A
FGFb-FAM (mFGFbz)	FAM- GACGGCTGCTGGCTTCTAAGTGTGT- BHQ1	FGFb
EGF-FAM (mEGFz)	FAM- GCCGGGAGGAGCACAAGAAGAAG- BHQ1	EGF
TGF β 1-FAM (mTGF β 1z)	FAM-GCGCTCACTGCTCTTGTGACAGC- RTQ1	TGF β 1
Reverse primer (mA2AAR)	ATAGCCAAGAGGCTGAAGAT	A2AAR
Forward primer (mA2AAR)	CACCAACTTCTTCGTGGTAT	A2AAR
A2AAR-FAM (mA2AAR)	FAM – CTCTTCTTCGCCTGCTTTGTCCTGGT – RTQ1	A2AAR

Реакции проводили в объёме 20 мкл в стандартных 96-луночных стрипах в амплификаторе IQ5 Bio-Rad (США). Реакционная смесь включала в себя ПЦР-буфер; дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ), $MgCl_2$, деионизованную воду и Taq-ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, праймеры, зонд и матрицу (кДНК).

Температурный профиль реакции: 95°C – 2 минуты, 58°C – 20 секунд, 95°C – 40 секунд (45 циклов).

Учет и анализ результатов проводили при помощи программного обеспечения к прибору IQ5 Bio-Rad согласно инструкциям производителя.

2.6.6. Гистологическое исследование кожи

Образцы кожи мышей были проведены по спиртам восходящей концентрации и в системе спирт-хлороформ, хлороформ-парафин и парафин, затем залиты в парафин с помощью гистологического оборудования SLEE Mainz (Германия). Парафиновые срезы толщиной 4 микрона получены на микротоме Finesse E+ (Финляндия), заключены в синтетическую среду под покровные стекла и окрашены гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Анализ микропрепаратов проводили с помощью микроскопа Leica DM2000 (Германия). В данной работе оценивали различия, связанные с действием фуллерена C₆₀ на развитие и рост волос между исследуемыми и контрольными группами.

2.6.7. Подсчёт количества волосяных фолликулов на гистологическом срезе

Подсчет ВФ проводили при помощи объект-микрометра ОМП N632639. Для этого был определен диаметр поля зрения объектива (N PLAN, 20x/0.40), равный 1 мм. Исходя из формулы определения площади окружности $S = \pi \cdot r^2$, где π – 3,14, r – радиус окружности, была рассчитана площадь одного поля зрения, которая равнялась 0,8 мм². Далее подсчитывалось количество волосяных фолликулов всех стадий роста в 10 полях зрения микроскопа с использованием вышеуказанного объектива.

Полученный результат выражался в количестве фолликулов на 8 мм², который затем был приведен к 1 мм².

2.6.8. Статистический анализ

См. пп. 2.3.4.

2.7. Изучение противовирусной активности ВРФ

2.7.1. Культуры клеток

В работе использовали перевиваемую линию клеток Vero. Клетки культивировали в среде Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2мМ L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. Все реактивы приобретены в ООО «ПанЭко», Россия.

2.7.2. Вирус

Противовирусную активность изучали в отношении ВПГ1, референс-штамм F, полученного из государственной коллекции вирусов при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вирус размножали на культуре клеток Vero. Инфекционную множественность (ИМ) ВПГ1 *in vitro* определяли в культуре клеток модифицированным методом бляшек и выражали в количестве бляшкообразующих единиц, содержащихся в 1 мл (БОЕ/мл).

2.7.3. Исследуемые вещества

Изучены водная дисперсия фуллерена C₆₀ (ВРФ) и 3 катионных производных C₆₀, конъюгированного с аргинином (C₆₀-Arg), лизином (C₆₀-Lys) и пиперазином (C₆₀-Pip). В качестве положительного контроля в опытах *in vitro* использовали вирусспецифический лицензированный препарат ацикловир (АЦВ, Зовиракс[®], «ГлаксоСмитКляйн Вэлком», Великобритания), в опытах *in vivo* – 5%-ную мазь для наружного применения Ацикловир-Акрихин (АЦВ-А, ОАО «Акрихин», Московская область, Россия).

2.7.4. Определение цитотоксичности.

Цитотоксичность соединений определяли по влиянию на жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения

витального красителя трипанового синего и методом МТТ. Оценку цитотоксичности осуществляли путем вычисления процентного отношения количества жизнеспособных клеток к общему количеству клеток в популяции через 72 ч после добавления соединений. Значения 50%-ной цитотоксической дозы ($ЦД_{50}$) рассчитывали методом линейной регрессии, с использованием пакета документов Microsoft Excel.

2.7.5. Определение противовирусной активности *in vitro*.

Оценка заражаемости при предварительной обработке клеток.

На монослой клеток Vero наносили ВРФ и аминокислотные производные C_{60} -Arg, C_{60} -Lys и C_{60} -Pip в различных концентрациях и инкубировали в течение 1 ч при 37⁰С в присутствии 5% CO₂. Затем соединения отбирали, клетки промывали чистой средой и заражали ВПГ1 с ИМ 0,01 БОЕ/мл в течение 1 ч при 37⁰С в присутствии 5% CO₂. После адсорбции вируса клетки промывали и вносили среду поддержки, содержащую 2% ЭТС и инкубировали в течение 48 ч при условиях, описанных выше.

Анализ противовирусной активности соединений после заражения клеток. Монослой клеток Vero заражали ВПГ1 с ИМ 0,01 БОЕ/мл и инкубировали в течение 1 ч при условиях, описанных выше. После адсорбции вируса клетки промывали, вносили исследуемые соединения в различных концентрациях и инкубировали в течение 48 ч при условиях, описанных выше.

Анализ вируцидности. Исследуемые соединения в различных концентрациях инкубировали совместно с ВПГ1 в течение 1 ч при 37⁰С. Затем инкубационную смесь наносили на монослой клеток Vero и инкубировали в течение 48 ч при условиях, описанных выше.

Во всех вариантах обработки клеток в качестве положительного контроля использовали АЦВ, в качестве отрицательного контроля – зараженные клетки, не обработанные исследуемыми веществами.

Оценку противовирусной активности изученных соединений проводили путем подсчета количества инфицированных клеток (бляшек) в

опыте и в контроле. Затем рассчитывали степень ингибирования цитопатогенного действия (бляшкообразования) ВПГ1 в опыте по отношению к контролю по формуле Спирмана-Кербера как описано ранее [14]. Для вычисления 50%-ной ингибирующей дозы (ИД₅₀) –концентрации веществ, вызывающей подавление вирусного бляшкообразования на 50% по отношению к контролю, строили графики зависимости степени ингибирования вирусной активности от концентраций соединения. Значения ИД₅₀ рассчитывали методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel. Химиотерапевтический индекс (ХТИ), в *англоязычной литературе – индекс селективности (SI)*, рассчитывали как отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀.

2.7.6. Изучение защитных свойств тестируемого соединения в отношении ВПГ-инфекции *in vivo*

Терапевтическое действие водной дисперсии фуллерена C₆₀ (ВРФ) и производного фуллерена C₆₀-Pip изучали на модели кожной герпетической инфекции мышей. В работе использовали мышей линии DBA, самок 18-20 г. Участки спины мышей (1x1 см) химически депилировали, через 24 ч участки скарифицировали и наносили 0,1 мл ВПГ1 с ИМ 1x10⁶ БОЕ/мл. Через 24 ч мышам группы 1 (n=5) наносили 0,1 мл фуллерена ВРФ (10 мкг/мышь), группы 2 (n=5) – 0,1 мл C₆₀-Pip (50 мкг/мл), группы 3 (n=8) – мазь АЦВ (концентрация АЦВ – 5000 мкг/мышь), мышам контрольной группы 4 (n=8) – 0,1 мл физиологического раствора. Все исследуемые соединения наносили на кожу 1 раз в день в течение 3-х дней. Наблюдение вели ежедневно, результаты лечения анализировали по развитию ВПГ1-специфического поражения кожи в течение 10 дней и представляли в баллах – от 0 до 6 как описано [Andreev et al., 2015; Gharbi et al., 2005].

2.7.7. Определение противовирусных антител

Активность анти-ВПГ1 антител в сыворотках мышей изучали inhouse методом ИФА как описано ранее [Witte et al., 2007]. Кратко, 96-луночные панели сорбировали антигеном ВПГ1 (50 мкг/мл) и инкубировали в

течение 18 ч при 37⁰С. Сыворотки мышей в каждой группе пулировали. После инкубации панели промывали и наносили сыворотки мышей в различных разведениях. Инкубировали в течение 2 ч при 37⁰С. Затем панели промывали и наносили анти-мышинные антитела, меченные пероксидазой (Dako, Дания). Оптическую плотность оценивали с использованием microtiter plate reader Multiskan (Tekan, Швейцария) при длине волны 450 нм. Об активности АТ судили по максимальному разведению сывороток (титру), при котором значения ОП в опытных группах в 2 раза превышали средние значения ОП для незараженных и необработанных (naïve) мышей.

2.7.8. Статистический анализ

Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных компьютерных программ STATISTICA 6.0. Для вычисления и сравнения средних значений использовали критерий Стьюдента (t-критерий), для анализа различий клинических проявлений ВПГ1-инфекции в группах использовали дисперсионный анализ повторных измерений ANOVA. Различия показателей считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

2.8. Изучение антиоксидантной активности водного раствора фуллерена C60

В рамках проведения работ было изучено два подхода к определению антиоксидантной активности фуллерена C60.

2.8.1. NBT-тест

Определение способности фуллерена и его производных ингибировать окислительный взрыв в клетках иммунной системы проводилось посредством количественного NBT-теста. Для определения антиоксидантной активности использовали краситель нитро-тетразолий синий, который под действием активных форм кислорода (АФК) образует

формазан – фиолетовое вещество с максимумом поглощения 570 нм (Рис. 25).

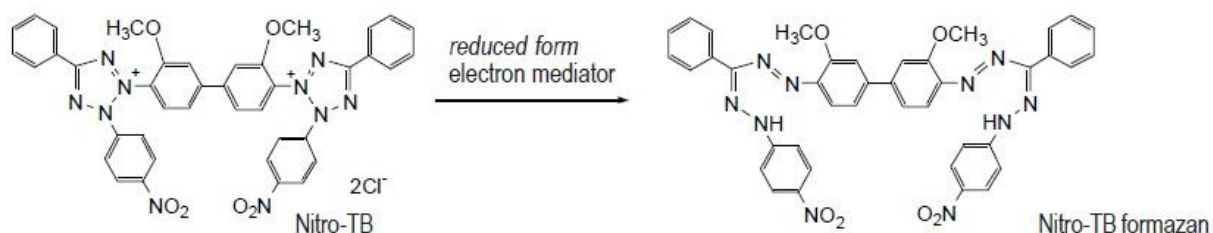


Рис. 25. Образование NTB формазана.

Высокий показатель светопоглощения соответствовал высокой концентрации АФК, то есть более выраженной стимуляции клеток.

В две пробирки объёмом 50 мл вносили по 15 мл фикола 400, наслаивали 15 мл смеси цельной крови и PBS (1:1), центрифугировали 40 минут при 400g, отбирали среднее кольцо, дважды отмывали PBS, клеточную суспензию объединяли, центрифугировали, отбрасывали супернатант, доводили объём PBS до 10 мл. Клеточную суспензию вносили по 100 мкл в 96-луночный планшет, туда же вносили 100 мкл 1 мг/мл раствора NBT и 100 мкл раствора липополисахарида *salmonella typhimurium* в концентрациях 100, 10, 1, 0,1 и 0,01 мкг/мл. Смесь инкубировали в течение 15 минут, 1 часа и 2 часов, после инкубации клетки центрифугировали 10 минут при 1000g, супернатант отбрасывали, прибавляли 100 мкл DMSO. Проводили измерение светопоглощения при длинах волн 500, 570, 640 и 700 нм. Данные представляли в виде разницы светопоглощения при 570 и 640 нм и при 500 и 700 нм.

2.8.2. Определение антиоксидантной активности ВРФ с использованием флуоресцентного сенсора

Второй подход к анализу антиоксидантной активности фуллерена C₆₀ был основан на использовании флуоресцентного сенсора белковой природы НуРег, который позволяет регистрировать динамику изменения внутриклеточной концентрации H₂O₂ (Рис. 26).

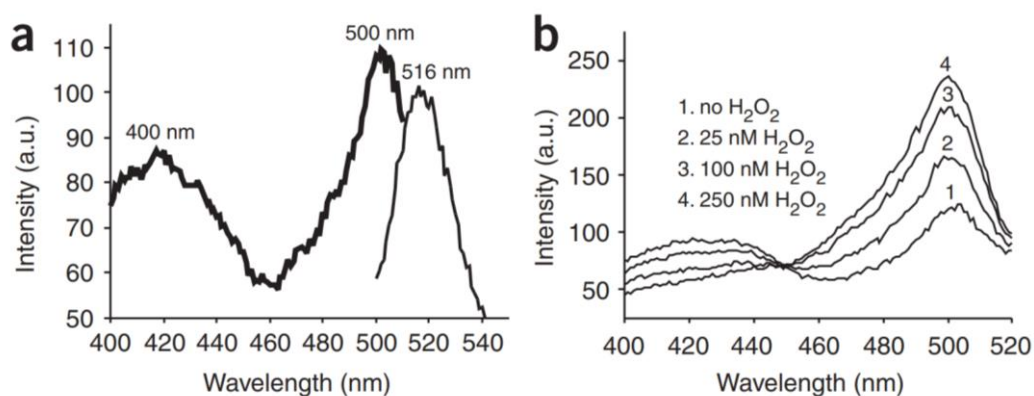


Рис.26. Спектр флуоресценции белка HyPer (a, b) и спектры поглощения HyPer при различных концентрациях пероксида водорода в среде [Gumral et al., 2009].

Клетки почки эмбриона человека (НЕК293Т) засеивали в 96-луночный планшет в количестве 5 тыс. кл./лун. в 200 мкл полной среды DMEM (10% ЭТС). Инкубировали в течение суток, после чего клетки трансфицировали плазмидой рHyPer-cyto (флуоресцентный сенсор белковой природы HyPer, который позволяет регистрировать динамику изменения внутриклеточной концентрации H_2O_2), используя следующий состав трансфекционной смеси: 0,1 мкг плазмиды, 0,2 мкл реактива р3000, 0,3 мкл реактива lipofectamine 3000, до 10 мкл среды optiMEM. Клетки инкубировали в течение суток, после чего вносили 10 мкл водного раствора фуллерена C60 с концентрацией 1 мг/мл, либо 10 мкл PBS в контрольные образцы. Спустя 4 часа инкубации клеточную среду отбирали, клетки инкубировали 5 минут в 50 мкл раствора трипсина, переносили клеточную суспензию в планшет для флуориметрии. Объём доводили PBS до 100 мкл. В лунки с опытными образцами вносили 10 мкл 50 ммоль/л раствора пероксида водорода, в лунки контроля вносили 10 мкл PBS. Проводили измерение на приборе Thermo Fisher Fluoroscan FL при длине волны поглощения 485 нм и длине волны испускания 538 нм.

2.9. Изучение способности фуллерена C₆₀ взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором

2.9.1. Метод молекулярного докинга

Методом гомологичного моделирования была построена структура PAS-B домена арил-гидрокарбонового рецептора AHR человека (структура шаблона 3F1P [Fu et al., 2013]).

Расчет траекторий МД производился с помощью программы gromacs-2019 (потенциал CHARMM36), для анализа траекторий использовалась программа VMD и пакет статистических вычислений R. В работе был использован метод, разработанный для конформационного анализа лигандов, связанных с белком-мишенью, с помощью метода кластеризации DBSCAN [Campello et al., 2013], для определения наиболее устойчивых структур PAS-B и его комплексов с FICZ.

2.9.2. Культивирование клеток

Объектом исследования в данной работе являлся водный раствор фуллерена C₆₀. Предметом исследования было изучение способности ВРФ взаимодействовать с клетками различного происхождения и влиять на уровень экспрессии АУР и ассоциированных с ним генов. Модельными культурами для решения поставленных задач являлись клеточные линии меланомы кожи человека (mel IS и mel Cher) и аденокарциномы легкого человека (A549).

Низкодифференцированная клеточная линия mel Is получена в 1998 году из опухолевого материала пациента с диагнозом: «Меланома кожи левого бедра (T4b2N3M1a) с метастазами в паховые лимфатические узлы с двух сторон, селезенку» в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Низкодифференцированная клеточная линия mel Cher получена в 2003 году из опухолевого материала пациентки, наблюдавшейся с диагнозом «Меланома кожи левой стопы с метастазами в паховые

лимфоузлы» в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

A549 представляет собой клеточную линию аденокарциномы легкого человека, полученную из карцероматозной ткани легкого от 58-летнего мужчины европеоидной расы.

Культивирование клеток проводилось с использованием культуральных флаконов фирмы Eppendorf (площадь роста 75 см², объем 270 мл). Работу с клеточными культурами осуществляли в стерильных условиях. Перед пассированием клетки промывали фосфатно-солевым раствором Дульбекко (ПанЭко, Россия), затем диссоциировали клетки монослая 0,25% трипсином-ЭДТА (ПанЭко, Россия) и центрифугировали (5 минут, 2000 оборотов/мин, 20°C) на установке Thermo Scientific Megafuge 8 (Thermo FS, США). Далее супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл полной питательной среды, состав которой указан в табл. 8. Пассирование клеток осуществляли в соотношении 1:4 для клеточных линий mel Is и mel Cher и 1:8 для A549 с периодичностью 2–4 суток в зависимости от культуры.

Табл. 8. Состав полных питательных сред для культивирования клеток.

Клеточная линия	mel Is/mel Cher	A549
Компоненты среды	среда DMEM (Thermo FS, США)	среда F-12 Nutrient Mix (Thermo FS, США)
	HEPES (Thermo FS, США)	HEPES (Thermo FS, США)
	20% фетальная бычья сыворотка (Capricorn Scientific, Германия)	10% фетальная бычья сыворотка (Capricorn Scientific, Германия)
	Пенициллин – стрептомицин (Capricorn Scientific, Германия)	Пенициллин – стрептомицин (Capricorn Scientific, Германия)
	glutaMAX (Thermo FS, США)	glutaMAX (Thermo FS, США)
	пируват натрия (Thermo FS, США)	пируват натрия (Thermo FS, США)

2.9.3. Стимуляция клеток

С целью оценки влияния ВРФ на экспрессию *AHR* и других исследуемых генов, клетки высевали в концентрации $3 \cdot 10^5$ клеток/лунку в 6-луночный планшет (Eppendorf, Германия) в 2 мл среды/лунку. Растворы стимулирующих агентов готовили непосредственно перед использованием (Табл. 9). Через 24 часа после стимуляции осуществляли сбор супернатантов и клеточных лизатов для анализа. Клетки лизировали с использованием буфера из набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, Франция). Полученные лизаты хранили при температуре -70°C .

Табл. 9. Перечень стимулирующих агентов и их концентрации.

Стимулирующий агент	Концентрации
ВРФ*	20 нМ и 0,2 нМ
Аддукт фуллерена C_{60} с лизином*	20 нМ и 0,2 нМ
FICZ (Merck, США)	30 нМ и 3 нМ
Ресвератрол (Alfasigma, Италия)	50 нМ и 10 нМ
Мелатонин (НАО «Северная звезда», Россия)	2000 нМ, 200 нМ, 2 нМ
$\text{IFN}\gamma$ (НПП «Фармаклон», Россия)	2 нМ и 0,2 нМ

* ВРФ, водный раствор фуллерена C_{60} , стоковый ВРФ (1000 $\mu\text{g/ml}$) был приготовлен по методу Андреева С. М [Патент RU 2548971, 2015] FICZ, 6-Формилиндола [3,2-b] карбазол; $\text{IFN}\gamma$, интерферон гамма.

2.9.4. Выделение мРНК

См. пп. 2.2.4.

2.9.5. Обратная транскрипция

См. пп. 2.5.7.

2.9.6. ПЦР-РВ

Для определения уровня экспрессии исследуемых генов был выбран метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Общую реакционную смесь готовили в стерильной пробирке типа Эппендорф объемом 1,5 мл с использованием набора реактивов СИНТОЛ (Россия) (Табл. 10). В микропробирки стрипов объемом 200 мкл (ПанЭко, Россия) в соответствии со схемой эксперимента вносили по 17 мкл общей реакционной смеси, затем добавляли в них по 3 мкл соответствующего

образца кДНК и центрифугировали на установке Microspin FV–2400 Biosan. Конечный объем реакции составлял 20 мкл. Реакцию проводили в амплификаторе IQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System в условиях теплового цикла в соответствии с табл. 11 и 12.

Табл. 10. Состав общей реакционной смеси для ПЦР–РВ.

Реагенты	Объём для одной реакции, мкл	Объём смеси для N реакций, мкл
2.5х Реакционная смесь*	8	8 * N
MgCl ₂ (25мМ)	1	1 * N
ddH ₂ O (деионизированная вода)	7	7 * N
Смесь праймеров (10 пкмоль/мкл)	1	1 * N
Флуоресцентный зонд (10 пкмоль/мкл)		

*Смесь содержит 2.5х ПЦР буфер Б (KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 мМ MgCl₂, SynTaq ДНК–полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween–20).

Табл. 11. Температурный профиль ПЦР–РВ (АСТВ).

Шаг	Температура, °С	Время, с	Количество циклов
Начальный шаг активации ПЦР	95	120	40
Денатурация	95	20	
Отжиг, элонгация	58	40	

Табл. 12. Температурный профиль ПЦР–РВ (hHPRT).

Шаг	Температура, °С	Время, с	Количество циклов
Начальный шаг активации ПЦР	94	15	40
Денатурация	62	15	
Отжиг, элонгация	72	15	

Измерение интенсивности флуоресценции происходило на второй стадии (95°C / 62°C) каждого цикла.

С целью последующего анализа методом ПЦР–РВ определяли уровень экспрессии следующих человеческих генов: *AHR*, *NRF2*, *NQO1*, *CYP1A1*, *CYP1B1*. В качестве нормализующего гена были выбраны гены *HPRT* и *ACTB*. Уровень экспрессии указанных целевых генов рассчитывался относительно уровня экспрессии выравнивающего гена.

Последовательности ген–специфических праймеров и зондов представлены в табл. 13.

Табл. 13. Последовательности праймеров и зондов определяемых генов.

Олигонуклеотид	Последовательность (5'–3')	Ген–мишень
Прямой праймер (hAHR–f)	CAGTAAAGCCAATCCCAGC	AHR
Обратный праймер (hAHR–r)	CCAAACGGTCCAACCTCTGTA	AHR
AHR–ROX (hAHR–z)	(ROX) TCCTTCCAAGCGGCATAGAGACCGAC (RTQ2)	AHR
Прямой праймер (hNQO1–f)	TTCAGAGTGGCATTCTGCAT	NQO1
Обратный праймер (hNQO1–r)	CCAAATATTCTCCAGGCGTTTC	NQO1
NQO1– ROX (hNQO1–z)	(ROX) GCACACTCCAGCAGACGCCCCGAAT (RTQ2)	NQO1
Прямой праймер (hNRF2–f)	TTCCCAAATCAGATGCTTTG	NRF2
Обратный праймер (hNRF2–r)	GGGAATATCAGGAACAAGTG	NRF2
NRF2–ROX (hNRF2–z)	(ROX) GACTGCATGCAGCTTTTGGCG (BHQ2)	NRF2
Прямой праймер (hBAct–G6–f)	CATCACCATTGGCAATGAG	ACTB

Обратный праймер (hBAct–G6–r)	CACACTTCATGATGGAGTTGAAG	ACTB
BAct–ROX (hBAct–G6–z)	(ROX) CTTCCTTCCTGGGCATGGAGTCCTGTG (BHQ2)	ACTB
Прямой праймер (hCYP1A1–f)	GTCAAGGAGCACTACAAAAC	CYP1A1
Обратный праймер (hCYP1A1–r)	AAAGAGGTCCAAGACGATG	CYP1A1
CYP1A1–ROX (hCYP1A1–z)	(ROX) GAGAAGGGCCACATCCGGGAC (BHQ2)	CYP1A1
Прямой праймер (hCYP1B1–f)	CACCAGGTATCCTGATGTG	CYP1B1
Обратный праймер (hCYP1B1–r)	TTGACAAAAACCACAGTGT	CYP1B1
CYP1B1–ROX (hCYP1B1–z)	(ROX) GTGCAGGCAGAATTGGATCAGGTCTG (BHQ2)	CYP1B1
Прямой праймер (hHPRT–f)	GGACTAATTATGGACAGGACTGAACGT	HPRT
Обратный праймер (hHPRT–r)	TCCACAATCAAGACATTCTTTCCAG	HPRT
HPRT–FAM (hHPRT–pt)	(BHQ1) CAGCCCCCCT (FdT) GAGCACACAGAGG	HPRT

2.10. Изучение способности фуллерена C60 взаимодействовать с мембранными фосфолипидами

2.10.1. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) были выделены методом седиментации в градиенте плотности фиколла-400 по стандартному протоколу (STEMCELL Technologies) и посеяны в 6-луночный культуральный планшет в концентрации 20млн/лунку. Далее, клетки инкубировались в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ в культуральной среде IMDM (Bioinnlabs, Россия) с добавлением 10% FBS (HyClone, Южная Америка), Sodium

Piruvate (100x) (Gibco, Китай), Hepes (100x) (Capricorn, Германия), Insuline (500x) (ПанЭко, Россия), Glutamax (Gibco, Китай) (100x).

2.10.2. Дифференцировка РВМС

Для получения из РВМС макрофагов М0 непрекрепившиеся клетки через сутки после посева были удалены и произведена смена среды IMDM на IMDM+M-CSF (5 мкг/мл) (SCI-STORE, Россия) в объеме 2 мл/лунку. Инкубацию клеток вели в течение 4 суток при 37°C и 5% CO₂. Далее, была добавлена еще половина IMDM+M-CSF (5 мкг/мл) от исходного объема среды. Через 24 часа инкубации при 37°C и 5% CO₂ в соответствующие лунки «С60» и «С60+лецитин» был добавлен ВРФ (10 мкг/мл) и ВРФ (10 мкг/мл) + лецитин яичный (100 мкг/мл) (Serva, Германия), соответственно. Через 24 часа после инкубации клеток при 37°C и 5% CO₂ среда с ВРФ и ВРФ и лецитином была удалена и добавлена среда из донорских лунок, клетки в которых инкубировались при тех же условиях, но без внесения ВРФ. Далее, в лунки был добавлен ЛПС (Lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae* Inaba 569B, LPS, Sigma) (10 нг/мл) и IFN γ (ABclonal) (50 нг/мл) для поляризации макрофагов до фенотипа М1 или ИЛ-4 (10 нг/мл) и ИЛ-13 (20 нг/мл) (ABclonal) для поляризации макрофагов до фенотипа М2. Затем, через 48 часов после инкубации при 37°C и 5% CO₂ был произведен лизис клеток с помощью лизирующего буфера (Qiagen, Германия) с 1% β -меркаптоэтанолом и проведено выделение РНК (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

2.10.3. Фенотипирование макрофагов

Фенотипирование макрофагов проводили путем визуального анализа внешнего вида дифференцированных клеток под микроскопом, а также методом проточной цитометрии по стандартному протоколу. Для анализа использовали антитела к CD206, CCR7 и к CD14.

2.10.4. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для определения уровня экспрессии был выбран метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени согласно методике, описанной выше (раздел 2.6).

В табл. 14 представлены последовательности праймеров и зондов, которые были использованы в работе и не были описаны выше.

Табл. 14. Последовательности праймеров и зондов.

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-3')	Ген-мишень
Обратный праймер	AGGAAGCAGCCCAAACAC	COX1
Прямой праймер	GCCTGTGTTGATGCACTAC	COX1
Зонд (h COX1z)	FAM – GCCAGATGGCTGTGGGCCAG– RTQ1	COX1
Обратный праймер	GAAGCCTGTGATACTTTCTGTAC	COX2
Прямой праймер	CTGGAACATGGAATTACCCAG	COX2
Зонд (hCOX2z)	FAM – CAGGCAAATTGCTGGCAGGGTTGC –RTQ1	COX2
Обратный праймер	ATGGAATCTCATATTTGGAGGTAG	A12L
Прямой праймер	ACATGTTCCAGAAGCATCG	A12L
Зонд (hA12Lz)	FAM- CAGACAGCAGATCTACTGCTGGGC CAC-RTQ1	A12L
Обратный праймер	GTGAAGATCACCACGGTC	ALOX-5
Прямой праймер	CTTCCCCAAGTCGGTCAA	ALOX-5
Зонд (hALOX-5z)	FAM- AGCCGGGAGCAGCTGTCG- BHQ1	ALOX-5
Обратный праймер	CTGGACAGTGTCTGAAAGTA	STAT6
Прямой праймер	CAGATCATGTCTCTGTGGG	STAT6
Зонд (hSTAT6)	ROX- GTGCAGCGGCTCTATGTCGACTT- BHQ2	STAT6

2.11. Изучение способности фуллерена C₆₀ влиять на профиль генов цитокинов, экспрессируемых миелоидными клетками человека

2.11.1. *Анализ хемотаксиса макрофагов*

Перитонеальные макрофаги мыши получали с помощью промывания брюшной полости раствором фосфатно-солевого буфера. Мышей эвтаназировали, затем асептически вскрывали брюшину и промывали брюшную полость 5 мл ФСБ, используя пинцет и пипетку. Для исключения адгезии клеток к пластику пробирку с суспензией перитонеальных клеток держали на ледяной бане. Суспензию клеток перитонеальной полости мыши центрифугировали при 250 g 10 мин, затем убирали надосадочную жидкость и добавляли полную питательную среду на основе DMEM. Далее, клетки высевали в 6-луночный планшет (100-150 тыс. кл/лун.), куда предварительно была внесена и высушена капля ВРФ. Через 5 дней проводили фотографирование и учет результатов.

2.11.2. *Культивирование клеточной линии ТНР-1*

Клетки моноцитарной линии лейкемии человека ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) в присутствии 10 mM HEPES Buffer Solution (Capricorn scientific, Германия), 1 mM пирувата натрия (Gibco, Thermo fs, США), 2 mM L-глутамина (Gibco, Thermo fs, США) и смеси антибиотиков пенициллин-стрептомицин (100 µg/mL). Полная питательная среда для клеток линии ТНР-1 – 10% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn scientific, Германия). Пассирование культур клеток проводили каждые 2–3 дня (1:10). Клетки инкубировали в термостате при температуре 37 °C и 5% CO₂. Поддерживалась плотность клеток от 1×10^5 до 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

2.11.3. *Стимуляция клеточной линии ТНР-1*

Дифференцировку клеток линии ТНР-1 проводили в 6-луночных планшетах ($0,8 \times 10^6$ клеток/лунку) в полной питательной среде RPMI-1640 без антибиотика в присутствии 10 mM HEPES Buffer Solution (Capricorn

scientific, Германия), 1mM пирувата натрия (Gibco, Thermo fs, США), 2 mM L-глутамина (Gibco, Thermo fs, США) и смеси антибиотиков пенициллин-стрептомицин (100 µg/mL). В первый день клетки дифференцировали в присутствии форбол-12-миристат-13-ацетата в концентрации 10 нг/мл «РМА». В отдельный 6-луночный планшет добавляли ВРФ С60 10 мкл/мл (в дозе 20 мкг/лунку) и 1 мкг/мл (в дозе 2 мкг/лунку). ТНР-1 стимулировали 24 часа. Во второй день стимуляции отбирали содержимое каждой лунки и центрифугировали (5 минут, 400 g, 20 °C), затем удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли питательную среду без антибиотика и ресуспендировали. Далее клетки ТНР-1 давали «отдохнуть» в течение 24 часов.

На третий день стимуляции отбирали содержимое каждой лунки и центрифугировали (5 минут, 400 g, 20 °C), затем удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли среду питательную среду без антибиотика и ресуспендировали. Далее к клеткам вносили 20 нг/мл IFN γ (R&D System) и 10 пг/мл LPS (Sigma, США) («IFN γ +LPS»). В отдельные лунки вносили 20 нг/мл IL-4 (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Germany) («IL-4»). В отдельный 6-луночный планшет добавляли ВРФ С60 10 мкл/мл (в дозе 20 мкг/лунку) и 1 мкг/мл (в дозе 2 мкг/лунку). ТНР-1 стимулировали 24 часа. На четвертый день стимуляции отбирали содержимое каждой лунки и центрифугировали (5 минут, 400 g, 20 °C), затем удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли лизирующий буфер 350 мкл из набора Rneasy Mini Kit (250) и ресуспендировали. Клеточные лизаты хранили при -70 °C. Степень экспрессии цитокинов стимулированными клетками анализировали методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Фенотипирование клеток проводили методом проточной цитометрии.

2.11.4. Выделение мРНК

См. пп. 2.2.4.

2.11.5. Обратная транскрипция

См. пп. 2.5.7.

2.11.6. *Полимеразная цепная реакция в реальном времени*

Для оценки степени и характера влияния фуллерена C60 на функционирование Мф нами была проанализирована экспрессия ряда генов. Для определения уровня экспрессии был выбран метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Для проведения реакции использовали реакционную смесь, праймеры (*primer*) и флуоресцирующие зонды (НПК “Синтол”, Россия). Прямой (*f – forward*) и обратный (*r – reverse*) праймеры представляли собой короткие фрагменты нуклеиновой кислоты, длиной 18–24 нуклеотида, комплементарные ДНК-мишени, а флуоресцирующие зонды – олигонуклеотид, к которому присоединены молекула флуорофора и молекула гасителя флуоресценции. Флуорофором для гена hNPT являлся FAM (Карбоксифлуоресцеин), с максимальным поглощением, равным 492 нм и максимальной флуоресценцией – 520 нм. Флуорофором для генов IFN γ , IL-1 α , IL-12, c-Мус, ATG5 являлся ROX; в составе зонда был гаситель BHQ-1 (4'-(2-нитро-4-толуолдиазо)-2'-метокси-4''-(N,N-дигидроксиэтил)-5'-метилазобензол) с максимальным поглощением, равным 535 нм и диапазоном гашения, равным 480-580 нм. Флуорофором для генов TNF α , VEGF-A, TGF β 1, IL-10, CCL2, IL-6, IL-1 β являлся ROX; гасителем являлся RTQ-1 (4'-(2-нитро-4-толуолдиазо)-2'-метокси-4''''-(p-N,N-дигидроксиэтил) фенил-5'-метилтетразобензол) с максимальным поглощением, равным 520 нм и диапазоном гашения, равным 470-570 нм.

В табл. 15 представлены последовательности праймеров и зондов, которые были использованы в работе. Образцы кДНК нормировали по гену hNPT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* – гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза), который играет центральную роль в генерации пуриновых нуклеотидов. Уровень экспрессии указанных генов рассчитывался относительно выравнивающего гена.

Табл. 15. Последовательности праймеров и зондов.

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-3')	Ген-мишень
Обратный праймер (hHPRT _r)	TCCACAATCAAGACATTCTTTC CAG	HPRT
Прямой праймер (hHPRT _f)	GGACTAATTATGGACAGGACT GAACGT	HPRT
Зонд (hHPRT-pt)	CAGCCCCCCTGAGCACACAGA GG	HPRT
Обратный праймер (hTNF _{αr})	GCTGGTTATCTCTCAGCTCC	TNF _α
Прямой праймер (hTNF _{αf})	AGGCAGTCAGATCATCTTCTC	TNF _α
Зонд (hTNF _{αz})	CCATGTTGTAGCAAACCCTCA AGCTGAG	TNF _α
Обратный праймер (hIL-10 _r)	TGTCTGGGTCTTGGTTCT	IL-10
Прямой праймер (hIL-10 _f)	TCCTTGCTGGAGGACTTTA	IL-10
Зонд (hIL-10f z)	TGGGTGGCCAAGCCTTGTCTGA GA	IL-10
Обратный праймер (hCcl2 _r)	TTGTCCAGGTGGTCCAT	CCL2
Прямой праймер (hCcl2 _f)	CCCAAAGAAGCTGTGATCTT	CCL2
Зонд (hCcl2z)	CCATTGTGGCCAAGGAGATCT GTGCT	CCL2
Обратный праймер (hIL-6 _r)	CTGGACTGCAGGAAGTCC (GGAGTTCCTGCAGTCCAG)	IL-6
Прямой праймер (hIL-6 _f)	AGAATCTAGATGCAATAACCA CC	IL-6
Зонд (hIL-6z)	CAGTGGCTGCAGGACATGACA ACTC	IL-6
Обратный праймер (hIL-12 _r)	TAATGCTGGCATTTTTTGCG	IL-12
Прямой праймер (hIL-12 _f)	CAAGAACTTGCAGCTGAAG	IL-12
Зонд (hIL-12z)	CAGGTGGAGGTCAGCTGGGAG TAC	IL-12
Обратный праймер (hIL-1a _r)	ACTCAGAGACACAGATTGATC C	IL-1a
Прямой праймер (hIL-1a _f)	GACAGTTCCTCCATTGATCATC	IL-1a
Зонд (hIL-1az)	GCTATGGCCCACTCCATGAAG GCTG	IL-1a
Обратный праймер (hIL-1b _r)	ACACGCAGGACAGGTACAG	IL-1b
Прямой праймер (hIL-1b _f)	TGGTCCATATGAACTGAAAGC	IL-1b

Зонд (hIL-1bz)	GGAGCAACAAGTGGTGTTCCTC CATGTC	IL-1b
Обратный праймер (hIFN γ r)	CTTGAAACAGCATCTGACTCC	IFN γ
Прямой праймер (hIFN γ f)	CGGTAAGTGAAGTGAATGTCC	IFN γ
Зонд (hIFN γ z)	CCAAGTGATGGCTGAACTGTC GC	IFN γ
Обратный праймер (hVEGF-Ar)	TCGTTTAACTCAAGCTGCC	VEGF-A
Прямой праймер (hVEGF-Af)	GCACAACAAATGTGAATGC	VEGF-A
Зонд (hVEGF-Az)	CAGAGCGGAGAAAGCATTTGT TTGTACAAGATC	VEGF-A
Обратный праймер (hATG5r)	CATGACATAAAATGAGCTTCA ATTG	ATG5
Прямой праймер (hATG5f)	CCTTGGAACATCACAGTACATT	ATG5
Зонд (hATG5z)	GACCTTCTGCACTGTCCATCTA AGGAT	ATG5
Обратный праймер (hc-Mycr)	CGTAGTCGAGGTCATAGTTCC	c-Myc
Прямой праймер (hc-Mycf)	GCTGCTTAGACGCTGGATTT	c-Myc
Зонд (hc-Mycz)	CGCGACGATGCCCCTCAACGT TAG	c-Myc
Обратный праймер (hTGF β r)	CTTGCTGTACTGCGTGTCC	TGF β
Прямой праймер (hTGF β f)	GACACCAATATTGCTTCAGC	TGF β
Зонд (hTGF β z)	CAAGGGCTACCATGCCAACTT CTGC	TGF β

Реакции проводили в объёме 20 мкл в стандартных 96-луночных стрипах в амплификаторе IQ5 Bio-Rad (США). 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).

Для генов – c-Myc, ATG5, IL-6, IL-12, IL-1a, IL-10, CCL2 температурный профиль реакции был:

1. 95°C – 2 минуты, 58°C – 20 секунд, 95°C – 40 секунд (45 циклов).

Измерение интенсивности флуоресценции происходило на стадии при 58°C каждого цикла.

Для hNPRТ температурный профиль реакции был:

1. 94°C – 15 сек, 62°C – 15 секунд, 72°C – 15 секунд (5 циклов);
2. 94°C – 15 сек, 62°C – 15 секунд, 72°C – 15 секунд (35 циклов).

Измерение интенсивности флуоресценции происходило на 2 стадии (62°C) каждого цикла.

Для генов – TNF α , IL-1b, VEGF-A, TGF β , IFN γ реакцию проводили в амплификаторе в следующих условиях:

1. 95°C – 5 минут (1 цикл);
2. 62°C – 45 секунд, 95°C – 20 секунд (5 циклов);
3. 62°C – 45 сек, 95°C – 20 секунд (40 циклов).

Измерение интенсивности флуоресценции происходило на 3 стадии (62°C) каждого цикла.

Учет и анализ результатов проводили при помощи программного обеспечения к прибору IQ5 Bio-Rad согласно инструкциям производителя.

2.12. Изучение общетоксических свойств ВРФ

2.12.1. Экспериментальные животные.

В работе использовали самок мышей линии BALB/c весом 18—20 г., в возрасте 8—10 нед, из питомника ГУНЦБМТ РАМН. Токсические свойства ВРФ изучали путем введения препарата внутривенно (в/в), внутрибрюшинно (в/б) и интрагастрально (и/г).

2.12.2. Изучение острой токсичности ВРФ

Острую токсичность изучали путем в/в, в/б и и/г введений препарата в различных дозах. Изучали токсические свойства ВРФ при в/в введении по следующей схеме. Мышей разделили на 5 групп по 6 особей в каждой. Первой — четвертой группам фуллерен C60 вводили в дозах 2, 8, 40 и 200 мкг соответственно, в объеме 200 мкл. Пятая группа служила контрольной, в ней мыши получали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в том же объеме. Наблюдение за поведением животных и оценку их веса проводили в течение 7 дней после введения препарата. В эксперименте по изучению

токсичности ВРФ при в/б введении мышей разделили на 9 групп по 6 особей в каждой. Мышам вводили препарат в расчете на фуллерен в дозах 40, 80, 160, 200, 320, 500, 1000 и 2700 мкг (1—8-я группы соответственно) в объеме 500 мкл. Раствор, содержащий 500 мкг фуллерена и более, представлял собой суспензию с видимыми частицами препарата. Животные 9-й группы получали ФСБ. Наблюдение за поведением животных и оценку их веса проводили в течение 7 дней после введения фуллерена С60. Для изучения токсического эффекта при и/г введении препарат был взят в дозе 1 мг в объеме 300 мкл, содержащей как растворимую форму С60, так и нерастворимые частицы С60. Контрольным животным вводили воду в том же объеме. После введения в течение 16 сут проводили наблюдение за животными, которое включало в себя ежедневный клинический осмотр, динамическое измерение массы тела. Процедура клинического осмотра состояла из внешнего осмотра и оценки состояния кожного покрова, полости носа и наружного слухового прохода, состояния перианальной, периоральной и периорбитальной областей. Оценивали также наличие и характер дефекации и мочеиспускания. Через 16 сут от момента введения суспензии фуллерена проводили наркотизирование мышей в СО₂-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. Для контроля наличия фуллерена С60 в крови через час после и/г введения у мышей брали кровь на анализ. Затем для гистологического исследования извлекали желудочно-кишечный тракт, печень, поджелудочную железу, почки, матку, яичники.

Некропсия и гистологическое исследование

Через 14 сут от момента введения суспензии фуллеренов проводили наркотизирование мышей в СО₂-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. Образцы органов фиксировали в 10% буферным раствором формалина (рН 6,8—7,2). Обезвоживание, проводку образцов и пропитывание парафином производили в гистопроцессоре автоматического типа SLEE MAINZ (Германия), заливку в парафин — с использованием заливочной станции SLEE MAINZ (Германия). Микротомирование парафиновых блоков для получения срезов толщиной 4 мкм осуществляли с помощью автоматизированного ротационного микротомы 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).

2.12.3. *Изучение хронической токсичности ВРФ*

Хроническая токсичность ВРФ была изучена при многократном в/б введении по следующей схеме. Мышей разделили на 3 группы по 8 особей в каждой. Первой группе ВРФ вводили в дозе 400 мкг в присутствии стабилизирующего агента, поэтому раствор был без осадка), второй – в той же дозе, но без стабилизатора, поэтому раствор был с осадком. Такая схема была необходима, чтобы оценить токсический эффект свободного фуллерена C60 в стабилизированном и не стабилизированном виде. Объем введения составлял 500мкл. Третья группа служила контрольной, в ней мыши получали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в том же объеме. Введение ВРФ осуществляли ежедневно в течение 31 дня. Наблюдение за поведением животных и оценку их веса также проводили ежедневно в течение 31 дня. На 31 день был проведен итоговый клинический осмотр и

оценка состояния животных, после чего был произведен забор органов и тканей для детального гистологического исследования.

Некропсия и гистологическое исследование

Методика пробоподготовки и проведения некропсии и гистологического анализа была аналогичной таковой при анализе острой токсичности ВРФ (см. раздел 2.11.2).

2.12.4. Статистический анализ

При сравнении групп результаты статистически обрабатывали с использованием программы Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., США), причем статистическую значимость устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Значения $p \leq 0,05$ принимали как статистически значимые.

2.13. Изучение фармакокинетических свойств и кинетики выведения фуллерена C₆₀

2.13.1. Пробоподготовка

Метод жидкость-жидкостной экстракции фуллерена C₆₀ из биологических образцов.

Для пробоподготовки биологических образцов их гомогенизировали в 2 мл фосфатного буфера. К 1 мл гомогенизата добавляли 3 мл толуола, встряхивали на вортексе в течение 10 минут, центрифугировали при 13000 об/мин, толуольный слой отделяли и упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл ацетонитрила в ультразвуковой бане. Полученный раствор вводили в хроматограф для анализа.

Для анализа C₆₀ в моче и кале мышей также был выбран метод жидкость-жидкостной экстракции. К 200 мкл мочи (из сборника) добавляли 1 мл толуола, смесь встряхивали на вортексе в течение 10 минут и затем центрифугировали при 13000 об/мин для разделения слоев. Толуольный слой отделяли и упаривали досуха в вакууме, а сухой остаток

растворяли в 100 мкл толуола с помощью ультразвуковой бани. При анализе экскрементов кала биоматериал сначала взвешивали, потом отвешивали 1 мг биоматериала и гомогенизировали с 1 мл деионизированной воды. Гомогенат с водой встряхивали на вортексе в течении 10 минут. Далее центрифугировали при скорости 13т.об/мин и отделяли надосадочную жидкость. Затем к надосадочной жидкости добавляли 3 мл толуола, встряхивали на вортексе в течении 10 минут. Далее центрифугировали при скорости 13т.об/мин для разделения слоев. Толуольный слой отделяли и упаривали досуха. Сухой остаток растворялся при помощи ультразвуковой бани в 100 мкл толуола.

Метод твердофазной экстракции для плазмы крови и внутренних органов мышей

При исследовании плазмы крови мышей использовали метод твердофазной экстракции. Для этого картриджи C18 Chromabond 1ml/100mg были активированы 1 мл толуола, 2 мл метанола и 1 мл деионизированной воды, затем заполнены деионизированной водой. Затем через картриджи было пропущено 200 мкл плазмы крови мышей с помощью вакуумного экстрактора. Затем картридж промывался 1 мл деионизированной воды, а затем фуллерен смывался 1 мл толуола. Толуольный слой выпаривался досуха. Сухой остаток был растворен при помощи ультразвуковой бани в 100 мкл толуола. При анализе внутренних органов орган сначала взвешивали, затем гомогенизировали в 1 мл деионизированной воды. Гомогенат с водой встряхивали на вортексе в течении 10 минут. Далее центрифугировали при скорости 13т.об/мин и отделяли надосадочную жидкость. Далее активировали картриджи C18 Chromabond 1ml/100mg как описано выше и пропускали через них надосадочную жидкость. Затем картридж промывался 1 мл деионизированной воды, а затем фуллерен смывался 1 мл толуола. Толуольный слой выпаривался досуха. Сухой остаток был растворен при помощи ультразвуковой бани в 100 мкл толуола.

2.13.2. *Количественное определение фуллерена в биологических образцах*

Для изучения фармакокинетики и кинетики выведения фуллерена C₆₀ использовался чувствительный и специфический метод анализа фуллерена в различных средах [Смирнов и др., 2016]. Для пробоподготовки биологических образцов использовали методику, описанную выше. Концентрацию фуллерена в биологических образцах определяли с помощью метода LC-MS на хроматографе Agilent 1200 с масс-селективным детектором.

Хроматографические условия приведены в табл. 16.

Табл. 16. Параметры хроматографирования биообразца и детектирования фуллерена C₆₀.

<i>Подвижная фаза</i>	толуол/ацетонитрил (60:40)
<i>Режим элюирования</i>	изократический, скорость потока 1 мл/мин
<i>Неподвижная фаза</i>	хроматографическая колонка Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4,6 мм, 5 мкм, температура 30°C.
<i>Объем вводимой пробы</i>	10 мкл
<i>Время хроматографирования</i>	3,5 мин
<i>Режим детектирования:</i>	Тип ионизации: APCI Режим детектирования: SIM Полярность: негативная Напряжение на капилляре: 1300-1700 В Давления распылительного газа: 2,0 - 5,5 атм. Скорость высушивающего газа: 10 л/мин Температура распыления: 3500°C Температура высушивания: 3500°C m/z (для C ₆₀) = 720

Для количественного определения был использован метод абсолютной калибровки. Диапазон линейности составил 50–1500 нг/мл ($y = 64,277x + 326,34$, $R^2 = 0,9933$).

Фармакокинетические параметры рассчитывали модельнонезависимым методом. Были взяты следующие параметры: C_{max} – максимальная концентрация; T_{max} – время достижения

максимальной концентрации; AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой в пределах длительности наблюдений (рассчитывали методом трапеций); отношение C_{max} / AUC_{0-t} по индивидуальным значениям (характеристика скорости всасывания), $T_{1/2}$ – период полувыведения.

При статистической обработке экспериментальных данных рассчитывали следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение (Mean), среднее геометрическое значение (GMean), стандартное отклонение среднего результата (SD), коэффициент вариации (CV), медиана (Median).

Согласно МР 1.2.2641–10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах», использованный в данной работе ВЭЖХ-метод анализа фуллерена C₆₀ в биологических образцах характеризуется точностью определения $\pm 16\%$, полнота извлечения составляет не менее 80%. Минимальное определяемое количество составило 0,001 мкг/мл биологического образца.

2.13.3. *Фармакокинетические исследования*

Исследование биораспределения фуллерена ВРФ было проведено на мышцах линии BALB/c (массой 20 ± 2 г), которым однократно накожно наносили ВРФ в форме мази (80 мкг C₆₀/1г мази или 20мкг/мышь), вводили ВРФ в виде раствора интрагастрально (150 мкг/мышь) или внутривенно (10 мкг/мышь).

Для опыта с накожным применением фуллерена использовали 30 мышей. На выбритый участок кожи лабораторных животных наносили ВРФ (в форме мази). Схема опыта при накожном (н/к) нанесении представлена в табл. 17.

Табл. 17. Схема эксперимента по изучению фармакокинетики фуллерена С60 на мышах при накожном нанесении.

№	Доза, мкг/мышь	Время выдержки, ч	Количество мышей	Исследуемые органы
1	20	0	3	Печень Почки Легкие Мозг Селезенка Кожа Сыворотка крови
2	20	0,25	3	
3	20	0,5	3	
4	20	1	3	
5	20	1,5	3	
6	20	2	3	
7	20	4	3	
8	20	6	3	
9	20	8	3	
10	0	0	3	

Для опыта с интрагастральным применением фуллерена С60 использовали 30 мышей. Интрагастральное введение ВРФ осуществляли при помощи специальной канюли для внутрижелудочного введения мышам. Схема опыта при интрагастральном введении представлена в табл. 18.

Табл. 18. Схема эксперимента по изучению фармакокинетики фуллерена С60 на мышах при интрагастральном введении.

№№	Доза, мкг/мышь	Время выдержки, ч	Количество мышей	Исследуемые органы
1	150	0	3	Печень Почки Легкие Мозг Селезенка Кожа Сыворотка крови
2	150	0,25	3	
3	150	0,5	3	
4	150	1	3	
5	150	1,5	3	
6	150	2	3	
7	150	4	3	
8	150	6	3	
9	150	8	3	
10	0	0	3	

Для изучения фармакокинетики ВРФ при внутривенном введении использовали 45 мышей. Внутривенное введение ВРФ осуществляли через хвостовую вену, помещая животных в фиксатор для инъекций. Перед

введением хвост немного прогревали для лучшей визуализации вены.

Схема опыта при внутривенном введении представлена в табл. 19.

Табл. 19. Схема эксперимента по изучению фармакокинетики фуллерена C60 на мышах при внутривенном введении.

№№	Доза, мкг/мышь	Время выдержки	Количество мышей	Исследуемые органы
1	10	0	3	Печень Почки Легкие Мозг Селезенка Кожа Сыворотка крови
2	10	2мин	3	
3	10	5мин	3	
4	10	15мин	3	
5	10	30мин	3	
6	10	1ч	3	
7	10	1,5ч	3	
8	10	2ч	3	
9	10	4ч	3	
10	10	6ч	3	
11	10	8ч	3	
12	10	24ч	3	
13	10	32ч	3	
14	10	48ч	3	
15	0	0	3	

Через указанные в таблицах промежутки времени мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации под легким эфирным наркозом и подвергали патологоанатомическому вскрытию, с последующим извлечением указанных органов и тканей в асептических условиях. Исследуемым материалом являлись печень, почки, легкие, мозг, селезенка, кожа и сыворотка крови. Органы взвешивали, гомогенизировали в 2мл PBS и хранили при -70°C. Печень, почки, селезенку, мозг, легкие и кожу перфузировали на холоду стерильным 0,154 М KCl на 0,05 М Трис-HCl буфере pH 7,4. Далее, образцы тканей гомогенизировали для последующей экстракции фуллерена C60. После коагуляции крови сыворотку отделяли центрифугированием при 3000 g. В сыворотке определяли концентрацию фуллерена. Контролями для калибровки являлись: исходный раствор фуллерена C60 (10 мкг/мл) и PBS.

2.13.4. Анализ кинетики выведения фуллерена C60 из организма

Для оценки выведения фуллерена C60 из организма была проанализирована динамика изменения его количества в моче и кале. Схема эксперимента представлена в табл. 20.

Табл. 20. Схема эксперимента по изучению кинетики выведения фуллерена C60 из организма.

№№	Путь введения	Доза, мкг/мышь	Время выдержки, ч	Количество мышей	Исследуемый материал
1	в/в	10	8	2	Моча, кал
2		10	24	2	
3		10	36	2	
4		10	48	2	
5		10	72	2	
7		0	24	2	

В указанном эксперименте участвовало 10 мышей линии BALB/c (массой 20 ± 2 г). Внутривенное введение ВРФ (10мкг/мышь) осуществляли через хвостовую вену, помещая животных в фиксатор для инъекций. Перед введением хвост немного прогревали для лучшей визуализации вены. Для сбора материала (моча, кал) использовали метаболические клетки. Контролями для калибровки являлись: исходный раствор фуллерена C60 (10 мкг/мл) и PBS.

2.13.5. Статистический анализ

Для статистической обработки результатов применяли программу Statistica 8.0. При статистической обработке экспериментальных данных рассчитывали следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение (Mean), среднее геометрическое значение (GMean), стандартное отклонение среднего результата (SD), коэффициент вариации (CV), медиана (Median). Отклонения, представленные на графике, соответствуют значениям стандартной ошибки ($\text{Mean} \pm \text{SE}$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение водного раствора фуллерена C₆₀

При разработке способа получения ВРФ водные растворы фуллерена C₆₀ получали простым смешиванием раствора C₆₀ в N-метилпирролидоне (МП) с деионизованной водой или с водным раствором низкомолекулярного природного вещества (L-аминокислоты, моносахариды, пептиды, глицерин) или 0,01% раствор Pluronic F-127 в качестве стабилизирующих агентов (СА), с последующим исчерпывающим диализом против дистиллированной воды со стабилизатором. В процессе диализа все низкомолекулярные вещества удалялись через поры, а кластеры фуллерена оставались в растворе. Эффективность трансформации C₆₀ из кристаллического состояния в раствор приближалась к количественной, при этом можно получать растворы с концентрацией C₆₀ до 1000 мг/л, растворы стабильны по крайней мере 10–12 мес. Формирование нерастворимых агрегатов наблюдалось, если в качестве СА использовали основные и кислые органические соединения. УФ-ВИД-спектры растворов имеют профиль, характерный для nC₆₀, полученных другими известными способами (максимумы: 220, 265, 340 и 450 нм). Масс-спектры водных растворов и ИК-фурье-спектры высушенных образцов nC₆₀ указывали на возможное частичное гидроксирование фуллерена. Измерение размеров и ζ -потенциала частиц в растворах методом динамического светорассеяния давало средний их диаметр около 100-200 нм и заряд –30 мВ, между тем как электронная микроскопия демонстрировала, что частицы имеют характерный размер около 20 нм и содержат как кристаллическую, так и аморфную фазу [Андреев и др., 2014]. Элементный анализ вакуумно-высушенного образца ВРФ показал наличие: С 78,62%, Н 1,11%, N 2,28%. Предлагаемый метод перспективен для получения растворов эндофуллеренов и, вероятно, высших фуллеренов

[Andreev et al., 2015; Патент RU 2548971, 2015]. В рамках оптимизации технологии получения водного коллоидного раствора фуллерена, C60 была произведена замена стадии диализа на ультрафильтрацию, что позволило стандартизовать процесс получения конечной водной дисперсии фуллерена C60, а также сделать его масштабируемым [Патент RU 2679257, 2019].

3.2. Изучение противоаллергической активности водного раствора фуллерена C60

3.2.1. Оценка противоаллергической активности ВРФ на модели атопического дерматита

3.2.1.1. Изменение уровня антител в сыворотке крови

Данные литературы показывают, что значительную роль в патогенезе АД играют IgE-антитела, они связываются с рецептором FcεRI на тучных клетках, способствуя их дегрануляции и высвобождению медиаторов воспаления. Поэтому в ходе эксперимента были изучены уровни специфических IgE-антител в крови методом ИФА (Рис. 27).

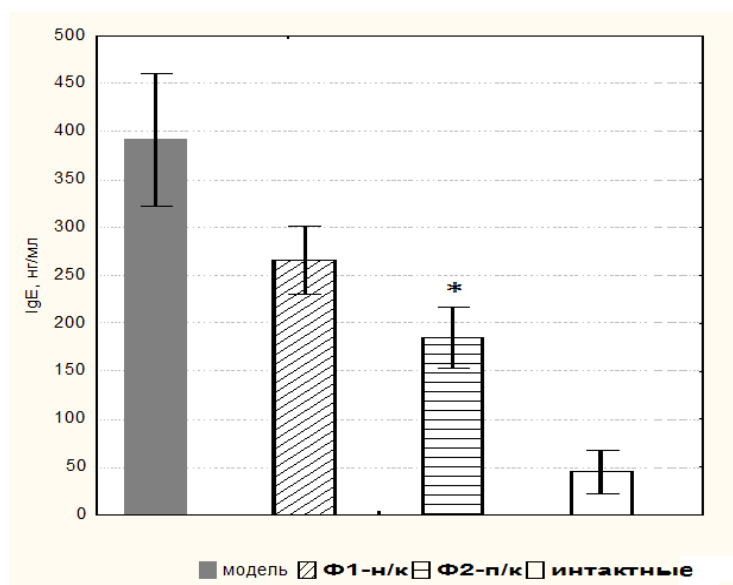


Рис. 27. Изменения концентрации антител к IgE в сыворотке крови.

*-достоверно отличается от группы «модель».

Все группы достоверно отличаются от группы «интактные».

Установлено, что у мышей, получавших раствор фуллерена C60 («Ф1-н/к» и «Ф2-п/к»), уровень IgE антител был ниже, чем у животных с экспериментальным АД («модель»), и достоверно отличался от контрольной группы, где моделирования АД не происходило («интактные»). Следует отметить, что при подкожном введении фуллерена IgE-ответ был выражен слабее, чем при накожном введении.

Помимо IgE ответа было изучено изменение уровня IgG1 антител (Рис. 28), которые являются маркерами аллергического ответа.

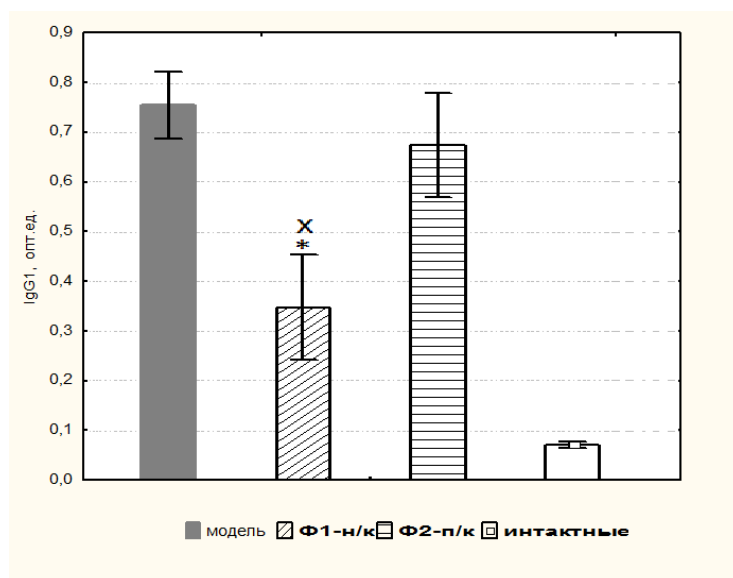


Рис. 28. Изменение концентрации IgG1-антител.

* - достоверно отличается от группы «модель»

x - достоверно отличается от группы «Ф2-п/к»

Все группы достоверно отличаются от группы «интактные»

При определении количества IgG1 антител было установлено, что у мышей, получавших фуллерен C60 подкожно, уровень указанных антител несколько снижался по сравнению с модельной группой. При накожном же введении концентрация специфических антител IgG1 достоверно снижалась, как относительно модельной группы, так и по сравнению с группой «Ф2-п/к».

Далее был проанализирован уровень специфических IgG2a антител (Рис. 29).

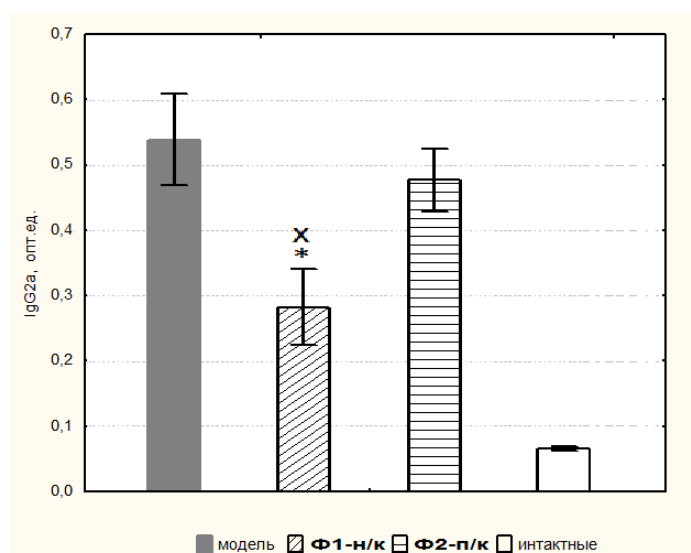


Рис. 29. Изменение концентрации IgG2a-антител.

* - достоверно отличается от группы «модель»

x - достоверно отличается от группы «Ф2-п/к»

Все группы достоверно отличаются от группы «интактные»

Было показано, что при накожном введении раствора фуллерена уровень IgG2a антител достоверно снижался относительно модельной группы и группы с подкожным введением фуллерена, которая, в свою очередь не показывала явного влияния на антительный ответ. Сдвиг иммунного ответа в ту или иную сторону обычно определяют по, так называемому, индексу IgG1/IgG2a. Чем ниже этот показатель, тем сдвиг иммунного ответа значительнее в сторону Th1 (Рис. 30).

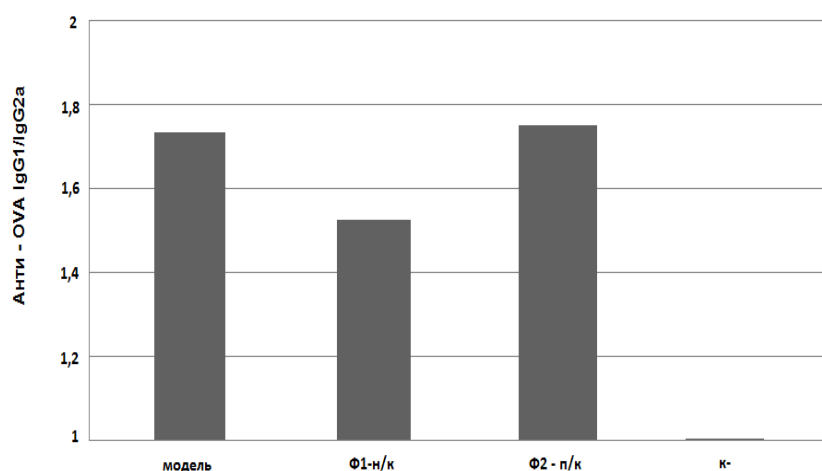


Рис. 30. Соотношение IgG1/IgG2a.

На графике видно, что индекс IgG/IgG2a в группе «Ф2-п/к» находится примерно на одном уровне с группой «модель», что говорит об отсутствии сдвига антительного иммунного ответа. Что касается группы мышей, которые получали фуллерен подкожно, то очевидно снижение индекса IgG1/IgG2 относительно модельных животных, что может говорить о некоторой супрессии аллергического ответа.

Таким образом, при подкожном введении фуллерена наблюдалось значительное понижение уровня IgE при неизменном уровне, относительно модельной группы, IgG1 и IgG2a антител. При подкожном введении наблюдалось не только снижение IgE антител, но и понижение индекса IgG1/IgG2a, что может свидетельствовать о супрессии аллергического антительного ответа при введении фуллерена С60.

3.2.1.2. *Уровень IL-4, IL-5 и IL-12 в супернатантах стимулированных спленоцитов*

Известно, что значительную роль в патогенезе АД играет IL4, который активирует синтез IgE-антител, способствуя инфильтрации провоспалительных клеток, в частности эозинофилов в кожную ткань. Мы исследовали изменение концентрации IL4 в супернатантах ОА-стимулированных спленоцитов методом ИФА (Рис. 31.)

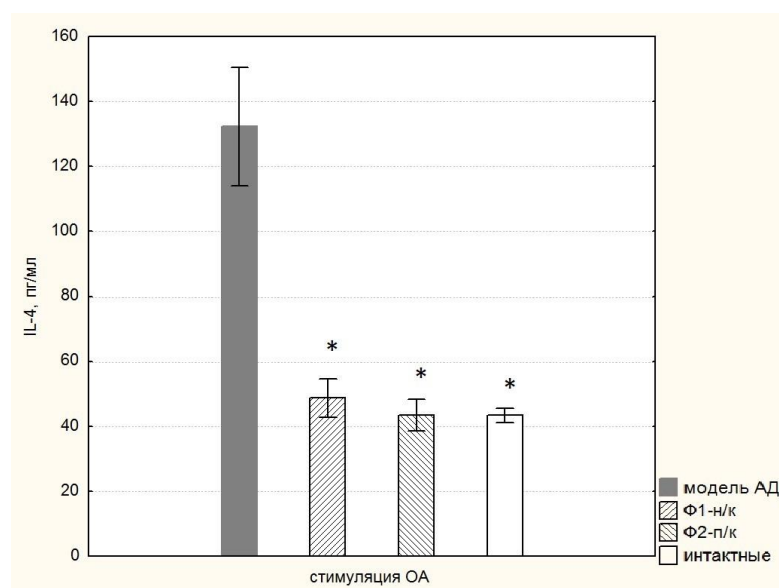


Рис. 31. Изменение концентрации IL-4.

*- достоверно отличается от группы «модель АД»

По результатам иммуноферментного анализа в обеих исследуемых группах, получавших фуллерен, наблюдалась супрессия продукции IL-4 почти до уровня интактной группы, что говорит о противоаллергическом действии фуллерена у мышей как при накожном, так и при подкожном введениях.

Как известно из литературы, при atopическом дерматите повышается продукция IL-5, что приводит к инфильтрации пораженных участков кожного покрова эозинофилами. В данной работе было показано, что в ответ на введение раствора фуллерена происходит значительная супрессия выработки IL-5 (Рис. 32).

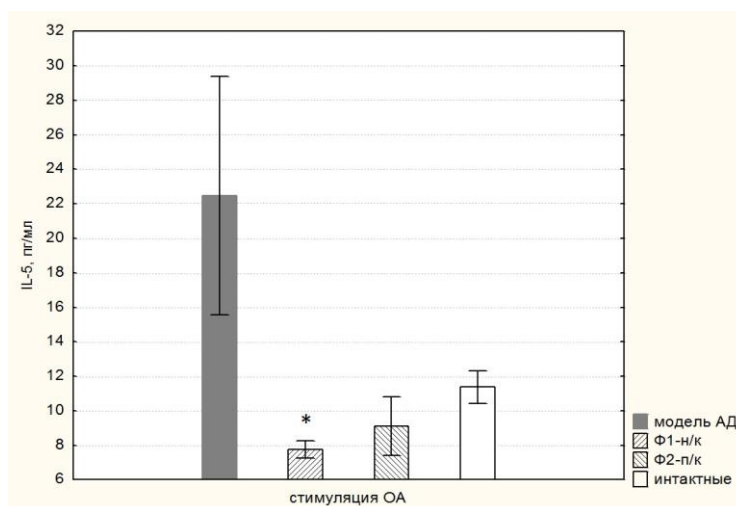


Рис. 32. Изменение концентрации IL-5.

*- достоверно отличается от группы «модель АД»

Следует отметить, что при накожном введении снижение IL 5 было наиболее ярко выражено.

В качестве маркера Th1-иммунного ответа было изучено изменение уровня продукции IL-12 (Рис. 33).

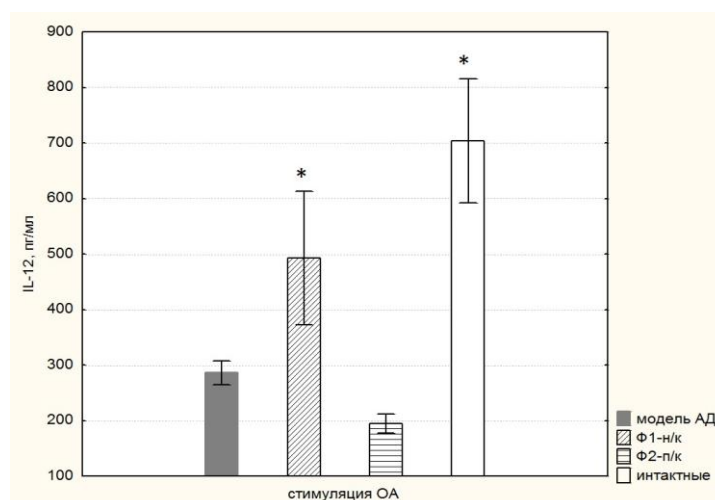


Рис. 33. Изменение концентрации IL-12.

*- достоверно отличается от группы «модель АД»

На рисунке видно, что концентрация IL-12 при моделировании АД значительно ниже по сравнению с группой «интактные», что показывает проявление аллергического ответа. У животных, получавших раствор фуллерена подкожно, уровень IL-12 был заметно выше как относительно группы «модель», так и относительно группы, получавшей фуллерен подкожно.

Еще одним из важнейших маркеров Th1-иммунного ответа является IFN γ , выработка которого индуцируется, в том числе IL-12. Было показано, что уровень экспрессии IFN γ повышался только при подкожном введении раствора фуллерена (Рис. 34).

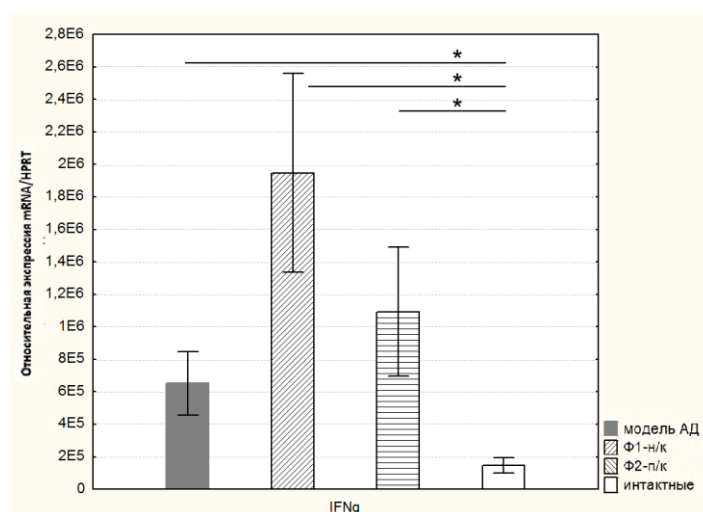


Рис. 34. Изменение экспрессии IFN γ .

*-достоверное различие ($p < 0,05$).

Однако следует отметить, что при подкожном введении фуллерена C60 тоже наблюдалась тенденция к увеличению указанного цитокина.

Таким образом, при накожном введении раствора фуллерена происходит существенная супрессия выработки Th2-цитокинов, в частности IL-4 и IL-5 и индукция выработки таких Th1-цитокинов, как IL-12 и IFN γ . Эти показатели говорят о подавлении аллергического воспаления при введении раствора фуллерена непосредственно на кожу. При подкожном введении показано только эффективное ингибирование выработки IL-4.

3.2.1.3. Уровень экспрессии генов *Foxp3* и *FLG*.

Содержание и функциональная активность Т-регуляторных клеток является важным показателем состояния иммунной системы организма. Нормальное функционирование Т-регуляторных клеток необходимо для предотвращения развития аутоиммунных и аллергических заболеваний. Эти клетки экспрессируют *Foxp3* - транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа. Для определения функциональной активности Т-регуляторных клеток мы определяли уровень экспрессии *Foxp3* методом ПЦР (Рис. 35).

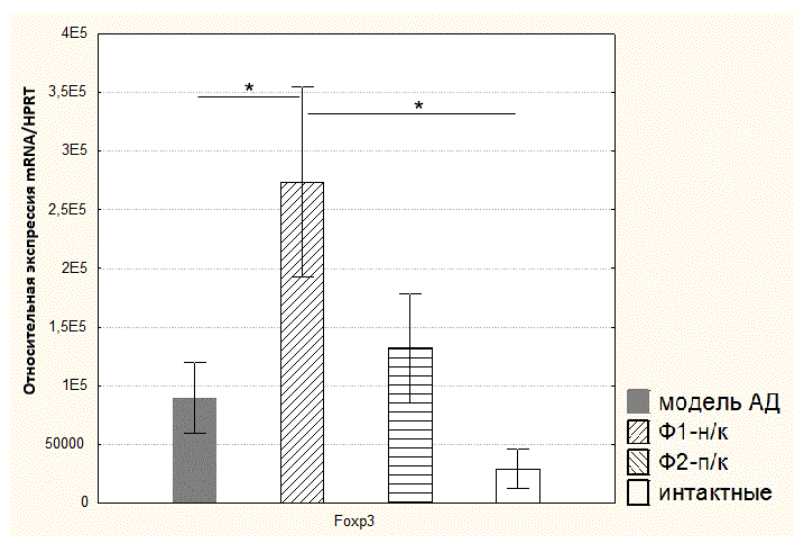


Рис.35. Изменение экспрессии *Foxp3*.

*-достоверное отличие. ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о повышении уровня экспрессии Foxp3 в группах, получавших фуллерен C60, однако достоверное увеличение было показано только для группы «Ф1-н/к». Таким образом, активное функционирование Т-регуляторных клеток наблюдалось только при накожном введении фуллерена.

Развитие аллергической реакции может быть обусловлено, как известно, генетическими отклонениями. Так, например, одним из важнейших белков, участвующих в дифференциации клеток кожи, является филаггрин. Поскольку филаггрин является центральным компонентом эпидермального барьера, отсутствие этого белка, вероятно, открывает путь различным антигенам из окружающей среды через кожу к иммунной системе, в результате чего, развивается иммунная реакция, характерная для АД. Известно, что мутации в гене, кодирующем филаггрин, вызывают явную склонность к развитию АД, которая может передаваться по наследству. В настоящей работе нам интересно было изучить, влияет ли введение фуллерена на экспрессию филаггрина и если да, то каким образом. Уровень экспрессии гена филаггрина – FLG мы определяли при помощи ПЦР (Рис. 36).

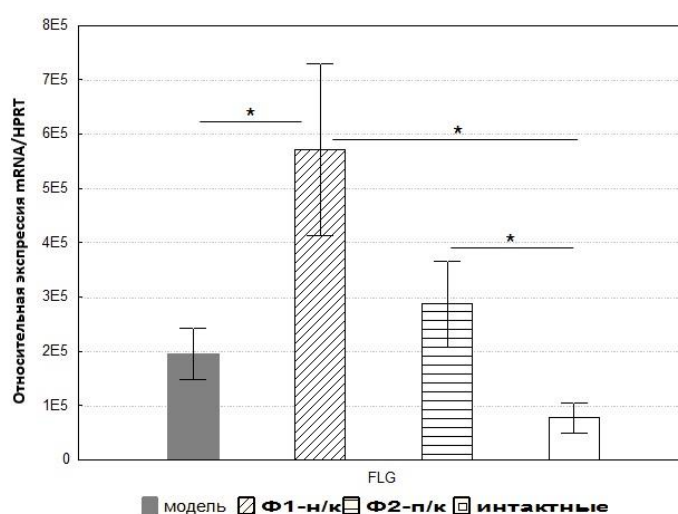


Рис. 36. Изменение экспрессии FLG.

*-достоверное различие ($p < 0,05$).

Было показано, что при накожном введении раствора фуллерен экспрессия филаггрина достоверно увеличивалась как по отношению к группе «интактные», так и по сравнению с модельными животными. В группе «модель» наблюдалось некоторое повышение экспрессии FLG относительно интактных мышей, что, по-видимому, может говорить о запуске процесса укрепления кожного барьера. Таким образом, можно предположить, что раствор фуллерена C60 обладает способностью стимулировать укрепление защитной функции кожного покрова за счет повышения экспрессии необходимых белков, в том числе филаггрина.

3.2.1.4. *Гистологический анализ кожи*

В настоящем исследовании было важно изучить способность раствора фуллерена C60 влиять на гистологическую картину пораженных участков кожного покрова. Результаты проведенного исследования отображены на рис. 37.

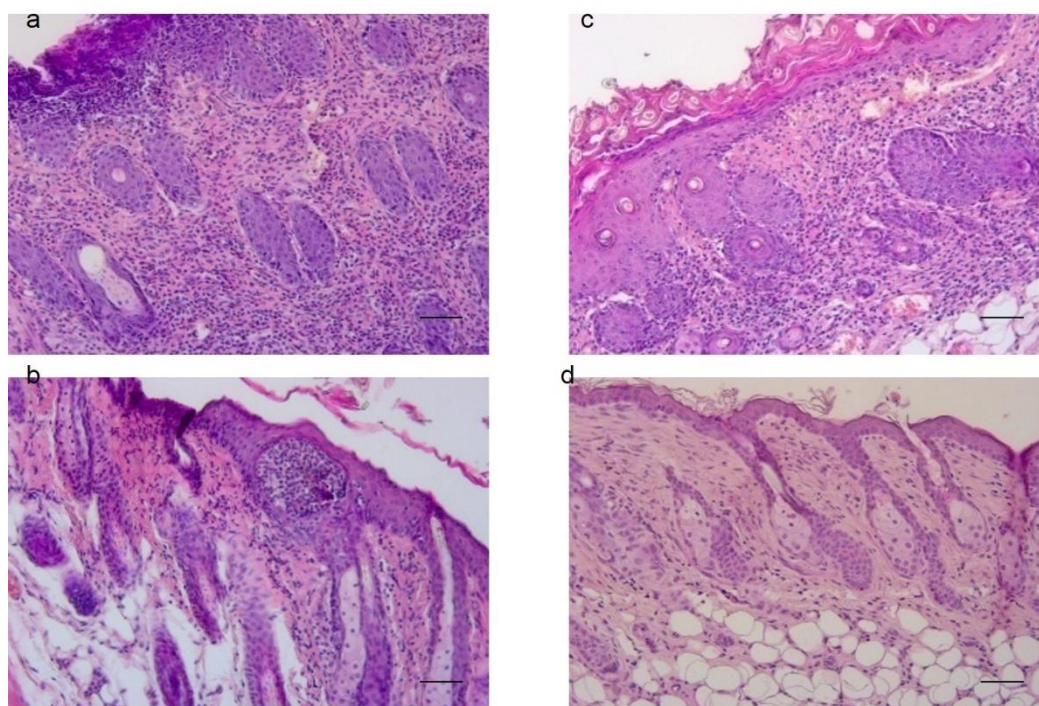


Рис. 37. Гистологический анализ кожи.

Окраска гематоксилин-эозином (увеличение 100х). а – модель, b – C60 н/к, c – C60 п/к, d – интактные.

Видно, что воспалительная клеточная реакция в коже мышей, которая появлялась в результате сенсибилизации овальбумином (группа «модель»), уменьшалась в группах, получавших фуллерен (“С60 н/к” и “С60 п/к”).

Главным аспектом, отражающим специфический компонент воспалительной клеточной реакции, является инфильтрация эозинофилами дермы кожи, уменьшение выраженности которой наблюдалось в группе мышей «С60 н/к». Следует отметить, что степень эозинофильной инфильтрации обычно коррелирует с выработкой IL-5, что и продемонстрировано в настоящем исследовании.

Для более наглядного представления результатов гистологического анализа нами был произведен подсчет степени патоморфологических изменений кожи согласно таблицам 2 и 3. Путем суммирования изменений по каждому показателю, а затем усреднения в рамках группы был построен график, приведенный на рис. 38.

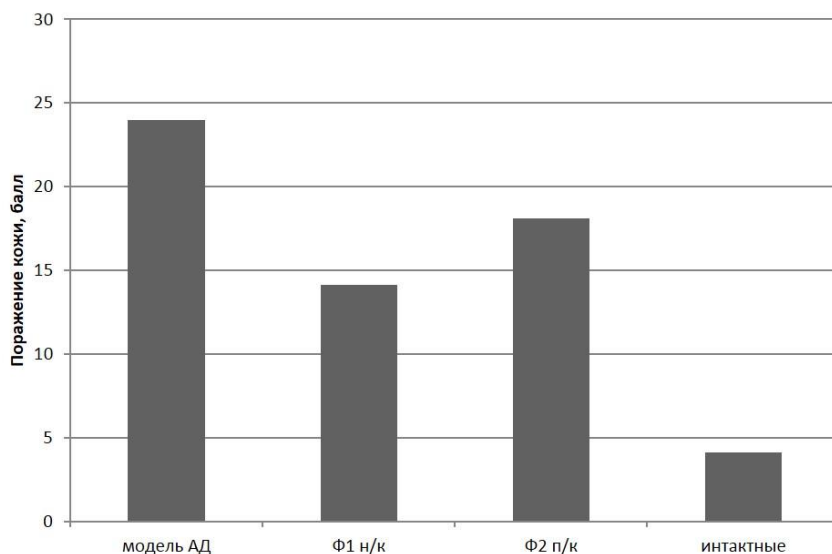


Рис. 38. Оценка гистологического анализа поражения кожи.

На графике показано, что степень проявления патоморфологических изменений кожного покрова в группе мышей, получавших фуллерен накожно, примерно на 40% меньше по сравнению с модельными животными. При подкожном введении процент улучшения гистологической картины составлял примерно 25%.

Таким образом, в результате патоморфологического анализа пораженных участков кожного покрова мышей можно сделать заключение о том, что терапевтический эффект от применения С60 в условиях развития атопического дерматита достигается, как при подкожном введении, так и при накожном нанесении фуллерена, однако, при накожном нанесении С60 эффект выражен максимально.

В результате проведенной работы мы выяснили прежде всего то, что фуллерен способен оказывать терапевтический эффект при атопическом дерматите. Следует отметить, что по иммунологическим и гистологическим показателям наиболее эффективным способом введения фуллерена является накожный. В результате проведения аппликаций не только снижается продукция Th2-цитокинов, но и существенно уменьшается количество патоморфологических изменений кожи. Кроме того, важным результатом работы явилось то, что нам удалось показать увеличение экспрессии гена, кодирующего белок филаггрин.

На основе проведенных в работе исследований можно сделать вывод о том, что фуллерен, по-видимому, обладает противоаллергенной активностью, а также способен укреплять барьерную функцию кожного покрова. Таким образом, можно предположить, что раствор фуллерена С60, являясь не токсичным, может представлять собой перспективный препарат для терапии АД.

3.2.2. Оценка противоаллергической активности ВРФ на модели пищевой аллергии

3.2.2.1. Мониторинг изменения формы каловых масс и веса

При моделировании экспериментальной ПА, а именно после завершения всех этапов челленджа, диарея была выявлена у 100% мышей группы «Модель ПА», у 90% мышей получавших фуллерен С60 один раз в неделю, у 60% мышей с двумя введениями фуллерена С60 в неделю, а у

мышей с ежедневным приемом данного вещества диарея полностью отсутствовала.

Оценка степени проявления диареи производилась после каждого этапа челленджа через 20-30 минут и выражалась в баллах. Так, 0 баллов соответствовал твердый стул, 1 балл присваивался животным с влажным несформированным стулом, 2 – с жидким стулом и 3 – с водянистым стулом. Средний по группам балл проявления реакции на введение аллергена представлен в табл. 21.

Табл. 21. Анализ формы каловых масс в процессе проведения челленджа. Результаты анализа представлены в баллах.

Экспериментальные группы: «Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 один раз в неделю; «2-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 два раза в неделю; «С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные.

Группа/день челл.	1	2	3	4	5	6	7
Модель ПА	1	1	2	2	2	2	2
1-С60	1	1	2	1	1	1	1
2-С60	1	1	1	1	1	1	1
С60	1	1	1	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0
Интактные	0	0	0	0	0	0	0

Для визуализации эффективности терапии фуллереном C60 степень изменения стула представлена в виде графика (Рис. 39).

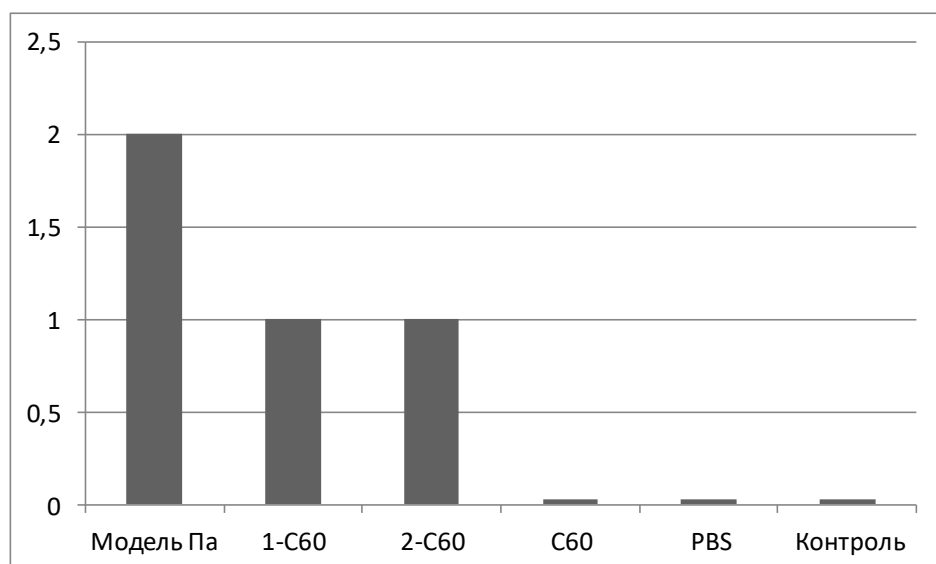


Рис. 39. Степень проявления аллергической диареи в последний день челленджирования.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 один раз в неделю; «2-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 два раза в неделю; «C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные.

Показано, что у животных, на которых воспроизводилась модель ПА, был ярко выраженный жидкий стул с отхождением стекловидной слизи, в которой содержалось множество эозинофилов. У животных, получавших раствор фуллерена C60, визуально было замечено уменьшение диареи, причем при увеличении дозы C60 эффект усиливался. Так, в группе «1-C60», которая получала C60 только один раз в неделю, наблюдался слабый терапевтический эффект. Группа «2-C60» получала раствор фуллерена два раза в неделю, в результате чего эффект проявлялся несколько сильнее, чем в группе «1-C60». В группе же «C60» уже на второй день челленджирования OVA наблюдалось уменьшение степени проявления диареи, а к последнему дню введения аллергена стул уже полностью

нормализовывался. Таким образом, к концу эксперимента мыши группы «С60», получавшие раствор фуллерена каждый день, не имели каких-либо признаков аллергической диареи. В группах отрицательного контроля эксперимента («PBS», «интактные») признаков аллергической диареи также отмечено не было.

В группах с проявлением диареи также наблюдалась незначительная потеря массы тела. Самый высокий показатель потери веса был отмечен в группе «модель ПА», что связано с высокой степенью проявления аллергической диареи. Так, разница в весе мышей до и после челленджирования в указанной группе составляла 0,94% (Рис. 40). Потеря веса у группы «1-С60» составляла 0,75%, у группы «2-С60» - 0,93%, а в группе «С60» был зафиксирован прирост веса на 0,5%, что связано, по-видимому, с наименьшей степенью проявления диареи по сравнению с описанными выше группами. В группах отрицательного контроля «PBS» и «интактные» также наблюдался прирост веса на 1,8% и 5,3%, соответственно.

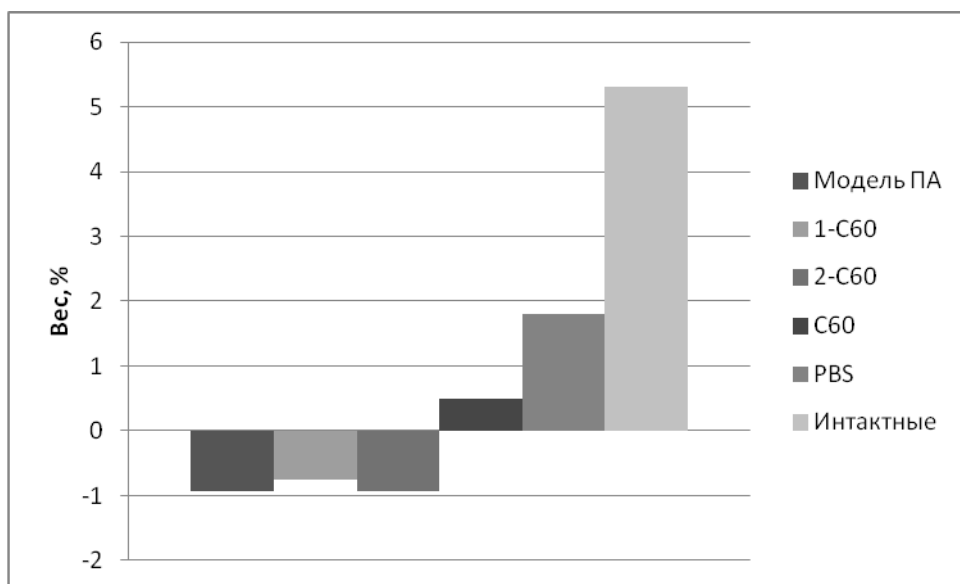


Рис. 40. Изменение веса при введении фуллерена С60.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 один раз в неделю; «2-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 два раза в неделю; «С60» – сенсibilизация OVA

при введении фуллерена C60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные.

Таким образом, ориентируясь на полученные данные, можно предположить, что фуллерен C60 способен оказывать противоаллергическое действие. Была выявлена зависимость терапевтического эффекта раствора фуллерена C60 от кратности его введения. Так, у мышей, получавших фуллерен C60 1 раз в неделю, проявления симптомов ПА было выражено гораздо сильнее по сравнению с животными, получавшими фуллерен C60 ежедневно.

3.2.2.2. *Изменение уровня специфических IgE в сыворотке крови при моделировании ПА в присутствии ВРФ*

Различные исследования пищевой аллергии показывают, что важнейшую роль в патогенезе пищевой аллергии играют IgE-антитела, они связываются с рецептором FcεRI на тучных клетках, способствуя их дегрануляции и высвобождению медиаторов воспаления. В ходе эксперимента были проведен анализ уровня специфических IgE-антител в крови методом ИФА (Рис. 41).

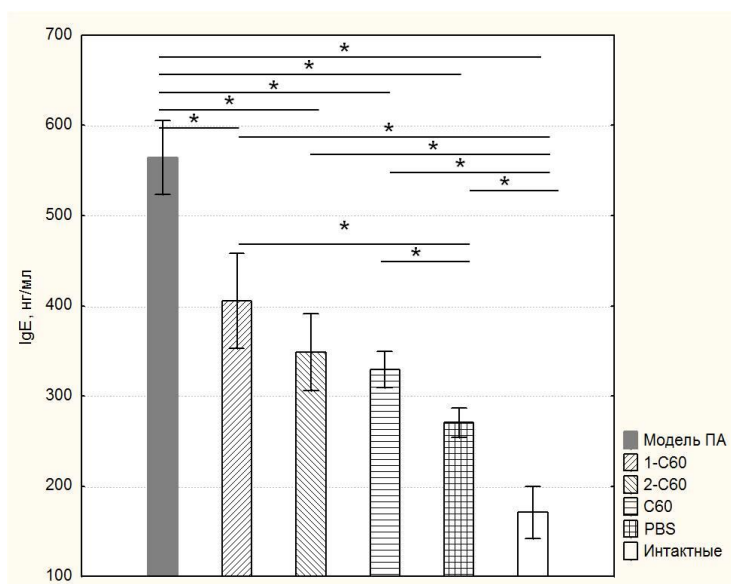


Рис. 41. Изменения концентрации специфических IgE антител к OVA в сыворотке крови.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 один раз в неделю; «2-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 два раза в неделю; «C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

Было выявлено, что у мышей, получавших раствор фуллерена C60, уровень IgE антител был достоверно ниже, чем у животных в группе с экспериментальной пищевой аллергией. Следует отметить, что при введении фуллерена C60 два раза в неделю и ежедневно уровень специфических IgE был ниже, чем при введении данного раствора один раз в неделю.

Таким образом, при введении раствора фуллерена C60 наблюдалось значительное понижение уровня IgE. Кроме того, была показана обратно пропорциональная зависимость между кратностью введения фуллерена C60 и уровнем выработки IgE.

Полученные данные могут свидетельствовать о способности фуллерена C60 влиять на характер антительного ответа, уменьшая содержание специфических IgE в крови.

3.2.2.3. *Изменение уровня патогенетически значимых цитокинов при моделировании ПА в присутствии ВРФ*

В развитии пищевой аллергии важную роль играет IL4, который отвечает за активацию синтеза IgE-антител, тем самым способствуя инфильтрации провоспалительных клеток, таких как эозинофилов и тучных клеток. Методом ИФА был проанализирован уровень IL4 в супернатантах стимулированных овальбумином спленоцитов, полученных от мышей с экспериментальной ПА (Рис. 42)

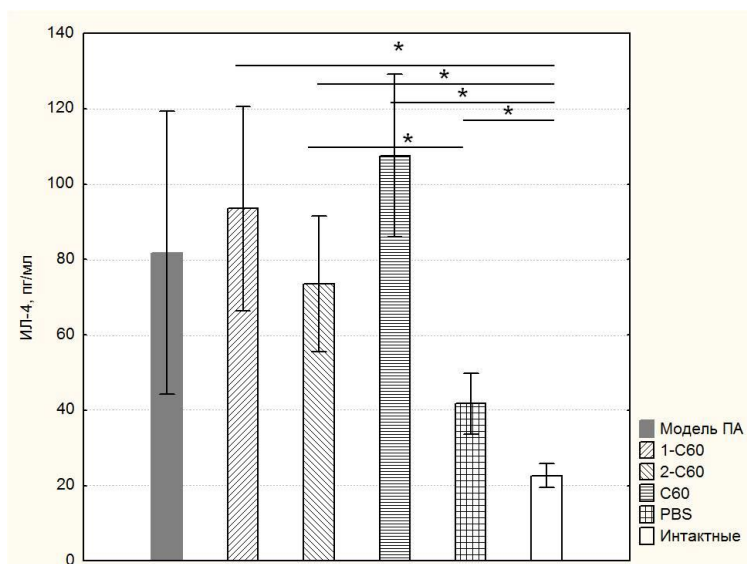


Рис. 42. Изменение концентрации IL-4 в супернатантах стимулированных спленоцитов.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 один раз в неделю; «2-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 два раза в неделю; «С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

Видно, что достоверной разницы по уровню IL-4 между модельной и экспериментальными группами не наблюдалось. Однако, относительно группы «интактные» уровень данного цитокина был повышен, что говорит о наличии аллергического воспаления. Также следует отметить, что у животных, получавших фуллерен С60 2 раза в неделю (группа «2-С60») уровень IL-4 был несколько снижен относительно группы «Модель ПА».

Еще одним маркером аллергических реакций и главным фактором привлечения эозинофилов является IL-5. Данный эксперимент показал, что в ответ на введение раствора фуллерена С60 происходит супрессия выработки IL-5 (Рис. 43).

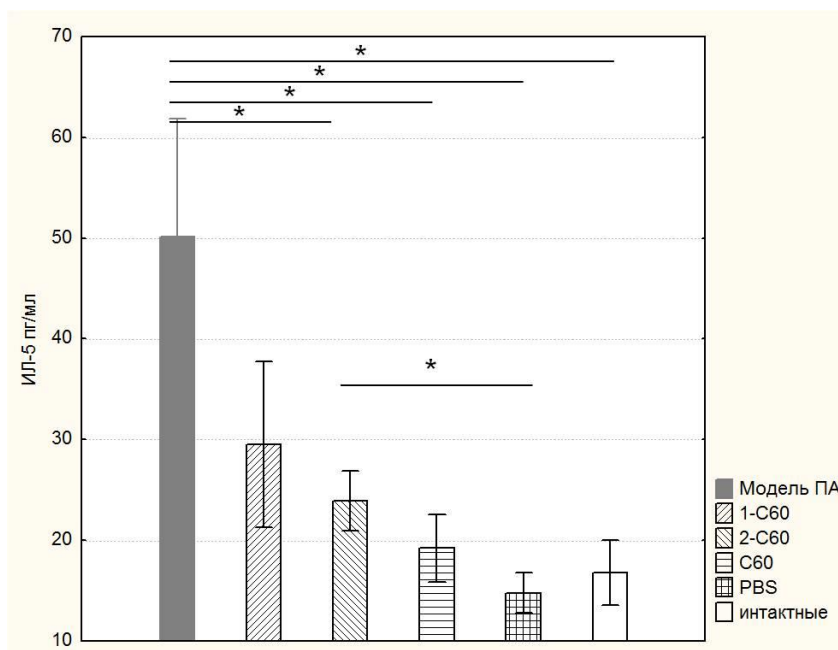


Рис. 43. Изменение концентрации IL-5 в супернатантах стимулированных спленоцитов.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 один раз в неделю; «2-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 два раза в неделю; «C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

Из полученных данных видно, что во всех группах, получавших фуллерен C60, наблюдалось заметное снижение уровня IL-5. Следует отметить, что наиболее выраженный эффект был в группе «C60», где фуллерен C60 вводили ежедневно.

В качестве маркера Th1-иммунного ответа был изучен уровень изменения продукции IL-12 (Рис. 44).

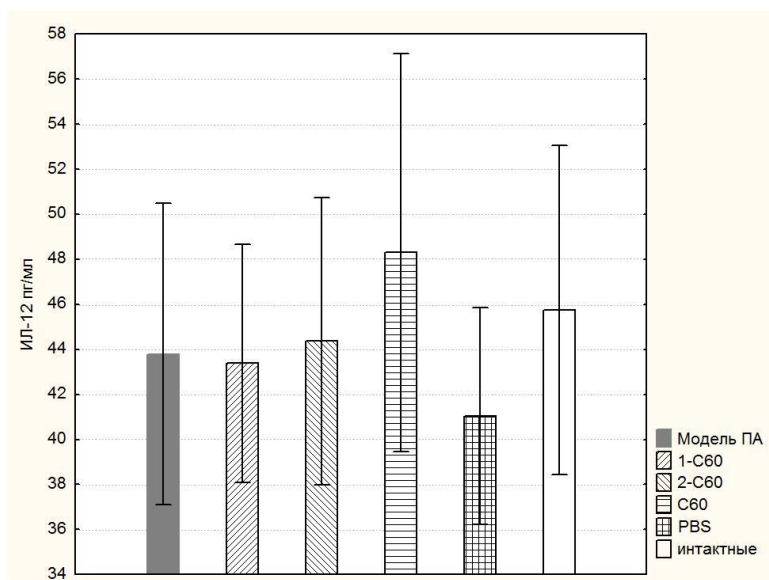


Рис. 44. Изменение концентрации IL-12 в супернатантах стимулированных спленоцитов.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 один раз в неделю; «2-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 два раза в неделю; «С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные.

Было показано, что независимо от введения фуллерена С60 уровень IL-12 значительно не менялся. У животных, получавших раствор фуллерена ежедневно, уровень IL-12 был выше как относительно группы «модель ПА», так и относительно группы, получавшей фуллерен один раз в неделю и дважды. Однако следует отметить, что достоверной разницы между группами выявлено не было.

Еще одним важным маркером Th1-иммунного ответа является IFN γ , выработка которого индуцируется, в том числе и IL-12 (Рис. 45).

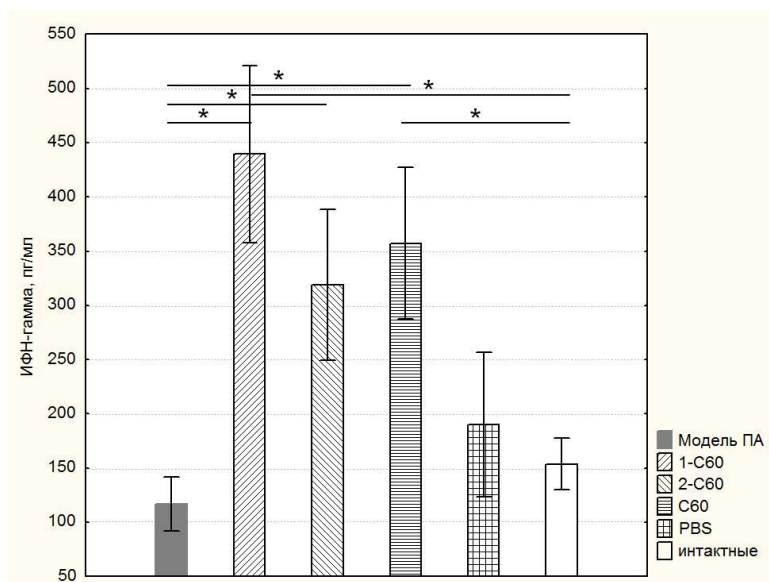


Рис. 45. Изменение концентрации IFN γ в супернатантах стимулированных спленоцитов.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 один раз в неделю; «2-С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 два раза в неделю; «С60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена С60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

На графике видно, что уровень экспрессии IFN γ повышался во всех группах получавших раствор фуллерена С60. Следует отметить, что во второй и четвертой группах при введении фуллерена С60 один раз в неделю и ежедневно, соответственно, наблюдалась явная тенденция к увеличению данного цитокина, что говорит о дифференцировке Th1 из Th0. Было выявлено, что все группы, получавшие С60, имеют достоверную разницу по уровню данного цитокина с группой «модель ПА».

3.2.2.4. Патоморфологический анализ кишечника

В проведенной работе был проведен сравнительный патоморфологический анализ кишечника мышей всех экспериментальных групп. Результаты проведенного исследования отображены на фотографиях (Рис. 46).

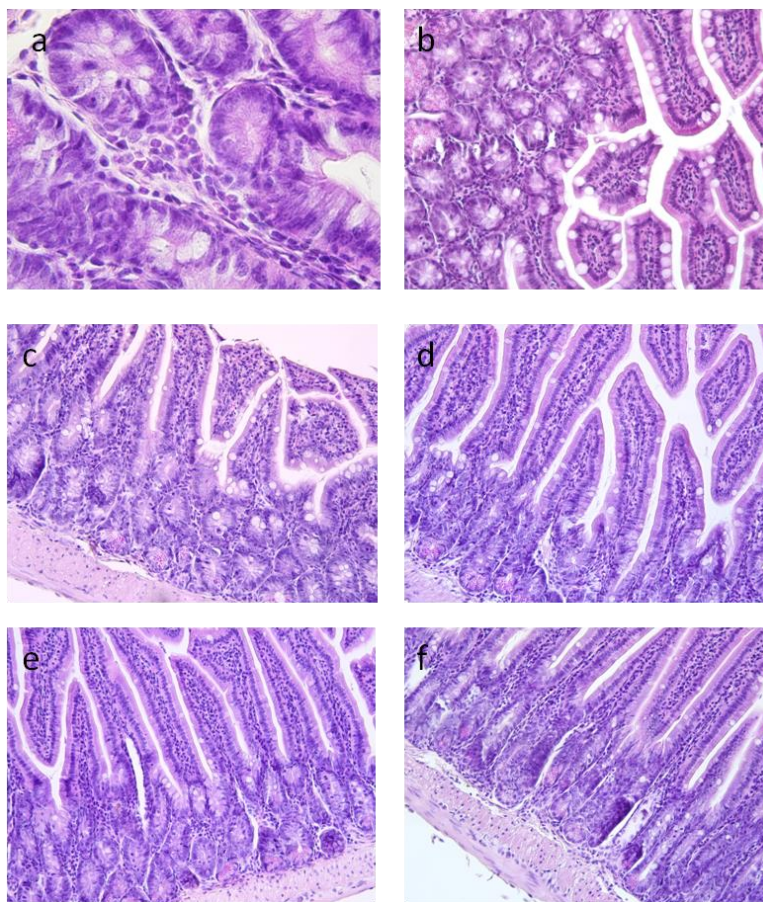


Рис. 46. Гистологический анализ тощей кишки тонкого отдела кишечника. Окраска гематоксилин-эозином (увеличение 200х). а – модель ПА, b – 1-C60, c – 2-C60, d – C60, e – контроль PBS, f – интактная.

Модель ПА - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, челленджирование OVA); «1-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 один раз в неделю; «2-C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 два раза в неделю; «C60» – сенсibilизация OVA при введении фуллерена C60 ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, челленджирование PBS; «интактные» – не сенсibilизированные животные.

Микроскопическая картина кишечника мышей группы «Модель ПА».

Кишечник состоит из трёх слоёв. Эпителиальный слой представлен слизистой оболочкой, выстланной однослойным цилиндрическим и кубическим эпителием, среди которого отмечалось умеренное и несколько повышенное количество бокаловидных клеток. Подслизистая основа

представлена рыхлой соединительной тканью, в которой редко мелкоочагово были расположены лимфоцитарные инфильтраты, а также отмечались частые рассыпные скопления эозинофилов. Признаков некроза и дистрофии кишечного эпителия не было обнаружено. Кровоизлияний и отёка в подслизистой основе не обнаружили. Крипты – Либеркюновы железы, структурны, в просвете крипт содержалась слизь и изредка группы палочковидных бактерий. Мышечный слой состоит из двух слоёв гладкомышечных клеток без признаков патологии. Серозный слой был представлен скудным количеством рыхлой соединительной ткани с прилежащими фрагментами жировой ткани сальника.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что у животных группы «Модель ПА» отмечаются умеренные признаки аллергического энтерита – еунита с функциональным увеличением слизиобразования, но без структурно-патологических изменений.

Микроскопическая картина кишечника мышей группы «1-С60».

Эпителиальный слой представлен слизистой оболочкой, выстланной однослойным цилиндрическим и кубическим эпителием, среди которого отмечали умеренное и несколько повышенное количество бокаловидных клеток. В подслизистой основе редко мелкоочагово были расположены лимфоцитарные инфильтраты и отмечались частые рассыпные скопления эозинофилов. Признаков некроза и дистрофии кишечного эпителия не обнаружили. Кровоизлияний и отёка в подслизистой основе также не обнаружили. Крипты – Либеркюновы железы, структурны, в просвете крипт содержалась слизь и изредка группы палочковидных бактерий. Мышечный слой без признаков патологии. Серозный слой был представлен скудным количеством рыхлой соединительной ткани с прилежащими фрагментами жировой ткани сальника.

У животных группы «1-С60» отмечаются умеренные признаки аллергического энтерита с функциональным увеличением слизиобразования, но без структурно-патологических изменений.

Микроскопическая картина кишечника мышей группы «2-С60».

Эпителиальный слой представлен слизистой оболочкой, среди которой отмечалось переменное, редко несколько повышенное количество бокаловидных клеток. Подслизистая основа представлена рыхлой соединительной тканью, в которой редко мелкоочагово были расположены лимфоцитарные инфильтраты, а также отмечались редкие диффузные скопления эозинофилов. Признаков некроза и дистрофии кишечного эпителия, а также кровоизлияний и отёка в подслизистой основе не было обнаружено. Крипты – Либеркюновы железы, структурны, в просвете крипт содержалась слизь и изредка группы палочковидных бактерий. Мышечный слой без признаков патологии. Серозный слой был представлен скудным количеством рыхлой соединительной ткани с прилежащими фрагментами жировой ткани сальника.

У животных группы «2-С60» отмечаются слабовыраженные признаки аллергического энтерита – еунита с незначительным функциональным увеличением слизиобразования, но без структурно-патологических изменений.

Микроскопическая картина кишечника мышей группы «С60».

В эпителиальном слое обнаружили обычное количество бокаловидных клеток. Подслизистая основа представлена рыхлой соединительной тканью, в которой редко мелкоочагово были расположены лимфоцитарные инфильтраты, а также отмечались лишь единичные эозинофилы. Признаков некроза и дистрофии кишечного эпителия не было обнаружено. Кровоизлияний и отёка в подслизистой основе не обнаружили. Крипты – Либеркюновы железы, структурны, в просвете крипт содержалась слизь и изредка группы палочковидных бактерий. Мышечный слой, состоящий из двух слоёв гладкомышечных клеток, без признаков патологии. Серозный слой был представлен скудным количеством рыхлой соединительной ткани с прилежащими фрагментами жировой ткани сальника.

Исходя из вышесказанного можно сделать вывод, что у животных группы «С60» признаков аллергического энтерита – еунита не наблюдается, отмечается лишь лимфоцитарная инфильтрация в подслизистой основе, носящая, вероятно, реактивный характер. Структурно-патологических и функциональных морфологических изменений в тощей кишке тонкого отдела кишечника не обнаружено.

Микроскопическая картина кишечника мышей группы «PBS».

Эпителиальный слой представлен слизистой оболочкой, выстланной однослойным цилиндрическим и кубическим эпителием, среди которого обнаружили обычное количество бокаловидных клеток. В подслизистой основе наблюдали редкие разбросанные лимфоциты, гистиоциты и плазматические клетки. Признаков некроза и дистрофии кишечного эпителия не было обнаружено. Кровоизлияний и отёка в подслизистой основе также не обнаружили. Крипты – Либеркюновы железы, структурны, в просвете крипт содержалась слизь и изредка группы палочковидных бактерий. Мышечный слой без признаков патологии. Серозный слой был представлен скудным количеством рыхлой соединительной ткани с прилежащими фрагментами жировой ткани сальника.

Исходя из вышеизложенного можно заключить о нормальном строении тощей кишки у животных группы «PBS». Структурно-патологических и функциональных морфологических изменений не обнаружено.

Микроскопическая картина кишечника мышей группы «Интактная».

Эпителиальный слой представлен слизистой оболочкой, выстланной однослойным цилиндрическим и кубическим эпителием, среди которого обнаружили обычное количество бокаловидных клеток. В подслизистой основе наблюдались редкие разбросанные лимфоциты, гистиоциты и плазматические клетки. Признаков некроза и дистрофии кишечного эпителия, а также кровоизлияний и отёка в подслизистой основе не было

обнаружено. Крипты – Либеркюновы железы, структурны, в просвете крипт содержалась слизь и изредка группы палочковидных бактерий. Мышечный слой без признаков патологии. Серозный слой был представлен скудным количеством рыхлой соединительной ткани с прилежащими фрагментами жировой ткани сальника.

У животных группы «Интактная» наблюдалось нормальное строение тощей кишки. Структурно-патологических и функциональных морфологических изменений в тощей кишке тонкого отдела кишечника не обнаружено.

Таким образом, можно сделать вывод о формировании в результате введения OVA у животных групп «Модель ПА» и «1-С60» признаков аллергического энтерита – еюнита, а у животных групп «2-С60» и «С60», получавших раствор фуллерена два раза в неделю и ежедневно, в свою очередь, наблюдалось развитие лечебного патоморфоза и нивелирование признаков аллергического энтерита. У животных контрольных групп «PBS» и «Интактная» отмечалось нормальное строение тощей кишки тонкого отдела кишечника.

Итак, было показано, что при введении фуллерена С60 снижалась продукция IL-5, увеличивалась выработка IFN γ и существенно уменьшалось количество эозинофилов в тощей кишке тонкого отдела кишечника. Таким образом, по итогам проведенной работы можно сделать предположение о том, что фуллерен С60, по-видимому, способен оказывать противоаллергический эффект при моделировании пищевой аллергии. По иммунологическим и гистологическим показателям наибольший эффект был выявлен в группе «С60», животные в которой получали раствор фуллерена С60 ежедневно в процессе сенсibilизации.

3.2.3. Оценка противоаллергической активности ВРФ на модели анафилактического шока

В экспериментах по изучению способности фуллерена C60 подавлять развитие состояния анафилактического шока, было интересно оценить наличие/отсутствие эффекта по сравнению с каким-либо иным антиоксидантом. Было принято решение в качестве препарата сравнения использовать мелатонин, поскольку известно, что мелатонин и фуллерен являются мощными антиоксидантами, что предполагает наличие у данных веществ противовоспалительной активности, в том числе способность снижать аллергическое воспаление.

3.2.3.1. Оценка степени проявления признаков АШ по клиническим показателям

В ходе эксперимента оценку степени проявления признаков анафилактического шока проводили после разрешающего введения. Процент падежа в группе и средний балл по оценке симптомов анафилаксии у мышей представлены в табл. 22.

Табл. 22. Оценка симптомов анафилаксии и процент падежа после разрешающего введения.

Экспериментальные группы: «Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «2C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «20C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «2Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «2Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «20Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «Интakтные» – не сенсibilизированные животные.

	Модель	2C60 4/28	2C60 11/28	20C60 4/28	20C60 11/28	2Mel 4/28	2Mel 11/28	20Mel 4/28	20Mel 11/28	Интakт- ные
Падеж, %	100	87,5	50	50	87,5	75	75	62,5	62,5	0
Баллы	5	4	3	3	3,5	3	3,5	3	3	0

Показано, что в группах, где животные получали фуллерен C60 и мелатонин, процент смертности был заметно ниже относительно группы «Модель». У мышей модельной группы клиническая картина АШ развивалась стремительно: наблюдался тремор, боковое положение и летальный исход в течение 10 минут. В группах, получавших фуллерен C60 и мелатонин основными признаками реакции АШ являлись: обособленность, замедленность в движениях, тяжелая одышка, цианоз и боковое положение. Наименьший процент смертности наблюдался в группах «2C60 11/28» и «20C60 4/28», получавшие фуллерен C60 и составлял 50%. Степень выживаемости среди мышей, получавших мелатонин, имела дозозависимый эффект, однако не менялась в зависимости от времени введения (на раннем или позднем этапах сенсibilизации).

3.2.3.2. *Изменение уровня специфических IgE в сыворотке крови*

Большинство эпизодов анафилаксии запускаются с помощью иммунологического механизма, включающего иммуноглобулин E, который приводит к активации тучных клеток и базофилов с последующим высвобождением медиаторов воспаления, таких как гистамин, фактор активации тромбоцитов, лейкотриены, триптазы и простагландины. В ходе эксперимента был проведен анализ уровня специфических IgE-антител в крови методом ИФА. Для удобства, полученные результаты представлены на двух графиках (Рис. 47, 48). На рис. 47 представлены результаты изменения уровня анти-OVA IgE у мышей, получавших исследуемые образцы на 4 и 11 дни эксперимента (после первого и второго этапов сенсibilизации).

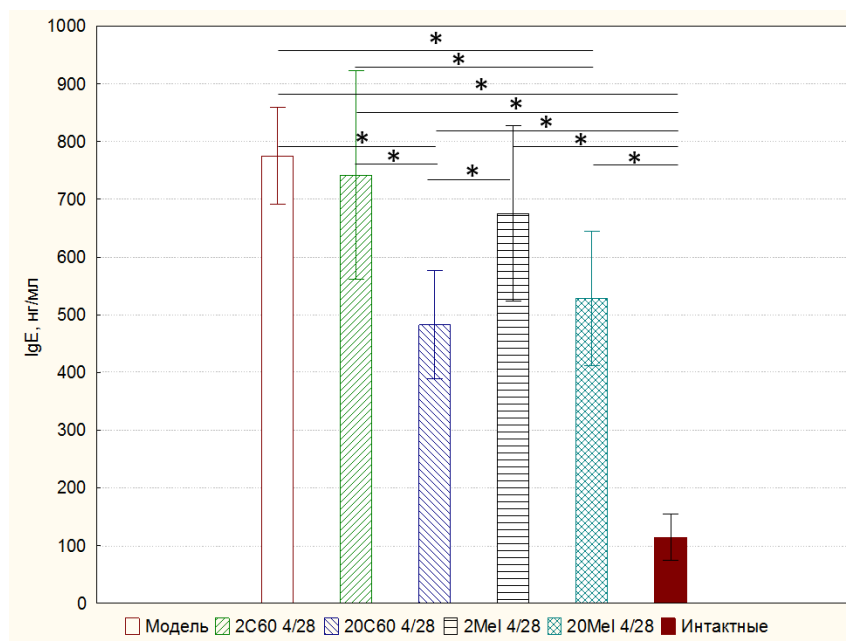


Рис. 47. Изменения концентрации специфических IgE антител в сыворотке крови после первого и второго этапов сенсibilизации.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «2MeI 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20MeI 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «Интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

Было выявлено, что у мышей, получавших раствор фуллерена C60 и мелатонина на 4 день эксперимента, уровень IgE антител был ниже, чем у животных группы «Модель». Следует отметить, что в группах при введении фуллерена C60 и мелатонина в дозе 20 мкг/мышь, уровень специфических IgE был достоверно ниже, чем при введении этих же образцов, но уже в дозе 2 мкг/мышь. Также было показано, что уровень IgE при введении раствора фуллерена C60 20 мкг был ниже, чем при введении раствора мелатонина той же дозы.

Рис. 48 отражает уровни специфического IgE у мышей, получавших исследуемые образцы на 11 и 25 дни эксперимента (после второго этапа сенсibilизации и непосредственно перед разрешающей инъекцией аллергена).

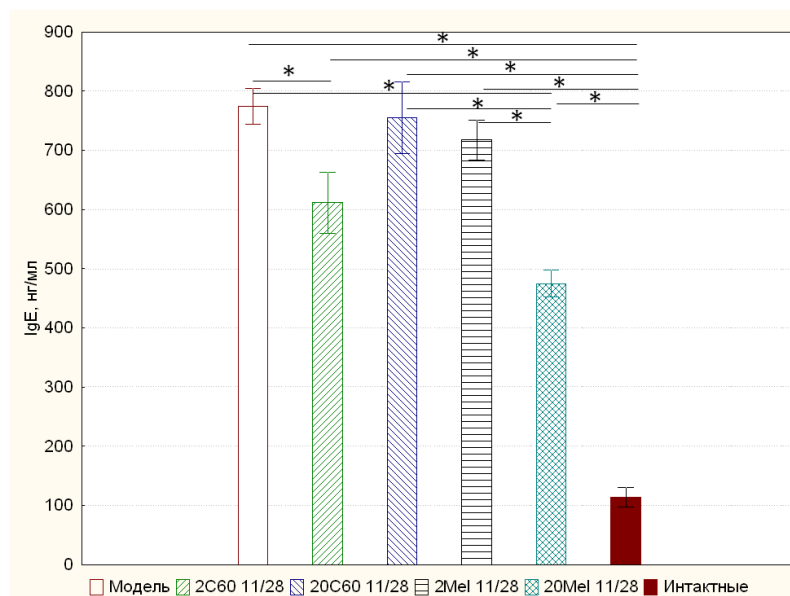


Рис. 48. Изменения концентрации специфических IgE антител в сыворотке крови после второго этапа сенсibilизации и непосредственно перед разрешающей инъекцией аллергена.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «2Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 20 мкг, «Интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$

На графике видно, что в целом у мышей, получавших фуллерен C60 и мелатонин, уровень специфических IgE был снижен относительно группы «Модель». Достоверное снижение данного показателя было показано в группах «2C60 11/28», «20Mel 11/28». При этом при введении мелатонина было отмечено наиболее явное снижение анти-OVA IgE.

Обобщая выше сказанное, можно сказать, что фуллерен C60 и мелатонин способны снижать уровень специфического IgE в крови, что свидетельствует о наличии у данных соединений противоаллергической активности. Наиболее эффективными оказались группы, где мышам вводили фуллерен на раннем этапе сенсibilизации или мелатонин после

второго этапа сенсibilизации. Эффективная доза для обоих веществ составляла 20 мкг/мышь.

3.2.3.3. Анализ корреляции степени анафилактической реакции и уровня специфических IgE *in vivo*

В ходе работы интересным представлялось оценить наличие корреляции уровня специфического IgE с клиническими проявлениями реакции анафилактического шока и процентом смертности животных. Показатели необходимые для анализа приведены в табл. 23.

Табл. 23. Анализ корреляции степени анафилактической реакции и уровня специфических IgE *in vivo*

Экспериментальные группы: «Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «2C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «20C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «2Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «2Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «20Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «Интakтные» – не сенсibilизированные животные.

Группа	Баллы	Падеж, %	Уровень IgE, нг/мл
«Модель»	5	100	774,9
«2C60 4/28»	4	87,5	742,1
«20C60 11/28»	3,5	87,5	754,7
«2Mel 11/28»	3,5	75	717,3
«2Mel 4/28»	3	75	675,4
«2C60 11/28»	3	50	611,6
«20Mel 4/28»	3	62,5	528,7
«20C60 4/28»	3	50	482,6
«20Mel 11/28»	3	62,5	474,9
«Интakтные»	0	0	114,1

Группа «Модель» имела самые высокие показатели проявления анафилактической реакции: степень анафилактического шока оценивалась на 5 баллов, летальный исход был зафиксирован для 100% животных, а уровень IgE являлся максимальным и составлял 774,9 нг/мл. Животные групп «2C60 4/28» и «20C60 11/28» также показали высокие уровни специфического IgE, степень АШ составила для данных групп 4 и 3,5

балла, соответственно. Процент летальности животных при этом составил 87,5%, что имеет прямую корреляционную зависимость как между указанными группами, так и относительно группы «Модель».

Продолжая анализ полученных результатов, следует отметить, что у мышей, получавших мелатонин в дозе 2 мкг/мышь (группа «2Mel 4/28»), был зафиксирован более низкий уровень летальности относительно выше описанных групп и составлял 75%, а степень анафилактической реакции оценивалась на 3 балла. При этом уровень анти-OVA IgE был тоже заметно ниже по сравнению с выше описанными группами и составлял 675,4 нг/мл. В группе «2Mel 11/28» средний балл АШ составил 3,5, процент смертности у животных составил 75%, а уровень специфического IgE - 717,3 нг/мл.

В группах «20C60 4/28» и «20Mel 11/28» были самые низкие показатели уровня IgE, среди животных получавших аллерген. В этих же группах средний балл степени анафилактической реакции составил 3 балла, что характерно для слабой степени проявления анафилактической реакции. Процент смертности в группе «20C60 4/28» составил 50%, что ниже на 12,5% по сравнению с группой «20Mel 11/28». Однако, было замечено, что уровень анти-OVA IgE в группе «20C60 4/28» был немного выше.

Представленные данные свидетельствуют о наличии явной корреляции уровня специфического IgE с клиническими проявлениями реакции анафилактического шока и процентом смертности животных.

Однако, анализируя полученные результаты, нами было замечено, что в группе «2C60 11/28» процент смертности животных составил 50%, также как и в группе «20C60 4/28», а уровень специфического IgE при этом был значительно выше и составлял 611,6 нг/мл. Интересно, что уровень смертности в группе «20Mel 4/28» был на 12,5% выше относительно группы «2C60 11/28» при более низком анти-OVA IgE. Следует отметить, что указанные данные не противоречат выявленной корреляции и их

можно расценивать как некоторое отклонение от «корреляционной кривой».

3.2.3.4. *Изменение уровня патогенетически значимых цитокинов*

Уровень IL-4 был проанализирован в супернатантах стимулированных овалбумином спленоцитов, полученных от мышей с экспериментальным АШ (Рис. 49, 50).

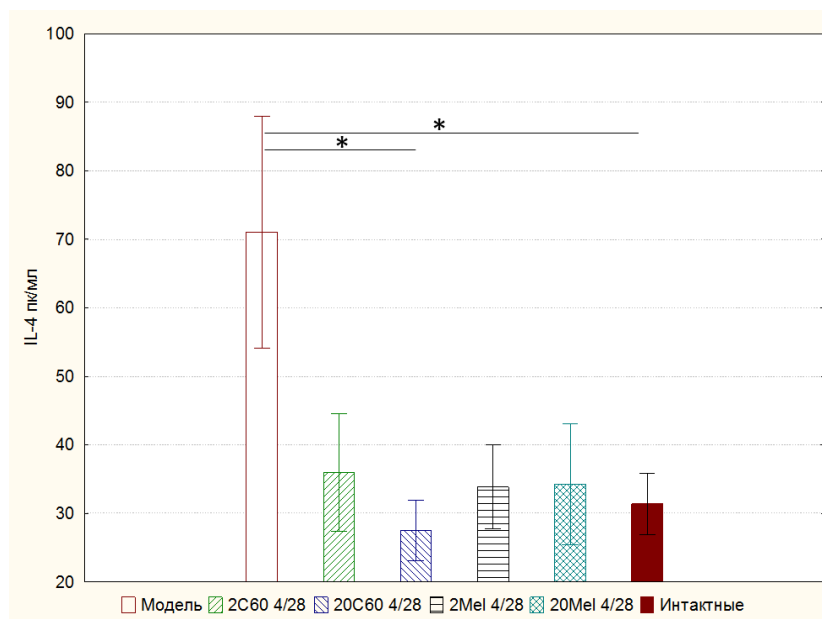


Рис. 49. Изменение концентрации IL-4 в супернатантах стимулированных спленоцитов, где животные получали терапию на ранних этапах сенсibilизации.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «2Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «Интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

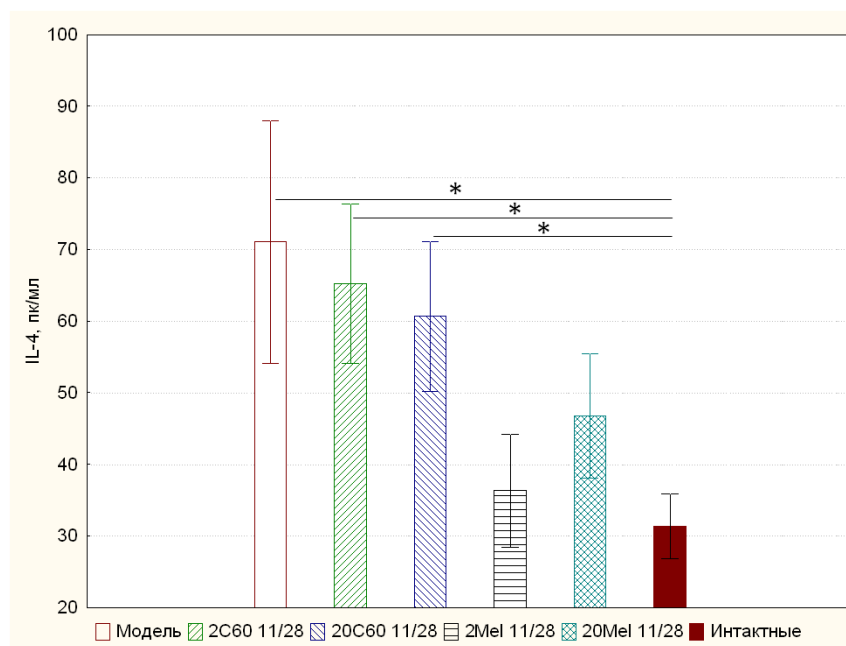


Рис. 50. Изменение концентрации IL-4 в супернатантах стимулированных спленоцитов, где животные получали терапию на поздних этапах сенсibilизации.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «2Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 20 мкг, «Интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$

На графиках видно, что при введении растворов фуллерена C60 и мелатонина в разные дни эксперимента уровни IL-4 были значительно ниже по сравнению с группой «Модель». Мыши, получавшие исследуемые препараты после первой и второй сенсibilизацией, имели уровни IL-4 ниже, чем мыши, которые получали эти же исследуемые препараты на 11 и 25 день. Уровень IL-4 в группе «20C60 4/28» был несколько ниже, чем в остальных экспериментальных группах. Однако, достоверной разницы между этими экспериментальными группами не наблюдалось.

Уровень IL-5, который отвечает за дифференцировку и активацию эозинофилов в аллергических реакциях проанализировали с помощью метода ИФА (Рис. 51, 52).

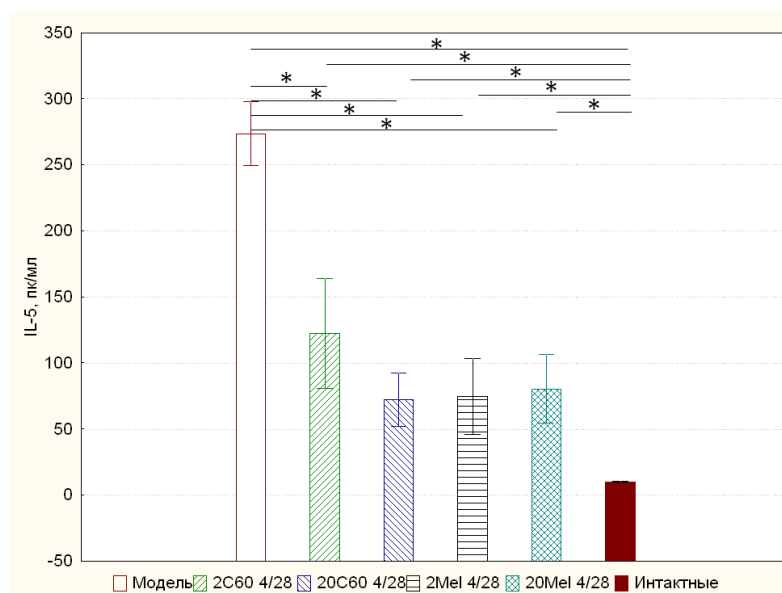


Рис. 51. Изменение концентрации IL-5 в супернатантах стимулированных спленоцитов, где животные получали терапию на ранних этапах сенсibilизации.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «2MeI 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20MeI 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «Интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

Было показано, что при введении исследуемых препаратов на 4 и 11 дни эксперимента уровень IL-5 был достоверно ниже уровня такового по сравнению с модельной группой. Стоит отметить, что группа мышей, получавших фуллерен C60 в дозе 20 мкг/мышь на 4 сутки («20C60 4/28») показала достоверно низкий уровень данного цитокина относительно группы экспериментального АШ.

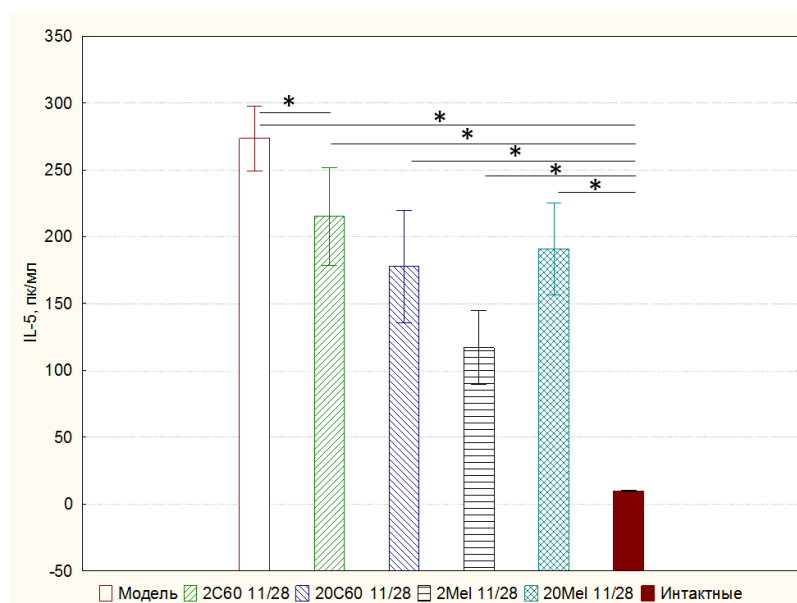


Рис. 52. Изменение концентрации IL-5 в супернатантах стимулированных спленоцитов, где животные получали терапию на поздних этапах сенсibilизации.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «2Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 20 мкг, «Интактные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$

При введении препаратов после второго этапа сенсibilизации и непосредственно перед разрешающей инъекцией аллергена (11 и 25 день) также отмечали снижение уровня IL-5. Среди животных, получавших фуллерен C60 и мелатонин на 11 день эксперимента, наиболее значительное снижение IL-5 было выявлено в группе «2Mel 11/28».

Далее, был проанализирован цитокин, секретируемый Th1-клетками IFN γ . Он блокирует образование IgE, а также подавляет активность Th2-лимфоцитов. На рис. 53 и 54 представлены результаты оценки уровня данного цитокина в супернатантах стимулированных спленоцитов мышей.

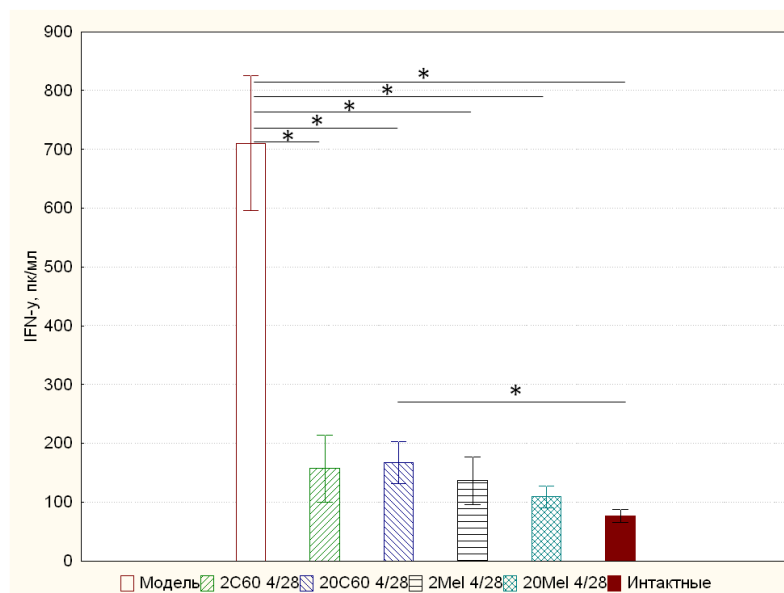


Рис. 53. Изменение концентрации IFN γ в супернатантах стимулированных спленоцитов, где животные получали терапию на ранних этапах сенсibilизации.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20C60 4/28» – введение фуллерена C60 на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «2Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «20Mel 4/28» – введение мелатонина на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «Интakтные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$.

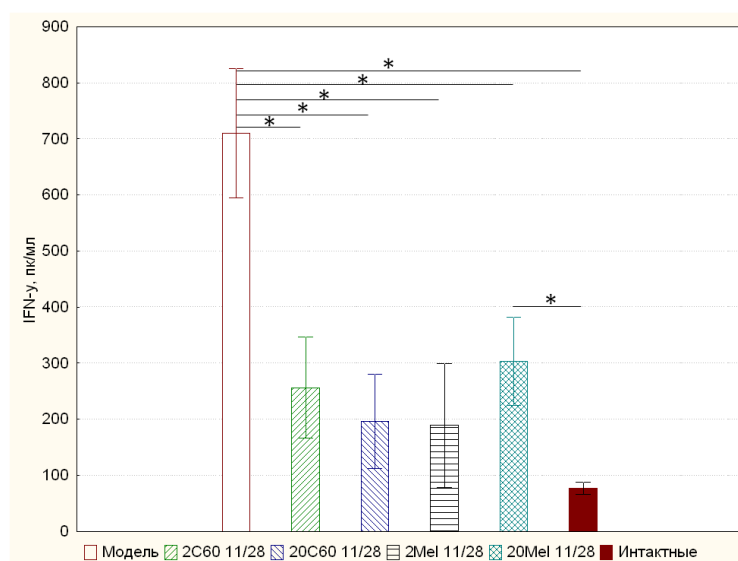


Рис. 54. Изменение концентрации IFN γ в супернатантах стимулированных спленоцитов, где животные получали терапию на поздних этапах сенсibilизации.

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20C60 11/28» – введение фуллерена C60 на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «2Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20Mel 11/28» – введение мелатонина на 11 и 25 день дозе 20 мкг, «Интakтные» – не сенсibilизированные животные. * - $p < 0.05$

Интересно, что IFN γ , отвечающий за Th1-ответ, в группе «Модель» показал высокие значения, несмотря на то, что при моделировании аллергических состояний он обычно снижен. Проведение же терапии путем введения мелатонина и фуллерена C60 приводило лишь к снижению данного показателя.

Таким образом, по анализу полученных клинических и иммунологических данных, можно сделать вывод о том, что наиболее эффективной группой для снижения степени проявления анафилактической реакции стала группа «20C60 4/28», где животные получали фуллерен C60 в дозе 20 мкг/мышь после каждого этапа сенсibilизации, но не перед разрешающей инъекцией аллергена. У мышей данной группы был снижен уровень Th-2 цитокинов (IL-4, IL-5), анти-OVA, а процент выживаемости составил 50%. Степень анафилактического шока при этом была оценена на 3 балла. Очевидно, фуллерен C60 способен оказывать противоаллергический эффект.

3.3. Изучение ранозаживляющей активности водного раствора фуллерена C60

3.3.1. Оценка ранозаживляющей активности ВРФ при моделировании раневого воспаления

В ходе изучения способности фуллерена C60 влиять на процессы регенерации кожной ткани мышей проводилось моделирование раневого поражения кожи мышей линии Balb/c. Интересно было провести прямое

сравнение эффектов ВРФ и самого известного производного фуллерена C60 – фуллеренола, поскольку изменение структуры может приводить к изменению биологической активности. На спине животных было произведено иссечение кожного покрова размером 1x1 см. После чего в отдельных группах проводилась терапия мазью, содержащей фуллерен, фуллеренол, а также кремом «Бепантен плюс», который использовался в качестве препарата сравнения.

3.3.1.1. *Визуальная оценка процесса заживления кожных поражений*

Визуальная оценка процесса заживления кожных поражений при моделировании раневого воспаления проводилась в течение всего эксперимента. Оценка регенерации осуществлялась индивидуально у каждой мыши. Исходное поражение кожи у мышей составляло $143,5 \pm 6,1$ мм². В последний день эксперимента площадь раневого поражения составляла: у мышей группы «самозаживление» – $44,4 \pm 6,5$ мм², «фуллерен C60» – $14,8 \pm 2,7$ мм², «фуллеренол C60-ОН» – $31,5 \pm 3,3$ мм², «Бепантен плюс» – $26,0 \pm 2,6$ мм². На рис. 55 представлены фотографии исследуемой области спины мышей после раневого поражения.



Рис. 55. Фото мышей на 12 день после терапии раневого поражения.

Видно, что остаточное поражение кожи было наименьшим в группах «фуллерен C60» и «Бепантен плюс». Визуальная оценка степени заживления кожного покрова является субъективным показателем, поэтому по полученным результатам измерений площади раневых поражений был проведен расчет статистической достоверности между исследуемыми группами.

3.3.1.2. Оценка ранозаживляющей эффективности

Для оценки ранозаживляющей эффективности препаратов проводили измерение площади раневой поверхности (в мм) на 1 и 12 дни эксперимента. Результаты измерений были выражены в процентах и представлены на рис. 56.

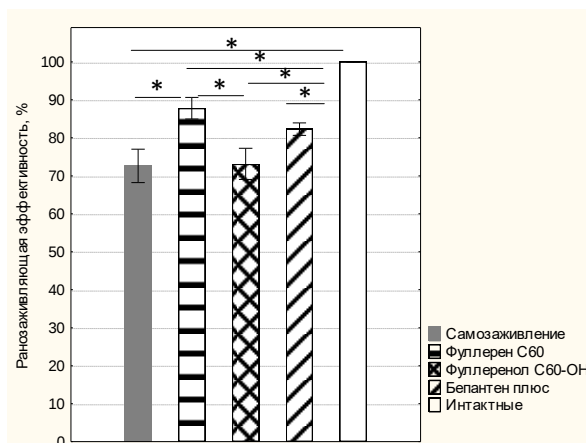


Рис. 56. Ранозаживляющая эффективность препаратов у мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Показано, что степень заживления кожи достоверно повышена в группе мышей, получавших фуллерен, по сравнению с группами «самозаживление» и «фуллеренол C60-OH». При нанесении фуллеренола и крема «Бепантен плюс» разницы в степени заживления кожи относительно группы «самозаживление» выявлено не было.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, фуллерен C60, по-видимому, способен оказывать ранозаживляющее действие.

3.3.1.3. Изучение экспрессии генов, вовлеченных в процесс регенерации кожного покрова

Оценку стимулирующего эффекта исследуемых препаратов на процесс заживления ран проводили путем количественного определения мРНК ряда генов, вовлеченных в процесс регенерации раны. Была проанализирована экспрессия таких генов, как *HMGB1*, *VEGF-A*, *FGFb*, *EGF*, *HIF-1 α* , *TGF β 1*, *TNF α* , *IL1 α* , *IL1 β* , *IL6*.

Сравнительный анализ мРНК гена *HMGB1*, кодирующего одноименный белок, в коже мышей после поражения представлен на рис. 57А. Этот белок играет важную роль в различных клеточных процессах, включая воспаление, клеточную дифференцировку и миграцию фибробластов, а также способствует ускоренному заживлению ран [Grellner, 2002].

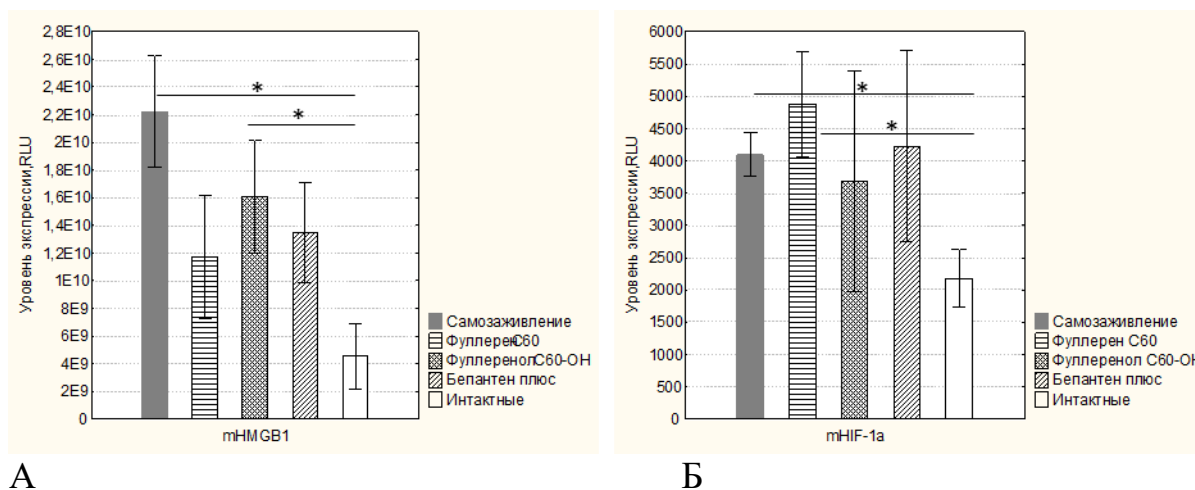


Рис. 57. Уровень мРНК *HMGB1* (А) и *HIF-1α* (Б) в кожной ткани мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Было показано, что между экспериментальными группами мышей («фуллерен С60», «фуллеренол С60-ОН», «Бепантен плюс») и животными, не получавшими терапию («самозаживление»), достоверных различий выявлено не было. Однако во всех экспериментальных группах уровень экспрессии гена *HMGB1* был выше, чем у интактных мышей, что может свидетельствовать об избыточной выработке данного фактора роста активированными макрофагами при раневом поражении кожи.

Далее, в рамках данной работы была проанализирована экспрессия мРНК гена *HIF-1α*. Данный ген кодирует белок HIF-1α, который ускоряет процесс заживления и кровоснабжение раны [Duscher et al., 2015]. Максимум его экспрессии обнаруживался примерно на 5 день после повреждения [Albina et al., 2001]. На рис. 57Б представлена экспрессия гена

HIF-1 α после раневого поражения кожи. Видно, что достоверных различий уровня экспрессии гена *HIF-1 α* в группах «фуллерен С60», «фуллеренол С60-ОН» и «Бепантен плюс» относительно группы «самозаживление» выявлено не было, однако присутствовала тенденция к увеличению экспрессии данного гена у мышей, получавших фуллерен С60. В группе «интактные» экспрессия гена *HIF-1 α* была ниже таковой в экспериментальных группах. Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о возможной стимуляции выработки *HIF-1 α* фуллереном С60, вследствие чего интенсифицировался процесс регенерации ткани.

Далее нами был проанализирован ряд факторов, ответственных за ангиогенез. Одним из основных таких факторов является VEGF-A. Сравнительный анализ экспрессии гена белка VEGF-A в пораженном участке кожи мышей на 12 день после моделирования раневого поражения показал, что при нанесении на рану фуллеренола или крема «Бепантен плюс» уровень экспрессии данного гена значительно повышался относительно группы «самозаживление». У мышей, получавших фуллерен С60, уровень экспрессии VEGF-A также был повышен (Рис. 58А). Таким образом, полученные данные позволяют нам сделать предположение о том, что стимуляция экспрессии данного фактора происходила как при нанесении фуллеренола или крема «Бепантен плюс», так и при нанесении свободного фуллерена С60.

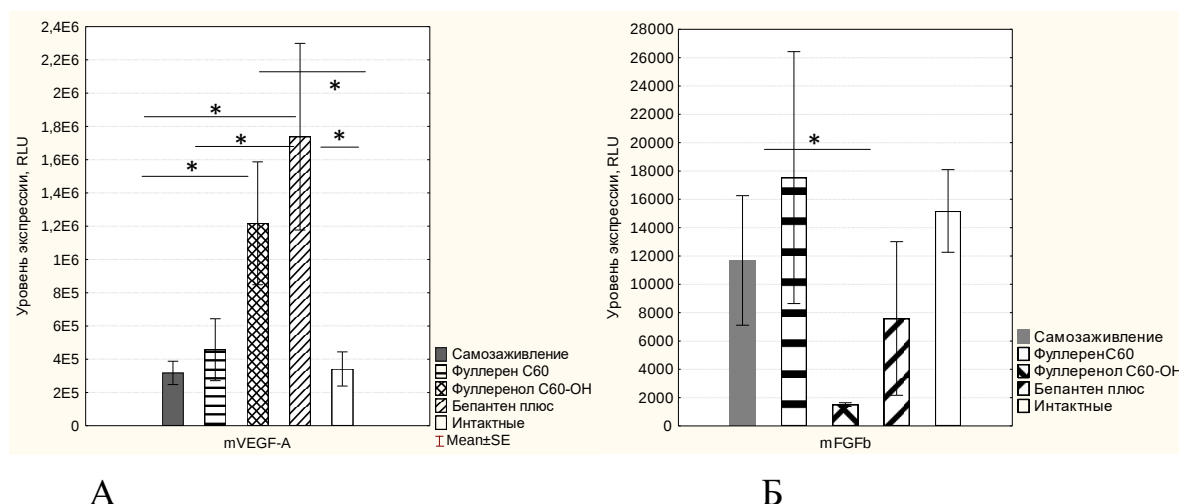
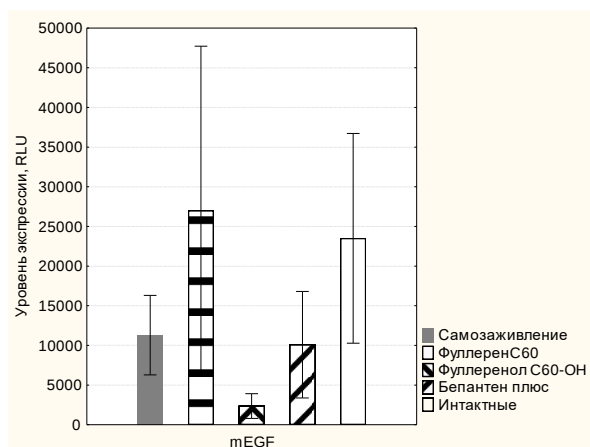
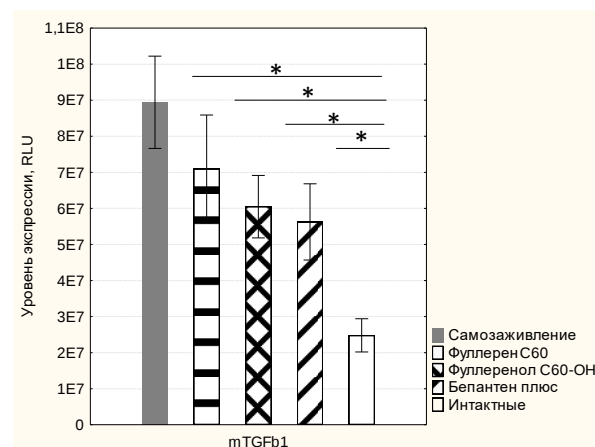


Рис. 58. Уровень мРНК *VEGF-A* (А) и *FGFb* (Б) в кожной ткани мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Наряду с *VEGF-A*, нами была проанализирована экспрессия фактора *FGFb*, который также является стимулятором ангиогенеза. Известно, что высокие уровни фактора *FGFb* обнаруживаются сразу после ранения, стимулируя экспрессию *VEGF-A*, но снижаются до исходного уровня на 3 день. Когда влияние *VEGF-A* уменьшается, *FGFb* преобладает в регуляции ангиогенеза. Таким образом, пик его экспрессии отмечался на 12-14 дни после раневого поражения [Bao et al., 2009]. По результатам исследования, представленным на рисунке 58Б, видно, что достоверной разницы в экспрессии данного гена у мышей опытных («фуллерен», «фуллеренол С60-ОН») и контрольных («Бепантен плюс», «самозаживление», «интактные») групп не наблюдалось. Однако наиболее явная тенденция к увеличению экспрессии *FGFb* наблюдалась у мышей, получавших фуллерен С60. Полученные данные свидетельствуют о том, что фуллерен С60, по-видимому, увеличивает кровоснабжение в очаге поражения.



А



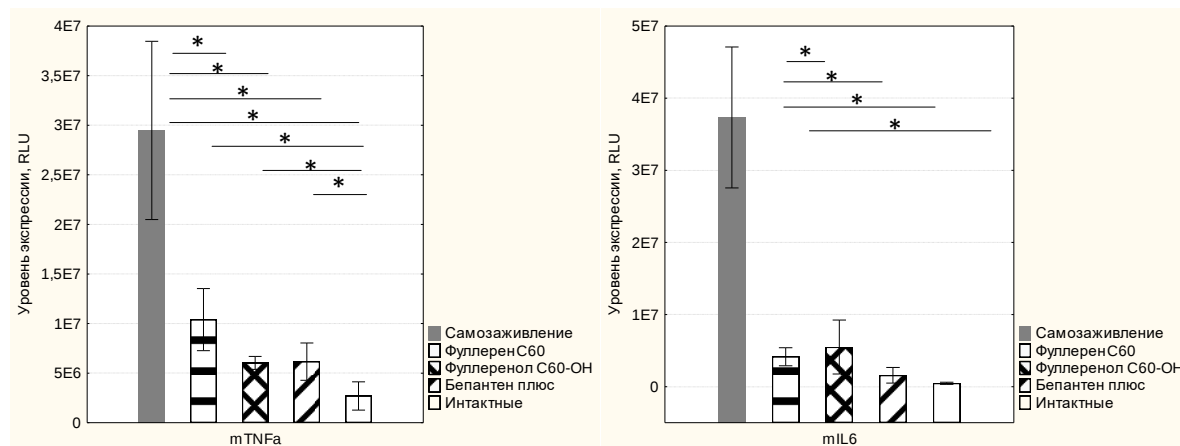
Б

Рис. 59. Уровень мРНК *EGF* (А) и *TGFβ1* (Б) в кожной ткани мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Еще одним геном, участвующим в процессе ангиогенеза является *EGF*. По данным литературы пик экспрессии гена *EGF* наблюдался в 1 день после поражения кожи, после чего происходит снижение его экспрессии, и на 10-14 дни отмечался наименьший уровень данного фактора [Shen et al., 2017]. На рис. 59А показано, что достоверной разницы между экспериментальными группами («фуллерен С60», «фуллеренол С60-ОН», «Бепантен плюс») и группой «самозаживление» по уровню экспрессии *EGF* не выявлено. Отсутствие разницы можно объяснить тем, что ген *EGF* является ранним геном, а забор экспериментального материала происходил на стадии реэпителизации, когда вполне возможно, что уровень экспрессии гена уже не был выражен. Антагонистом гена *EGF* является ген *TGFβ1*, уровень экспрессии которого приведен на рис. 59Б. На графике видно, что разницы между экспериментальными группами и группой «самозаживление» после раневого поражения не выявлено, однако замечена явная тенденция к снижению экспрессии *TGFβ1* в группах «фуллерен С60», «фуллеренол С60-ОН» и «Бепантен плюс». Цитокин *TGFβ1* осуществляет огромное количество реакций в организме для ускорения заживления при поражении кожи, однако на этапе эпителизации он подавляет миграцию и пролиферацию клеток эпидермиса [Gurtner et al.,

2008]. Поэтому можно предположить, что фуллерен C60 стимулирует процесс эпителизации кожного покрова.

Также было определено количество провоспалительных цитокинов $TNF\alpha$ и $IL6$. Известно, что высокие уровни $TNF\alpha$ замедляют заживление ран [Ashcroft et al., 2012]. Результаты экспрессии $TNF\alpha$ после раневого поражения представлены на рисунке 60А.



А

Б

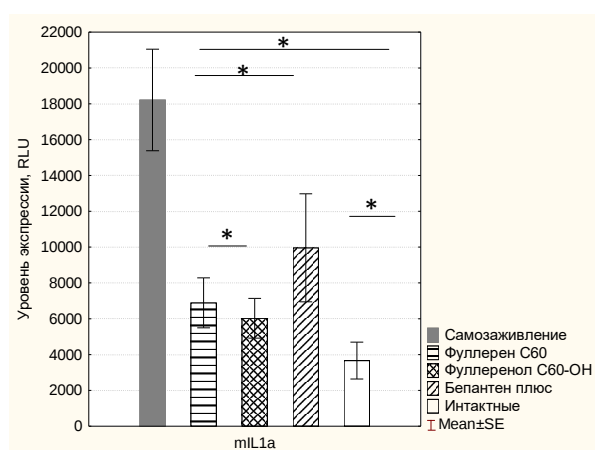
Рис. 60. Уровень мРНК $TNF\alpha$ (А) и $IL6$ (Б) в кожной ткани мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Видно, что во всех экспериментальных группах («фуллерен C60», «фуллеренол C60-ОН», «Бепантен плюс») уровень экспрессии $TNF\alpha$ был достоверно понижен по сравнению с группой «самозаживление» и достоверно повышен по сравнению с группой «интактные». Известно, что у мышей после раневого поражения уровень экспрессии гена $TNF\alpha$ по данным Godwin с соавт. достиг максимума на 7 день [Godwin et al., 2015], а по данным Albina J.E. – на 10 день [Albina et al., 2001]. Наши данные согласуются с литературными и свидетельствуют о подавлении экспрессии $TNF\alpha$ при терапии мышей фуллереном C60, что может приводить к нивелированию негативного воздействия в очаге поражения.

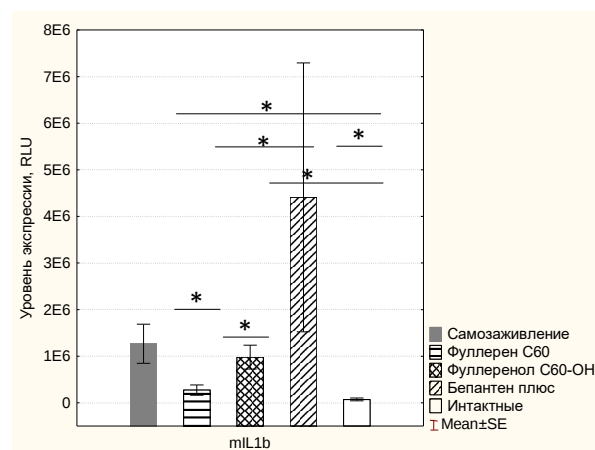
На рис. 60Б представлены результаты экспрессии гена $IL6$ после раневого поражения кожи. Показано, что при нанесении фуллерена,

фуллеренола и крема «Бепантен плюс» наблюдалось снижение уровня *IL6* относительно группы «самозаживление», что может говорить о подавлении процесса воспаления на месте раневого поражения.

Далее, нами был проанализирован уровень экспрессии генов таких цитокинов, как *IL1α* и *IL1β*, которые также участвуют в воспалительной фазе при заживлении ран. Результаты анализа представлены на рис. 61А и 61Б. Показано, что при нанесении на область поражения фуллерена или фуллеренола уровень экспрессии гена *IL1α* заметно снижался относительно группы мышей, не получавших терапию (Рис. 61А). У мышей, получавших терапию кремом «Бепантен плюс», была выявлена лишь тенденция к снижению уровня *IL1α*.



А



Б

Рис. 61. Уровень мРНК *IL1α* (А) и *IL1β* (Б) в кожной ткани мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Относительно экспрессии *IL1β*, представленной на рисунке 61Б, можно отметить, что в пораженных участках кожи мышей группы «фуллерен С60» наблюдалось достоверное понижение экспрессии данного гена относительно группы «самозаживление». При нанесении фуллеренола и крема «Бепантен плюс» достоверной разницы в экспрессии гена *IL1β* относительно группы «самозаживление» выявлено не было. По полученным данным можно сделать вывод, что фуллерен С60, по-

видимому, способствует подавлению воспаления в пораженной кожной ткани.

Как было написано ранее, при визуальной оценке заживления нами было замечено, что в группе «фуллерен C60» остаточная площадь поражения была достоверно ниже, чем мышей группы «самозаживление». Что касается терапии фуллеренолом и кремом «Бепантен плюс», то аналогичной картины не наблюдалось. Так как визуальная оценка заживления – один из важных критериев ранозаживляющей эффективности препаратов, то было решено не оценивать действие фуллеренола на терапию щелочных и кислотных ожогов. В качестве контроля регенерации вместо крема «Бепантен плюс» была взята классическая мазь «Д-пантенол», улучшающая трофику и регенерацию тканей после ожогов, так как такие поражения, в отличие от ран, реже инфицируются микроорганизмами.

3.3.2. Оценка ранозаживляющей активности ВРФ при моделировании ожогового воспаления

3.3.2.1. Визуальная оценка процесса заживления кожных поражений

При моделировании ожога кислотой визуальная оценка процесса заживления кожных поражений проводилась индивидуально у каждого животного в течение всего эксперимента. Исходное поражение кожи имело значение $261,4 \pm 15,0$ мм². По окончании терапии площадь ожога в группе «самозаживление» составила $17,0 \pm 3,4$ мм², в группе «фуллерен C60» – $15,5 \pm 3,9$ мм², в группе «Д-пантенол» – $13,8 \pm 1,6$ мм². На рис. 62 представлены фотографии животных до и после терапии препаратами.



Рис. 62. Фото мышей на 2 и 18 день после терапии кислотного ожога.

Показано, что визуальных различий в степени заживления между опытными и контрольными группами не наблюдалось. Таким образом, ожидаемого терапевтического эффекта от наносимых препаратов при моделировании кислотного ожога выявлено не было.

3.3.2.2. Оценка ранозаживляющей эффективности

Для оценки ранозаживляющей эффективности исследуемых препаратов проводили расчет площади кожного поражения на 2 и 18 дни эксперимента. Результат анализа выражен в процентах от исходного поражения кожи и представлен на рис. 63.

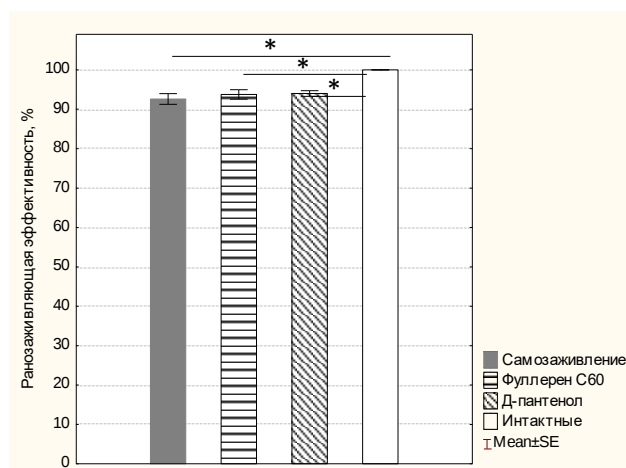


Рис. 63. Ранозаживляющая эффективность препаратов у мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Видно, что применение фуллерена C60 и мази «Д-пантенол» не приводило к ускорению процесса заживления, поскольку ранозаживляющая эффективность, рассчитанная для этих групп, не

отличалась от таковой у мышей, не получавших терапию («самозаживление»).

3.3.2.3. Оценка гистологических изменений кожного покрова

Степень заживления ран кожного покрова мышей после нанесения ледяной уксусной кислоты определяли по ряду патоморфологических изменений, указанных в табл. 6. На рис. 64 видно, что после применения мази «Д-пантенол» наблюдалось достоверное повышение степени заживления относительно группы «фуллерен С60». Достоверных различий в группах «фуллерен С60» или «Д-пантенол» относительно группы «самозаживление» выявлено не было.

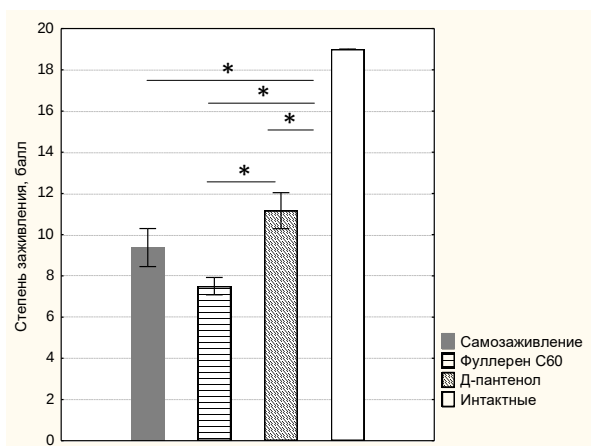


Рис. 64. Степень заживления кожного покрова мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Таким образом, нанесение фуллерена С60 не оказывает влияния на гистологическую картину пораженных участков кожи животных, получивших ожог кислотой.

3.3.2.4. Анализ гематологических показателей крови

В ходе моделирования кислотного ожога был проведен анализ основных показателей крови (Табл. 24).

Табл. 24. Показатели крови мышей на 18 день после кислотного ожога.

Показатели/ группы	Само- заживление	Фуллерен C ₆₀	Д- пантенол	Интактные	Норма
Лейкоциты, x10 ⁹ /л	8,37 ± 0,55	7,23 ± 0,75	7,48 ± 0,56	9,08 ± 0,83	3,48 – 14,03
Эритроциты, x10 ¹² /л	9,94 ± 0,19	9,58 ± 0,20	9,82 ± 0,09	9,92 ± 0,15	8,16 – 11,69
Гемоглобин, г/л	158,50 ± 2,30*	152,88 ± 2,30**	158,13 ± 2,70*	168,63 ± 2,59	124,0 – 189,0
Гематокрит, %	49,87 ± 0,64**	47,05 ± 0,65**	47,63 ± 0,46**	53,10 ± 0,77	43,5 – 67,0
Тромбоциты, x10 ⁹ /л	770,75 ± 49,04*	592,63 ± 89,63	889,88 ± 63,58**	594,75 ± 46,05	476,0 – 1611,0
Палочкоядерные нейтрофилы	5,88 ± 0,88* ↑	4,13 ± 0,35	2,63 ± 0,50	3,25 ± 0,41	1,0 – 5,0
Сегментоядерные нейтрофилы	26,75 ± 3,06	36,75 ± 3,02 ↑	27,75 ± 2,70	35,50 ± 3,29 ↑	13,0 – 30,0
Эозинофилы	2,88 ± 0,85	3,50 ± 0,73	3,13 ± 0,93	2,13 ± 0,69	0,0 – 4,0
Моноциты	3,13 ± 0,35*	3,88 ± 0,69	2,75 ± 0,49*	4,63 ± 0,53	2,0 – 5,0
Лимфоциты	61,38 ± 3,53	51,75 ± 2,60 ↓	63,75 ± 2,70	54,50 ± 3,43 ↓	60,0 – 78,0

Показано, что общее количество лейкоцитов заметно снизилось во всех экспериментальных группах относительно группы «интактные», что говорит об уменьшении защитных клеток организма на фоне ожогового поражения. Что касается количественного содержания красных клеток крови, то различий между экспериментальными группами («самозаживление», «фуллерен C₆₀», «Д-пантенол») и интактными мышами не наблюдалось. Стоит отметить, что в группах «самозаживление», «фуллерен C₆₀» и «Д-пантенол» были понижены уровни гемоглобина и гематокрита по сравнению с интактными мышами. В группе мышей, получавших «Д-пантенол», и у мышей, не получавших терапию, отмечалось повышенное содержание тромбоцитов. При терапии

фуллереном C60 количество тромбоцитов было сравнимо с таковым у интактных мышей.

Известно, что при ожогах часто наблюдалось повышение палочкоядерных нейтрофилов. Так, при подсчете лейкоцитарной формулы в группе «самозаживление» тоже было выявлено повышенное содержание палочкоядерных нейтрофилов, количество которых выходило за пределы нормы, что говорит о наличии бактериальной инфекции. При нанесении же фуллерена C60 и «Д-пантенол» количество палочкоядерных нейтрофилов оставалось в пределах нормальных показателей. При определении количества сегментоядерных нейтрофилов были выявлены случаи превышения нормы в группах «интактные» и «Д-пантенол», что может свидетельствовать о наличии инфекции и развитии воспалительного процесса.

Далее было показано, что количество эозинофилов в экспериментальных группах находилось в пределах нормы и не отличалось от интактных мышей, так как данный тип клеток не принимает участия в процессах заживления. Известно, что при ожоговых поражениях, как правило, происходит снижение уровня моноцитов. Количество моноцитов в группах «самозаживление» и «Д-пантенол» было меньше, чем у интактных животных. При терапии же фуллереном C60, моноцитопении не наблюдалось. Однако терапия фуллереном C60 вызывала у мышей лимфопению. В группах «самозаживление» и «Д-пантенол» значения количества лимфоцитов находились в пределах нормы.

Таким образом, можно отметить тенденцию к улучшению картины крови при проведении терапии фуллереном C60 после ожогового поражения кожи уксусной кислотой.

3.3.2.5. *Изучение экспрессии генов, вовлеченных в процесс регенерации кожного покрова*

Оценку стимулирующего эффекта исследуемых препаратов на процесс заживления ран при моделировании кислотного ожога проводили

путем ПЦР-РВ. Была проанализирована экспрессия мРНК таких генов, как *HMGB1*, *VEGF-A*, *FGFb*, *EGF*, *HIF-1 α* , *TGF β 1*, *TNF α* , *IL1 α* , *IL1 β* , *IL6*.

На рис. 65 представлена экспрессия генов *HMGB1* и *HIF-1 α* - основных факторов, отвечающих за регенерацию. Показано, что проведение терапии не влияло на экспрессию указанных генов.

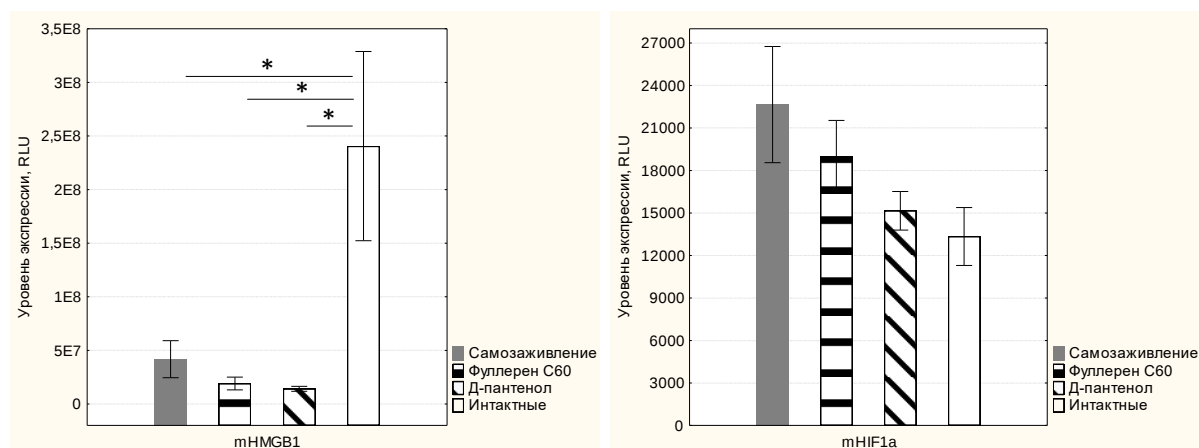


Рис. 65. Уровень мРНК *HMGB1* (А) и *HIF-1 α* (Б) в кожной ткани мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

На рис. 66А, 66Б и 67А представлена экспрессия основных факторов, отвечающих за ангиогенез на месте поврежденных тканей.

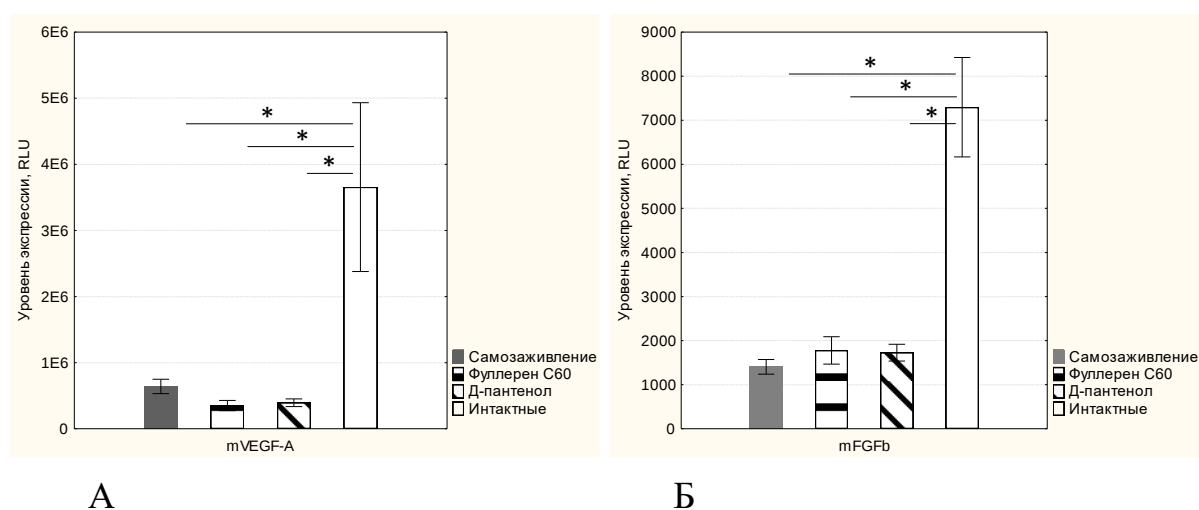


Рис. 66. Уровень мРНК *VEGF-A* (А) и *FGFb* (Б) в кожной ткани мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Видно, что уровень экспрессии *VEGF-A*, *FGFb*, *EGF* был заметно снижен в экспериментальных группах («самозаживление», «фуллерен С60» и «Д-пантенол») относительно интактных мышей. Кроме того, при проведении терапии не наблюдалось стимуляции экспрессии данных факторов.

На рисунке 66Б показана экспрессия гена *TGFβ1* в коже мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога.

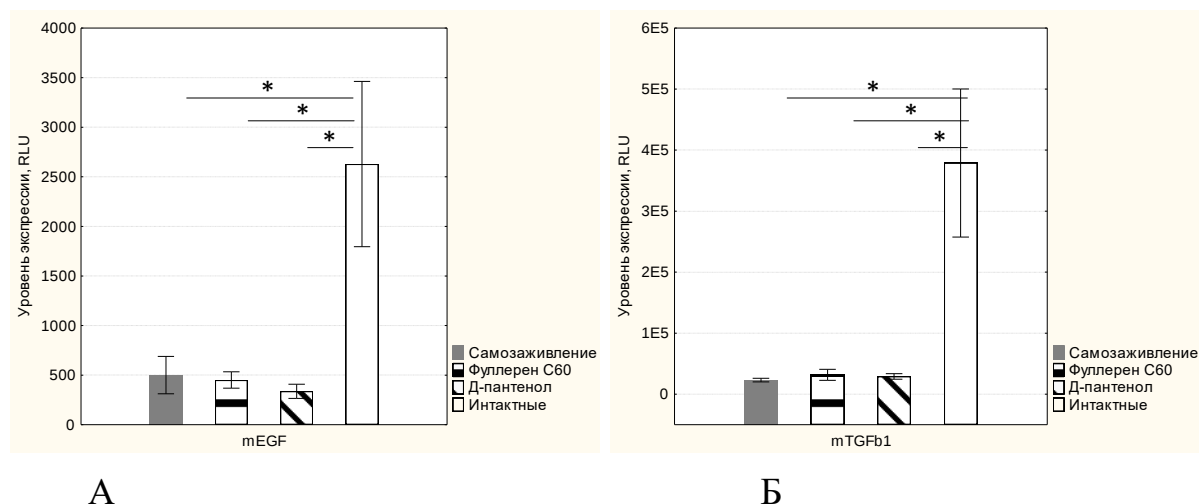


Рис. 67. Уровень мРНК *EGF* (А) и *TGFβ1* (Б) в кожной ткани мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Показано, что стимуляции экспрессии гена *TGFβ1* не происходило не зависимо от проведения терапии. На рисунке 68А и Б представлена экспрессия гена *TNFα* и *IL6*.

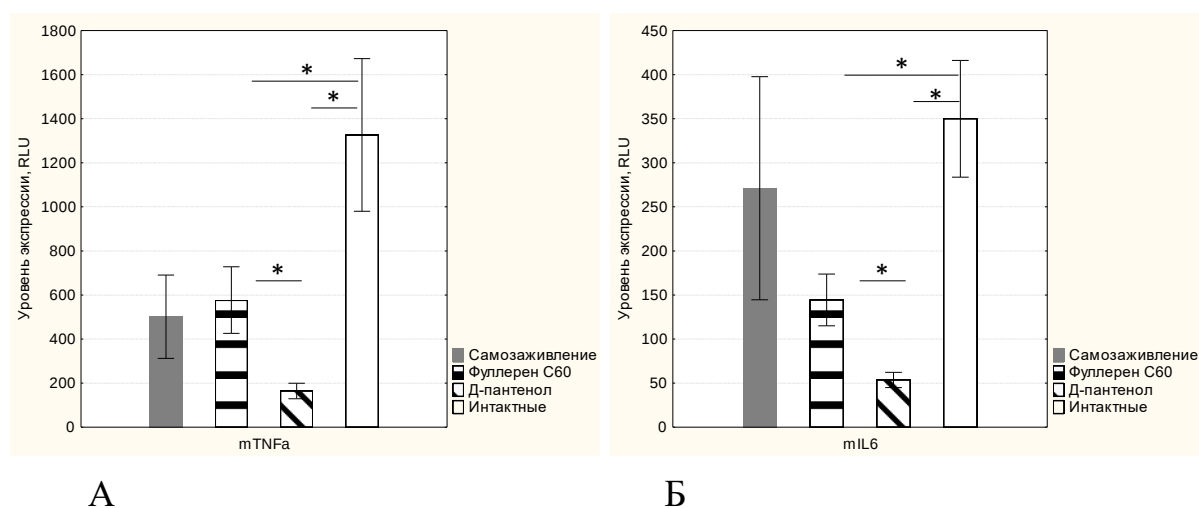


Рис. 68. Уровень мРНК *TNF α* (А) и *IL6* (Б) в кожной ткани мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Показано, что группы мышей, получавшие фуллерен С60 и мазь «Д-пантенол», имели достоверно низкие уровни экспрессии *TNF α* и *IL6* относительно интактных животных. Однако достоверных различий у мышей данных групп с группой «самозаживление» не наблюдалось.

При оценке экспрессии ИЛ1, можно отметить, что у мышей группы «Д-пантенол» наблюдалась пониженная экспрессия *IL1 α* относительно животных, не получавших терапию, и интактных мышей (Рис. 69А).

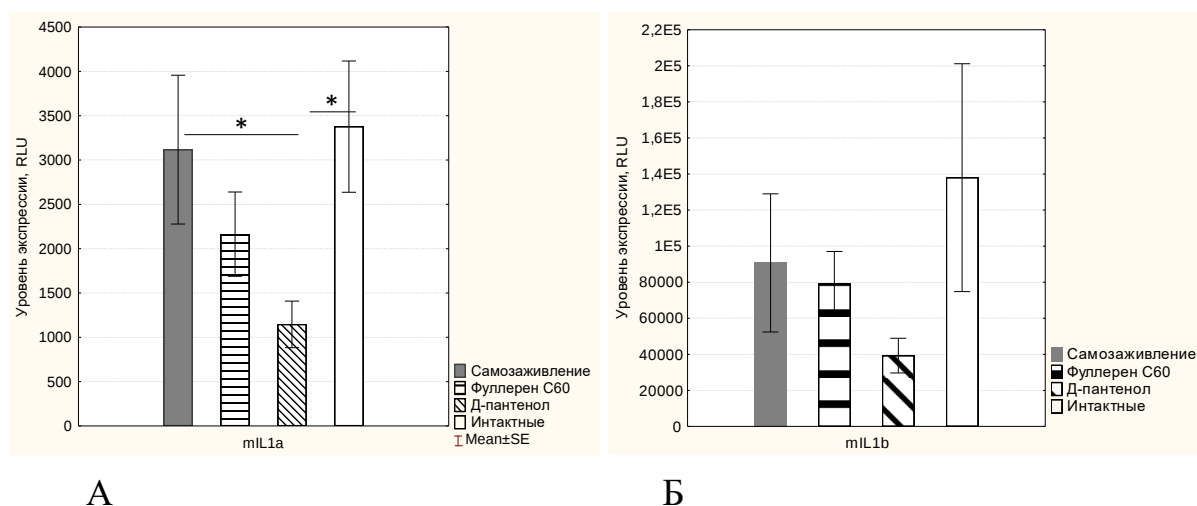


Рис. 69. Уровень мРНК *IL1 α* (А) и *IL1 β* (Б) в кожной ткани мышей на 18 день после моделирования кислотного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

При оценке экспрессии *IL1 β* было показано, что достоверных отличий в уровне экспрессии данного гена между экспериментальными группами и интактными мышами не выявлено (Рис. 69Б).

Полученные данные показали, что проведение терапии не влияет на экспрессию факторов, отвечающих за регенеративные процессы в коже, поскольку она оставалась на уровне группы, не получавшей терапию («самозаживление»). Показанные результаты также подтверждают отсутствие визуального терапевтического эффекта. Однако следует учесть,

что пик экспрессии анализируемых факторов, участвующих в процессе регенерации пройден, поскольку материал забирался на 18 день после моделирования поражения. Но, при отсутствии визуального терапевтического эффекта, дальнейший анализ экспрессии генов, участвующих в процессе регенерации представляется не целесообразным.

3.3.3. Оценка ранозаживляющей активности ВРФ при моделировании химического ожога кожи путем нанесения NaOH (терапия 11 дней).

Терапия проводилась в течение 11 дней.

Руководство по разработке доклинических исследований лекарственных средств [Миронова, 2012] и методика, описанная в статье Шубиной В.С. и Шаталина Ю.В. [Шубина, 2012] легли в основу разработки модели ожогового поражения.

3.3.3.1. Визуальная оценка процесса заживления кожных поражений

На рисунке 70 представлены фотографии мышей в 1 день проведения эксперимента по моделированию щелочного ожога. Размер старта составлял $90,0 \pm 4,9$ мм². На 11 день эксперимента площадь ожога составляла: в группе «самозаживление» – $32,6 \pm 1,8$ мм², в группе «фуллерен С60» – $24,2 \pm 2,1$ мм², в группе «Д-пантенол» – $15,2 \pm 1,0$ мм².



Рис. 70. Фото мышей на 1 и 11 день после терапии щелочного ожога

Показано, что у мышей в группе «фуллерен С60» на 11 день после щелочного ожога не было выявлено разницы в визуальной оценке регенерации кожного покрова относительно группы «самозаживление»,

однако применение мази «Д-пантенол» выявило существенное преимущество в заживлении по сравнению с мышами, не получавшими терапию. Далее была определена ранозаживляющая эффективность исследуемых препаратов.

3.3.3.2. Оценка ранозаживляющей эффективности

На рисунке 71 представлена ранозаживляющая эффективность препаратов на 11 день после щелочного ожога. Видно, что у мышей, получавших «Д-пантенол», наблюдалось достоверное увеличение степени заживления пораженного участка кожи по сравнению с группой «самозаживление».

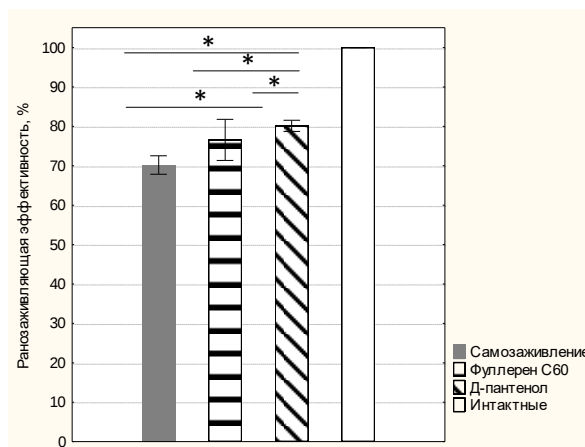


Рис. 71. Ранозаживляющая эффективность препаратов у мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Отсутствие же статистически значимой достоверности в степени заживления кожного покрова после повреждения между группами «фуллерен C60» и «самозаживление», возможно, связано с более ранними сроками забора патологического материала. Основываясь на полученных данных по ранозаживляющей эффективности, было принято решение о нецелесообразности проведения гистологического анализа пораженных участков кожного покрова.

3.3.3.3. Оценка гистологических изменений кожного покрова

Оценка гистологических изменений кожного покрова после ожога щелочью определялась по ряду патоморфологических изменений,

указанных в таблице 2. На рисунке 72 видно, что после щелочного ожога применение фуллерена С60 и «Д-пантенол» повышало степень заживления кожи по сравнению с группой «самозаживление».

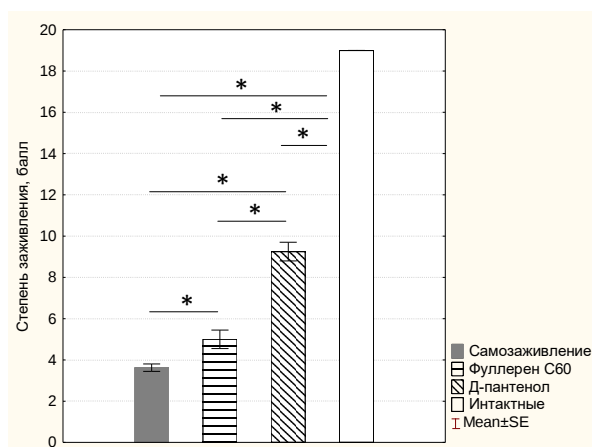


Рис. 72. Степень заживления кожного покрова мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Полученные данные свидетельствуют об улучшении гистологической картины кожного покрова при применении фуллерена С60.

3.3.3.4. Анализ гематологических показателей крови

Влияние фуллерена С60 на содержание клеток крови после щелочного ожога определялось 11 день после ожога щелочью (Табл. 26).

Табл. 26. Показатели крови мышей на 11 день после щелочного ожога.

Показатели/ группы	Само- заживление	Фуллерен С ₆₀	Д- пантенол	Интактные	Норма
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$8,59 \pm 0,33^{**}$	$8,34 \pm 0,52^{**}$	$7,00 \pm 0,60^{**}$	$11,23 \pm 0,83$	3,48 – 14,03
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	$10,49 \pm 0,11^{**}$	$10,59 \pm 0,07^{**}$	$10,36 \pm 0,12^*$	$9,98 \pm 0,08$	8,16 – 11,69
Гемоглобин, г/л	$152,88 \pm 1,71$	$153,25 \pm 1,45$	$151,63 \pm 2,27$	$150,75 \pm 1,60$	124,0 – 189,0
Гематокрит, %	$46,24 \pm 0,72^*$	$48,10 \pm 0,31^*$	$48,45 \pm 0,56$	$49,56 \pm 0,59$	43,5 – 67,0
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$902,23 \pm 24,78$	$968,75 \pm 29,91^*$	$819,13 \pm 28,10$	$870,88 \pm 25,91$	476,0 – 1611,0

Показано, что на 11 день ожогового поражения щелочью количество лейкоцитов в группах «самозаживление», «фуллерен С60» и «Д-пантенол»

было достоверно ниже относительно группы «интактные», что говорит о наличии выраженной лейкопении после ожога. Так же необходимо отметить присутствие эритроцитоза во всех экспериментальных группах, что также является логичным при ожоговом поражении. Однако количество гематокрита было снижено только в группах «самозаживление» и «фуллерен С60». Одновременное повышение эритроцитов и понижение гематокрита делает затруднительным анализ влияния препаратов на картину крови. Стоит отметить, что количество переносчиков кислорода в экспериментальных группах не отличалось. Что касается тромбоцитов, то в группе «фуллерен С60» наблюдались повышенные уровни данного типа клеток относительно интактных мышей, что может свидетельствовать о наличии повреждений в кровеносных сосудах на месте ожога.

3.3.3.5. Изучение экспрессии генов, вовлеченных в процесс регенерации кожного покрова

Оценку влияния исследуемых препаратов на процесс регенерации ожоговых поражений кожи проводили путем количественного определения мРНК генов, участвующих в данном процессе.

Так, на рисунке 73А показана экспрессия гена *HMGB1*.

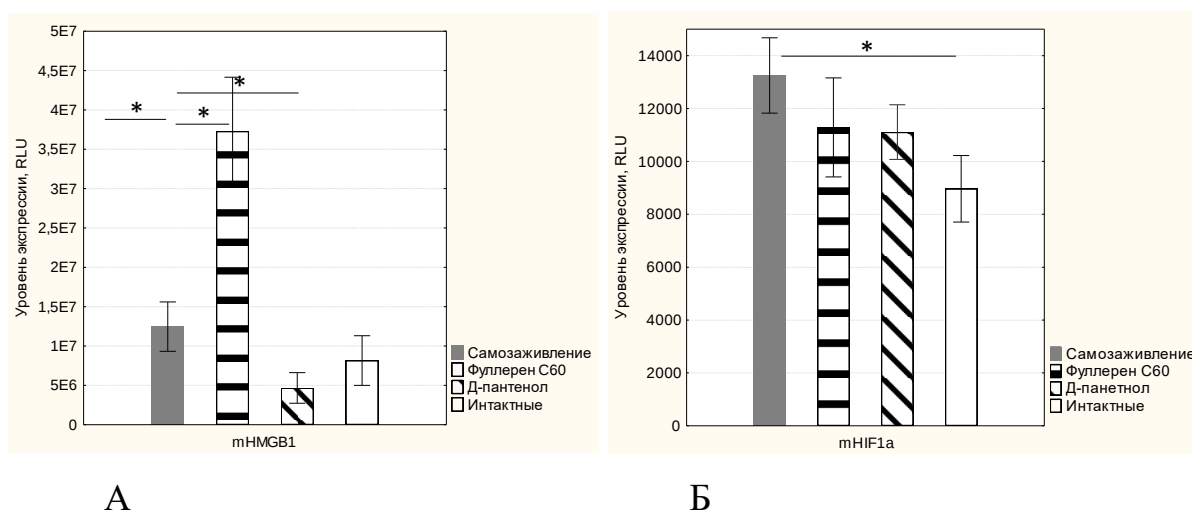


Рис. 73. Уровень мРНК *HMGB1* (А) и *HIF-1α* (Б) в кожной ткани мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Видно, что на 11 день после поражения щелочью у мышей в группе «фуллерен С60» наблюдалось достоверное повышение уровня экспрессии гена *HMGB1* по сравнению с группами «самозаживление», «Д-пантенол», «интактные», что может свидетельствовать об интенсивном процессе регенерации ожогового поражения при нанесении на рану фуллерена С60.

Что касается экспрессии *HIF-1 α* , то в группах «фуллерен С60» и «Д-пантенол» выявлена тенденция к снижению уровня экспрессии данного гена относительно группы «самозаживление» (Рис. 73Б). Известно, что экспрессия *HIF-1 α* в области ожоговых поражений кожи обычно коррелирует с уровнем гипоксии. Таким образом, полученные нами данные говорят о том, что нанесение на область поражения фуллерена С60 снижает уровень гипоксии.

Также в рамках данной работы была проанализирована экспрессия такого фактора ангиогенеза, как *VEGF-A*.

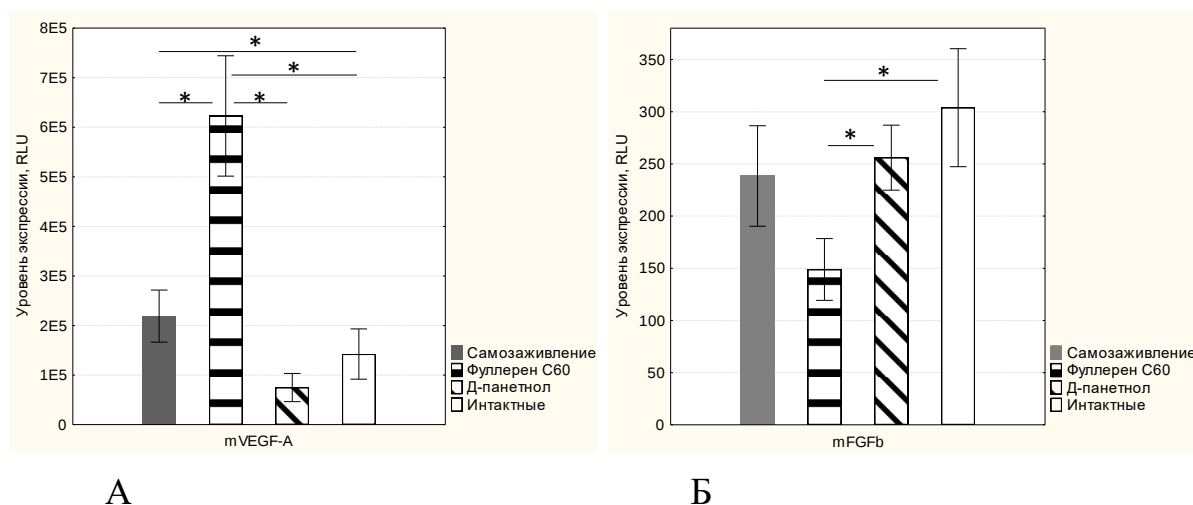
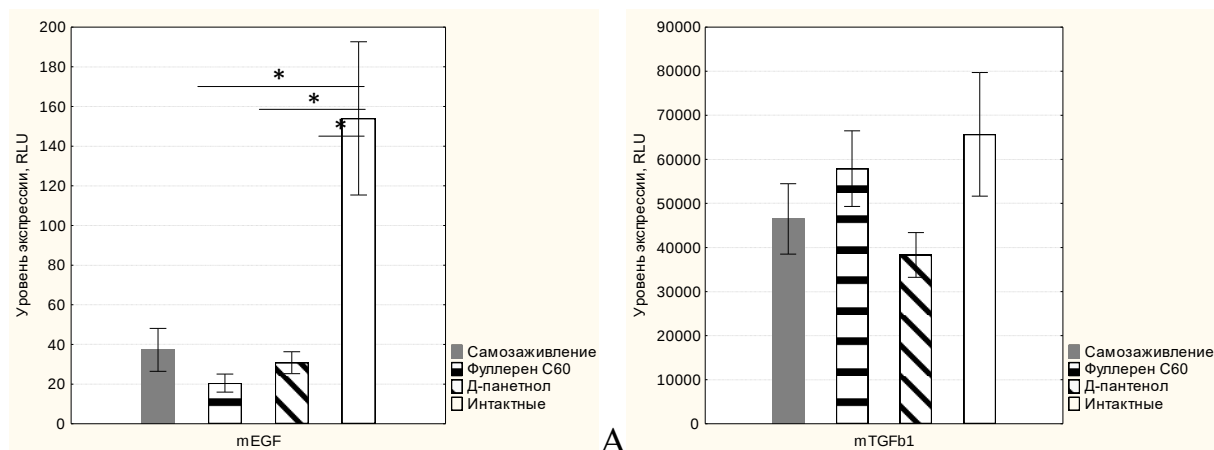


Рис. 74. Уровень мРНК *VEGF-A* (А) и *FGFb* (Б) в кожной ткани мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

На рисунке 74А показано, что у мышей, получавших фуллерен С60, выявлено достоверное повышение экспрессии *VEGF-A* относительно групп «самозаживление», «Д-пантенол», «интактные». Таким образом, фуллерен С60, по-видимому, способствует процессу восстановления кровоснабжения в области поражения.

Экспрессия еще одного фактора ангиогенеза – *FGFb* представлена на рисунке 74Б. Показано, что в группе «фуллерен С60» экспрессия *FGFb* была достоверно ниже, чем в группе «Д-пантенол», однако относительно группы «самозаживление» наблюдалась только тенденция к снижению.

Далее нами была проанализирована экспрессия *EGF*, который также участвует в процессе ангиогенеза (Рис. 75А).



Б

Рис. 75. Уровень мРНК *EGF* (А) и *TGFβ1* (Б) в кожной ткани мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Видно, что у интактных мышей экспрессия данного гена была выше, чем у животных экспериментальных групп («самозаживление», «фуллерен С60» и «Д-пантенол»). В то же время достоверной разницы между самими экспериментальными группами не наблюдалось. Возможно, это связано с тем, что при поражении кожи максимальная экспрессия *EGF* и *FGFb* приходится на более ранние сроки, нежели гена *VEGF-A*, что согласуется с данными Chen X., которые показали пик экспрессии данных генов на 5 день после ожога [Chen et al., 2013].

Далее нами была проанализирована экспрессия гена *TGFβ1* (Рис. 75Б). Показано, что уровень экспрессии данного гена между опытной («фуллерен С60») и контрольными («самозаживление», «Д-пантенол») группами не имел статистической достоверности, что может говорить о том, что фуллерен С60 не оказывает заметного влияния на экспрессию гена

TGF β 1. Помимо представленных генов, было определено количественное содержание провоспалительных цитокинов.

На рисунке 76А представлена экспрессия гена *TNF α* . После моделирования щелочного ожога в группах «фуллерен С60» и «Д-пантенол» была выявлена тенденция к снижению экспрессии гена *TNF α* относительно группы «самозаживление».

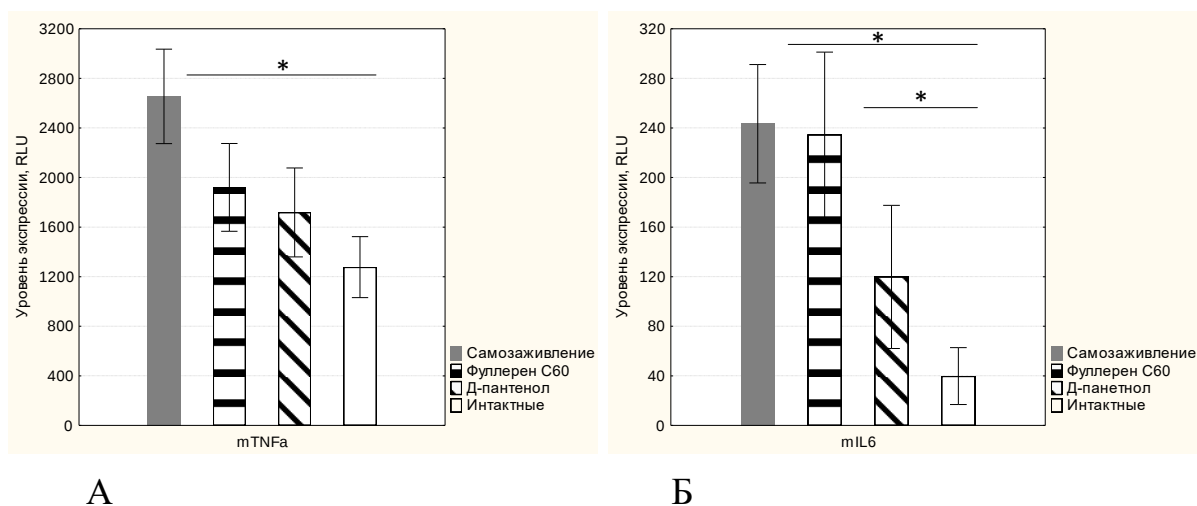


Рис. 76. Уровень мРНК *TNF α* (А) и *IL6* (Б) в кожной ткани мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Экспрессия цитокина *IL6* показана на рисунке 76Б. При нанесении на область пораженной ткани мази «Д-пантенол» и фуллерена С60 достоверных различий в уровне экспрессии *IL6* относительно группы мышей, не получавших терапию («самозаживление»), выявлено не было.

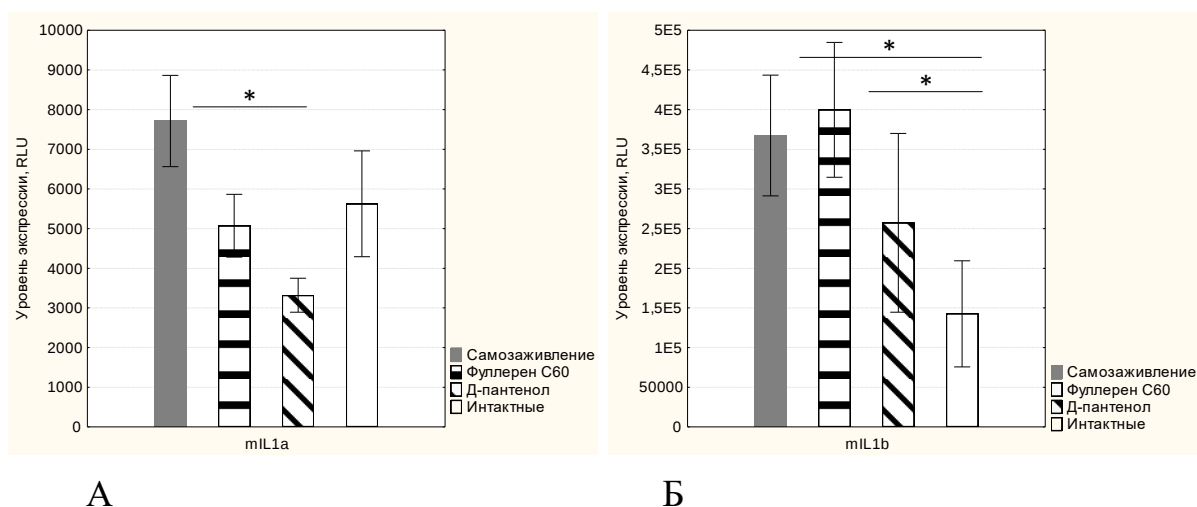


Рис. 77. Уровень мРНК *IL1 α* (А) и *IL1 β* (Б) в кожной ткани мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

При оценке экспрессии гена $IL1\alpha$ было показано, что применение фуллерена C60 и мази «Д-пантенол» подавляло экспрессию $IL1\alpha$ относительно группы «самозаживание» (Рис. 77А). В то же время разницы в уровне экспрессии $IL1\beta$ между группами «фуллерен C60» и «Д-пантенол» не наблюдалось (Рис. 77Б). Таким образом, понижая экспрессию провоспалительных цитокинов $TNF\alpha$ и $IL1\alpha$, фуллерен C60, по-видимому, способствует подавлению воспалительного процесса в области поражения.

3.4. Изучение фолликулостимулирующей активности водного раствора фуллерена C60

3.4.1. Визуальная оценка способности фуллерена C60 индуцировать рост волос

В работе оценивалось непосредственное действие фуллерена C60 на функциональную активность ВФ. Перед забором материала было проведено фотографирование области исследования как у мышей линии Balb/c, так и линии Nu/nu. Фотографии изображены на рисунках 78 и 79. На рисунке 78 показана исследуемая область спины мышей линии Balb/c после проведения всей серии подкожных и накожных введений фуллерена C60. Показано, что в опытных группах, где животные получали фуллерен C60, наблюдался более интенсивный рост волос по сравнению с контрольными группами, которым вводили PBS. Следует отметить, что наиболее интенсивный рост волос отмечался у мышей, которым фуллерен C60 вводили подкожно.

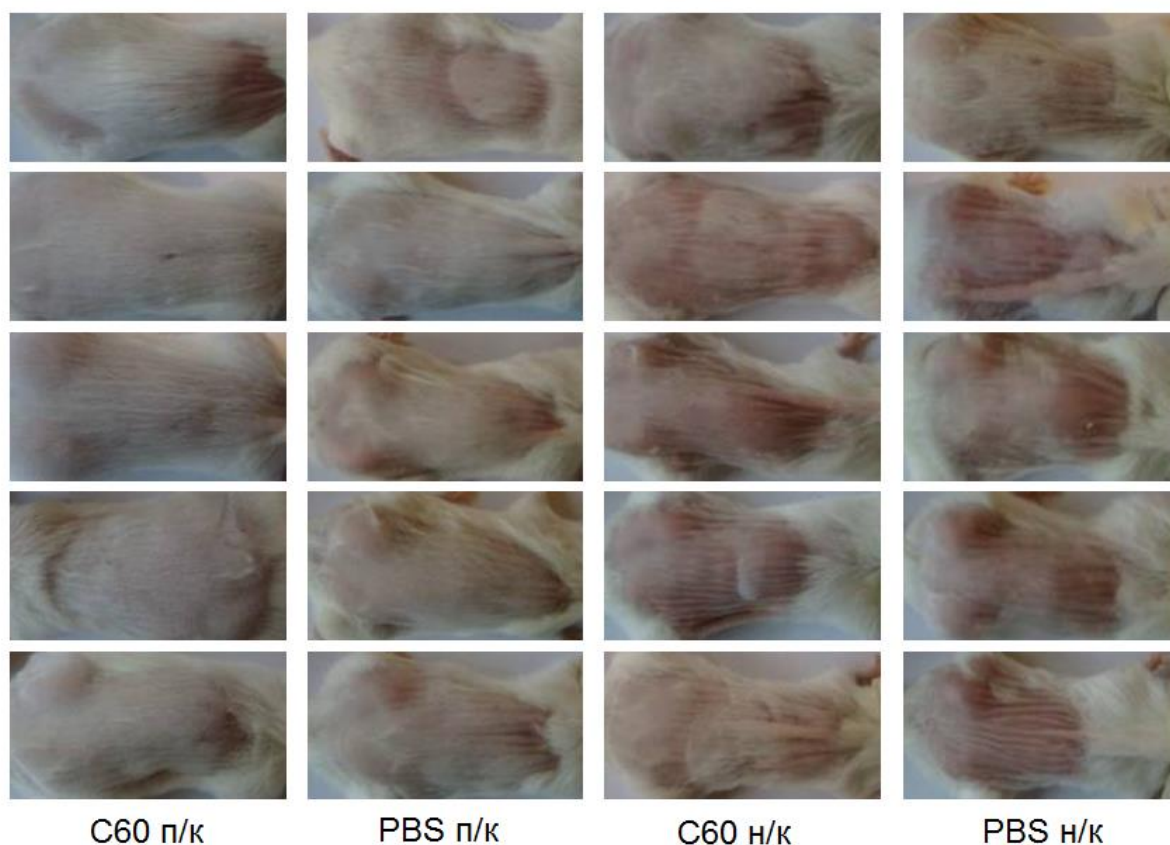


Рис. 78. Фото мышей линии Balb/c перед забором материала. Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

На рисунке 79 показана исследуемая область спины мышей линии Nu/nu после проведения всей серии подкожных введений. Видно, что в опытной группе, которая получала фуллерен С60, интенсивность роста волос заметно выше по сравнению с контрольной.

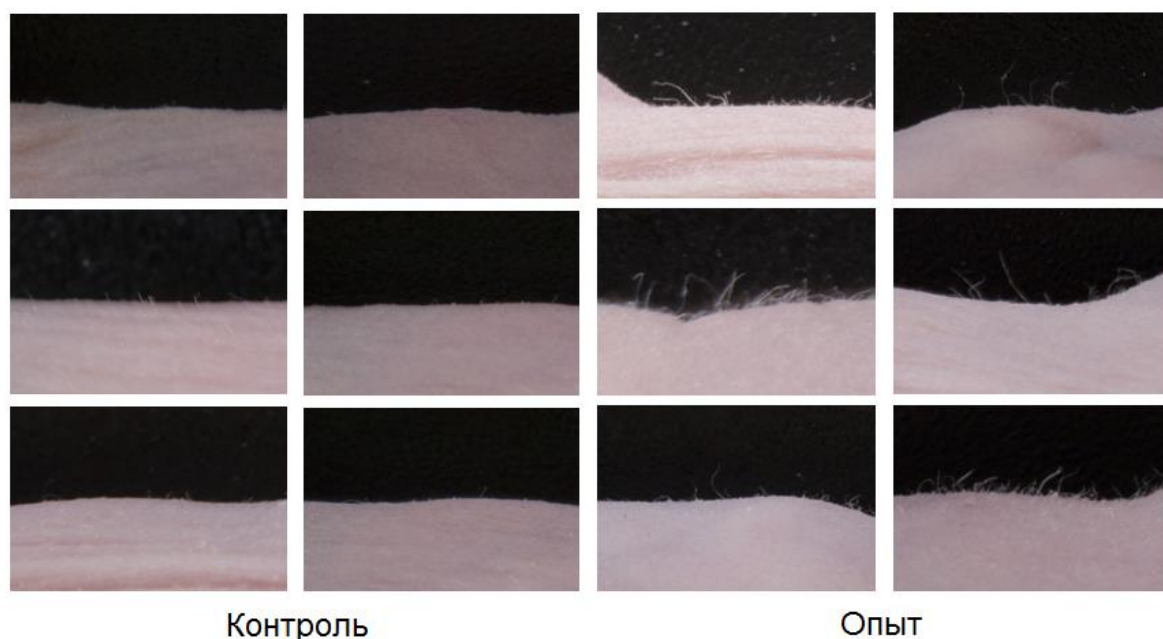


Рис. 79. Фото мышей линии Nu/nu перед забором материала.

Таким образом, по итогам проведения визуального анализа, можно сделать заключение о том, что стимуляция роста волос после введения фуллерена очевидна.

3.4.2. Анализ гистологических срезов

Результаты гистологического анализа у мышей линии Balb/c показывают, что качественных и количественных различий, связанных с действием препарата, между исследуемыми и контрольными группами обнаружено не было. В группе «С60 н/к» обнаружена небольшая полиморфноядерная инфильтрация дермы без её утолщения. Все волосяные фолликулы находятся в стадии анаген. Стадия роста волос анаген выражено преобладает для всех животных во всех исследуемых группах, по этой причине различия в группах, получавших исследуемый препарат, от групп контроля обнаружить не представляется возможным.

Результаты гистологического исследования у мышей линии Nu/nu представлены на рисунке 80.

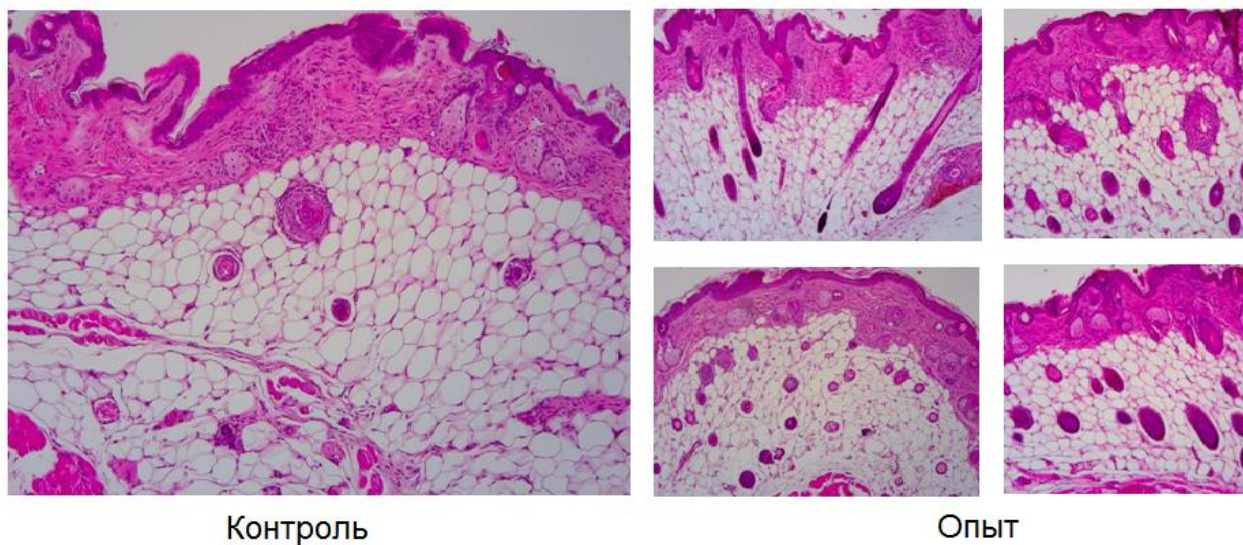


Рис. 80. Результаты гистологического исследования у мышей линии Nu/nu. Окраска гематоксилином-эозином (x200).

Видно, что в опытной группе, которая получала фуллерен подкожно, количество ВФ заметно больше по сравнению с контрольной группой, которой вводили PBS. Подсчет ВФ на мм², представленный на рисунке 81, выявил достоверность различия между опытной и контрольной группами.

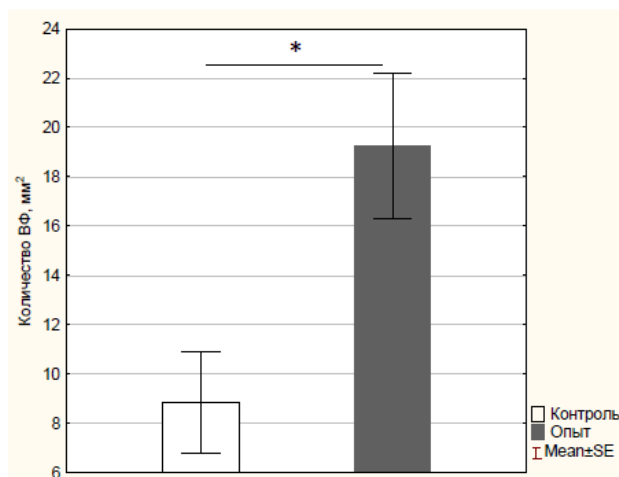


Рис. 81. Подсчет количества волосяных фолликулов на гистологическом срезе кожного покрова в эксперименте на мышах линии Nu/nu. Примечание: * - $p < 0.05$.

В целом, результаты гистологического исследования показали, что адекватно оценить способность фуллерена стимулировать рост волос удалось только у мышей линии Nu/nu, где выявлен явный положительный эффект.

3.4.3. Изучение экспрессии генов, вовлеченных в развитие и функционирование волосяных фолликулов

Экспрессию генов анализировали методом ПЦР-РВ. Сравнительный анализ мРНК белка *Wnt10b* в коже мышей линии Balb/c показал достоверное повышение экспрессии в группах, которым вводили фуллерен С60 как подкожно, так и наочно. Следует отметить, экспрессия *Wnt10b* была выше при подкожном способе введения по сравнению с наочным, что отражено на рисунке 82А.

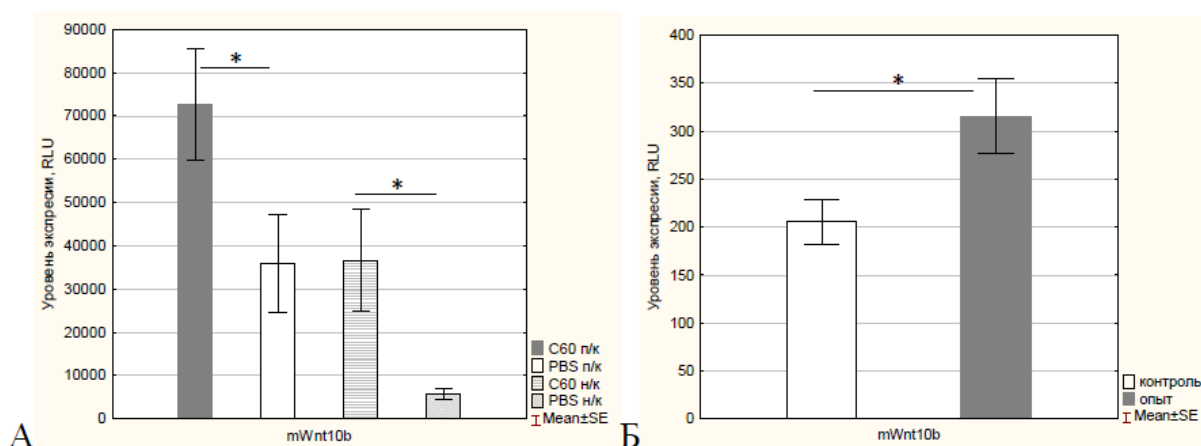


Рис. 82. Уровень мРНК *Wnt10b* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: * - $p < 0.05$, п/к – подкожный метод введения, н/к – наочный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Анализ мРНК *Wnt10b* у мышей линии Nu/nu также показал достоверное повышение экспрессии данного гена в опытной группе (в 1,5 раза выше), получавшей фуллерен С60 подкожно (Рис. 82Б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что молекулы С60 повышают экспрессию гена *Wnt10b*, как при подкожном, так и при

накожном способах введения у мышей обеих линий, что может свидетельствовать о запуске Wnt-сигнального пути.

Также в рамках данной работы была проанализирована экспрессия мРНК гена *DKK1*, являющегося ингибитором *Wnt10b*. Результаты представлены на рисунке 83.

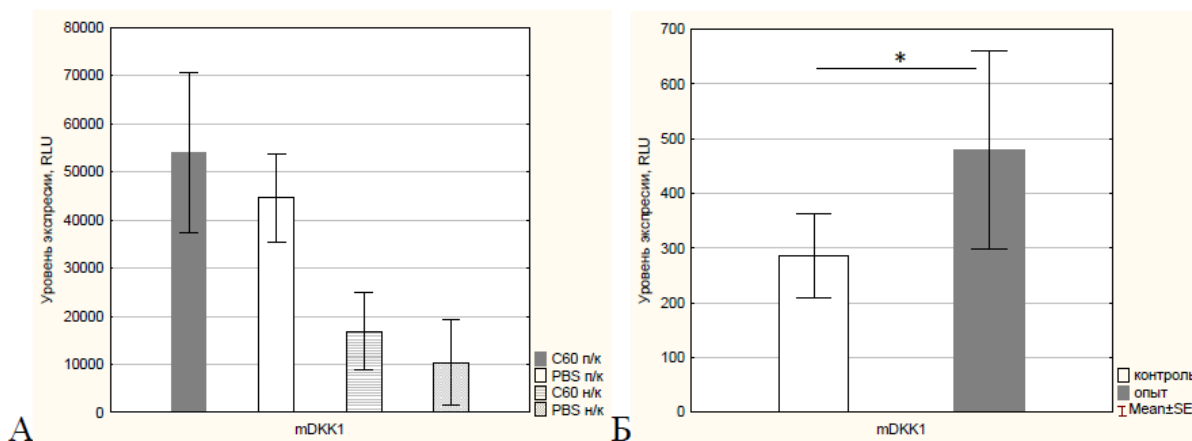


Рис. 83. Уровень мРНК *DKK1* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: * - $p = 0.35$, п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Показано, что уровень экспрессии *DKK1* у мышей линии Balb/c и Nu/nu, получавших фуллерен, был увеличен по сравнению с контрольными группами. При этом достоверной разницы выявлено не было. Однако, поскольку ген *DKK1* является регулятором активности *Wnt10b*, то повышение его экспрессии является еще одним свидетельством активации Wnt-сигнального пути.

Kwack с соавторами показали, что *DKK1* является ДГТ-регуляторным геном и отвечает за повышение активности гена *Srd5a2*, увеличение экспрессии которого может приводить к выпадению волос [Kwack et al., 2008]. На рисунке 84А показано, что у опытной группы мышей Balb/c при подкожном введении фуллерена С60 выявлено достоверное увеличение экспрессии *Srd5a2*.

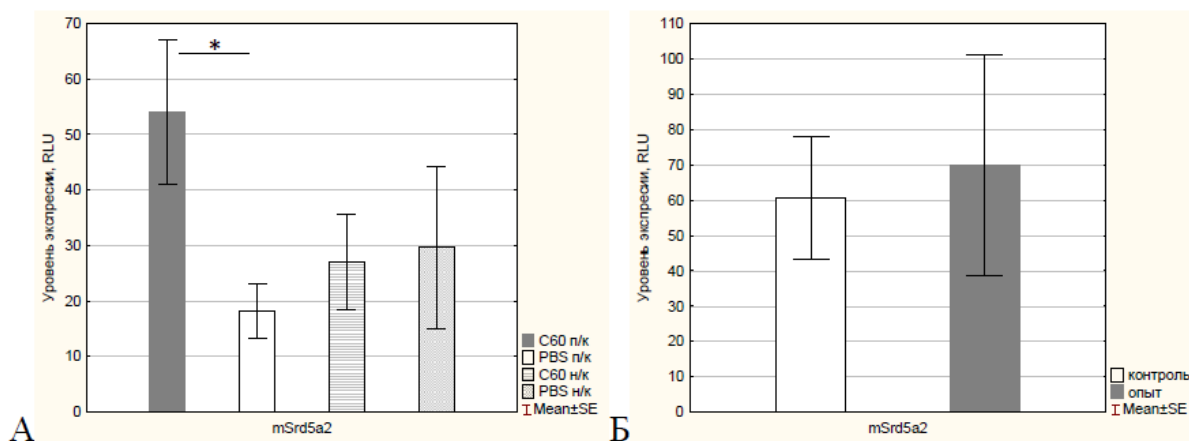


Рис. 84. Уровень мРНК *Srd5a2* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: * - $p < 0.05$, п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Следует отметить, что к выпадению волос такое повышение экспрессии не приводило. В целом, полученные данные согласуются с анализом экспрессии *DKK1*, который является стимулятором активности 5-альфа редуктазы. Таким образом, увеличение экспрессии *Srd5a2* на фоне повышенной выработки *DKK1* выглядит вполне логично и можно предположить, что увеличение экспрессии этих генов носит исключительно регуляторный характер.

При накожном применении фуллерена разницы между опытной и контрольной группой не было.

У мышей Nu/nu, получавших фуллерен С60, была показана только слабая тенденция к увеличению экспрессии *Srd5a2* (Рис. 84Б).

Еще одним фактором, участвующим в патогенезе алопеций является *TNF α* , увеличение экспрессии которого негативно влияет на рост волос. Даже незначительное количество этого цитокина приводит к дистрофическим изменениям анагеновых волос, нарушению функционирования клеток в перибульбарной зоне волосяного фолликула, а также нарушению кератинизации в перикортикальной зоне. На рисунке 85А показана экспрессия гена *TNF α* у мышей линии Balb/c.

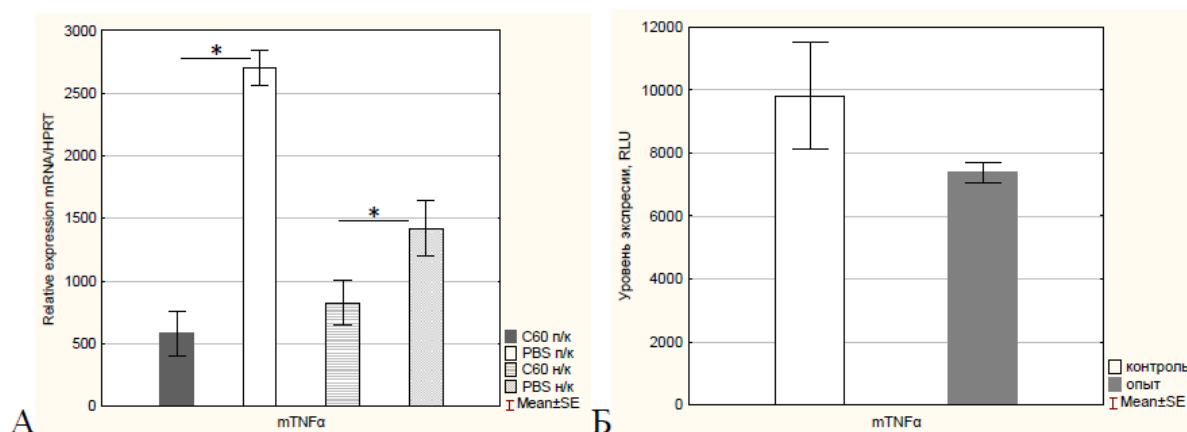


Рис. 85. Уровень мРНК *TNFα* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: * - $p < 0.05$, п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Показано, что как при накожном, так и при подкожном способах введения фуллерена С60, экспрессия *TNFα* достоверно понижается относительно соответствующих контрольных групп, получавших PBS. У мышей Nu/nu такой явной разницы между опытом и контролем выявлено не было, однако тенденция к снижению экспрессии *TNFα* присутствовала (Рис. 85Б).

Таким образом, понижение экспрессии *TNFα* при введении фуллерена может приводить к нивелированию негативного воздействия на волосяные фолликулы.

Одним из ранних генов, участвующих в морфогенезе волосяного фолликула является ген *Shh*. На рисунке 86А показано изменение его экспрессии при накожном и подкожном введении фуллерена С60 мышам линии Balb/c.

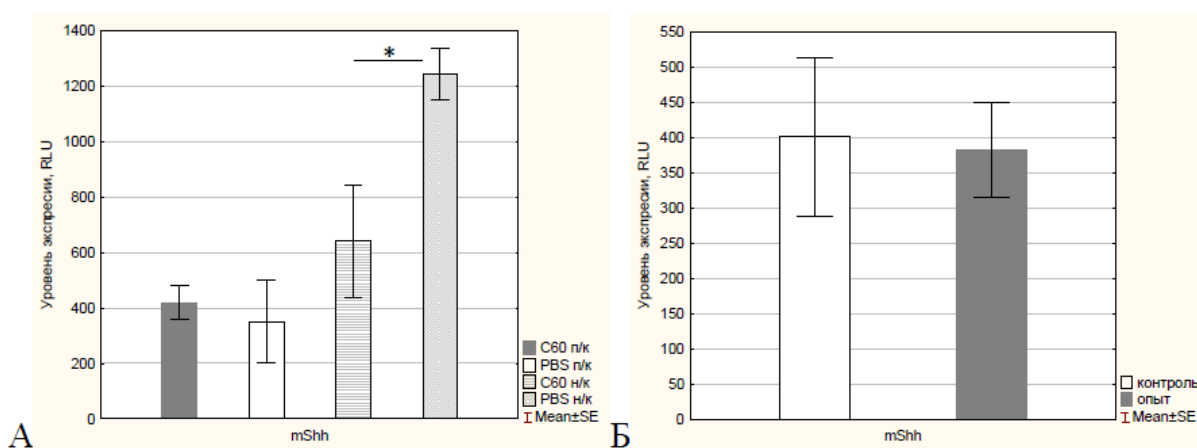


Рис. 86. Уровень мРНК *Shh* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: * - $p < 0.05$, п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, C60 – фуллерен C60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Показано, что в кожной ткани контрольной группы мышей Balb/c уровень экспрессии гена *Shh* был понижен. Следует отметить, что при подкожном введении фуллерена разницы между опытной и контрольной группами мышей как линии Balb/c, так и линии Nu/nu не наблюдалось (Рис. 86).

Отсутствие разницы можно объяснить тем, что *Shh* является ранним геном, экспрессируемым в плакоде и его экспрессия наблюдается только на стадии формирования дермальных сосочков, которые служат основой для развития ВФ. Забор же экспериментального материала происходил уже на стадии роста волоса, когда вполне возможно, что уровень экспрессии гена уже не был выражен. Снижение его экспрессии при накожном введении фуллерена, по-видимому, связано с меньшей эффективностью данного способа введения в целом.

Согласно недавним исследованиям стало известно, что у пациентов с алопецией понижена экспрессия гена *Foxp3* [Riddle et al., 1993]. Вполне возможно, что он стимулирует рост ВФ. В данной работе мы изучили изменение экспрессии *Foxp3* при накожном и подкожном способах введения фуллерена (Рис. 87).

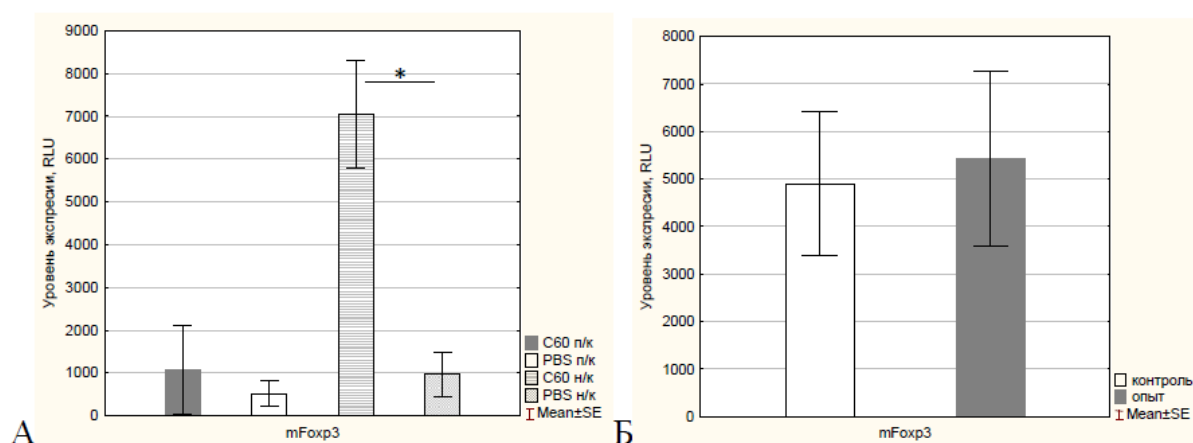


Рис. 87. Уровень мРНК *Foxp3* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: * - $p < 0.05$, п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Показано, что при подкожном введении фуллерена разницы между опытной и контрольной группами как в эксперименте на мышах линии Balb/c, так и на мышах линии Nu/nu не наблюдалось. На рисунке 87А видно, что экспрессия гена *Foxp3* достоверно повышена только при накожных аппликациях фуллерена, что может быть связано с наличием посттравматического неспецифического воспаления на месте фиксации повязок.

Далее было изучено действие фуллерена С60 на выработку таких генов, как *IL1a* и *IL1b*, которые, согласно литературным данным, подавляют рост ВФ. На рисунках 88 и 89 представлена экспрессия этих генов.

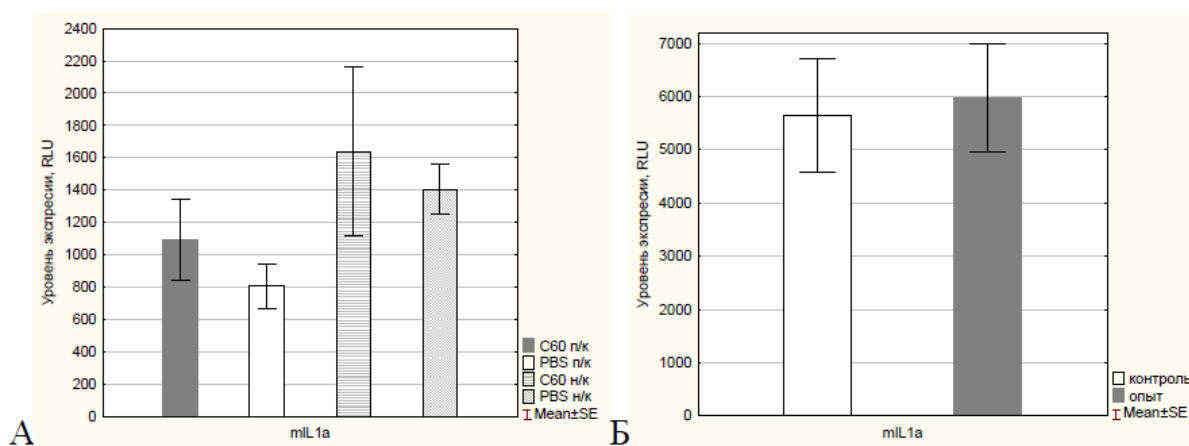


Рис. 88. Уровень мРНК *IL1a* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

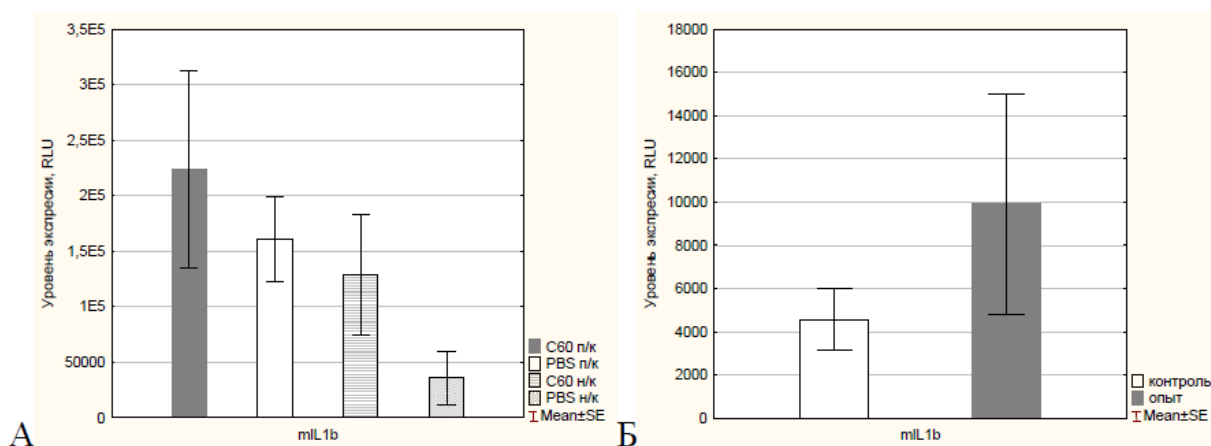


Рис. 89. Уровень мРНК *IL1b* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Показано, что достоверной разницы между опытными и контрольными группами мышей линии Nu/nu по уровню экспрессии *IL1a* не выявлено (Рис. 88Б), однако присутствуют тенденции к увеличению экспрессии в опытной группе у мышей линии Balb/c (Рис. 88А). Анализируя экспрессию гена *IL1b*, можно говорить только о тенденции ее увеличения у животных, получавших фуллерен. Достоверной разницы между опытными и контрольными группами мышей не выявлено (Рис. 89).

Антагонистом *IL1a* и *IL1b* является ген *IL1RN*. Его экспрессия представлена на рисунке 90. Видно, что различий между опытными и контрольными группами не наблюдалось, не зависимо ни от способа введения фуллера, ни от линии мышей.

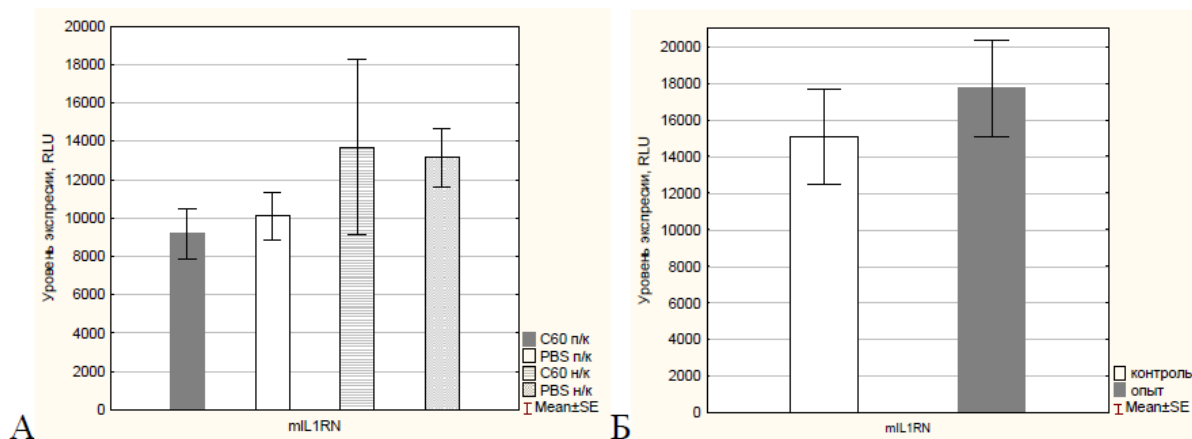


Рис. 90. Уровень мРНК *IL1RN* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Таким образом, при введении фуллера С60 была выявлена только тенденция к увеличению уровня экспрессии генов *IL1a* и *b* как у мышей линии Balb/c, так и линии Nu/nu. При этом уровень антагониста этих генов практически не менялся. Следовательно, можно сделать вывод о том, что фуллерен не оказывает заметного влияния на экспрессию указанных генов.

Далее нами был проанализирован ряд факторов, ответственных за ангиогенез, в том числе в области ВФ. Одним из основных таких факторов является *VEGF-A*. На рисунке 91 представлена его экспрессия.

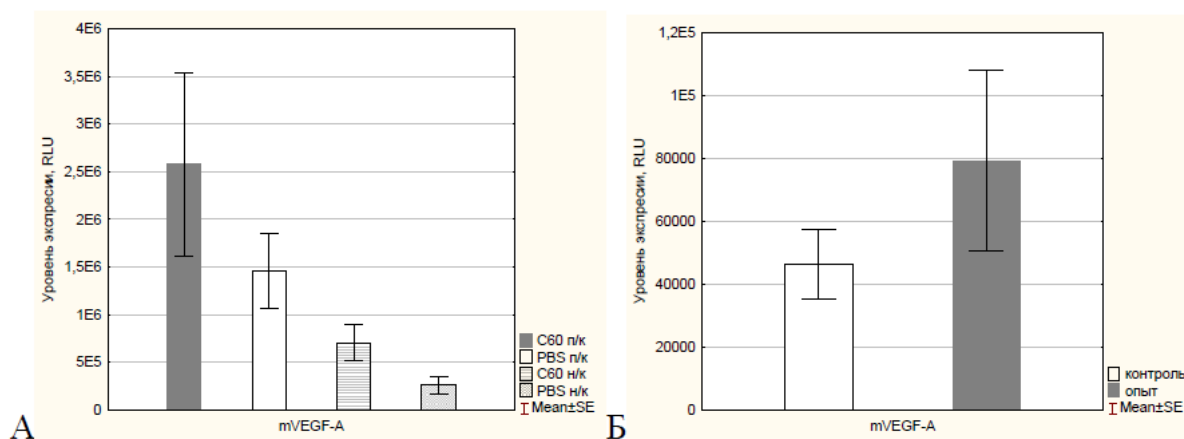


Рис. 91. Уровень мРНК *VEGF-A* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Видно, что достоверной разницы между опытными и контрольными группами мышей по уровню экспрессии *VEGF-A* не выявлено ни у мышей Balb/c, ни у Nu/nu, однако присутствуют явные тенденции к увеличению экспрессии в группах, получавших фуллерен С60. Таким образом, введение фуллерена, по-видимому, активирует выработку *VEGF-A*, что говорит об усилении кровообращения в области ВФ.

Наряду с *VEGF-A*, мы проанализировали экспрессию фактора *FGFb*, который считается более мощным стимулятором ангиогенеза. По результатам исследования, представленным на рисунке 92, видно, что достоверной разницы между опытными и контрольными группами мышей по уровню экспрессии *FGFb* не выявлено. Однако присутствуют явные тенденции к увеличению экспрессии у мышей обеих линий, получавших фуллерен подкожно.

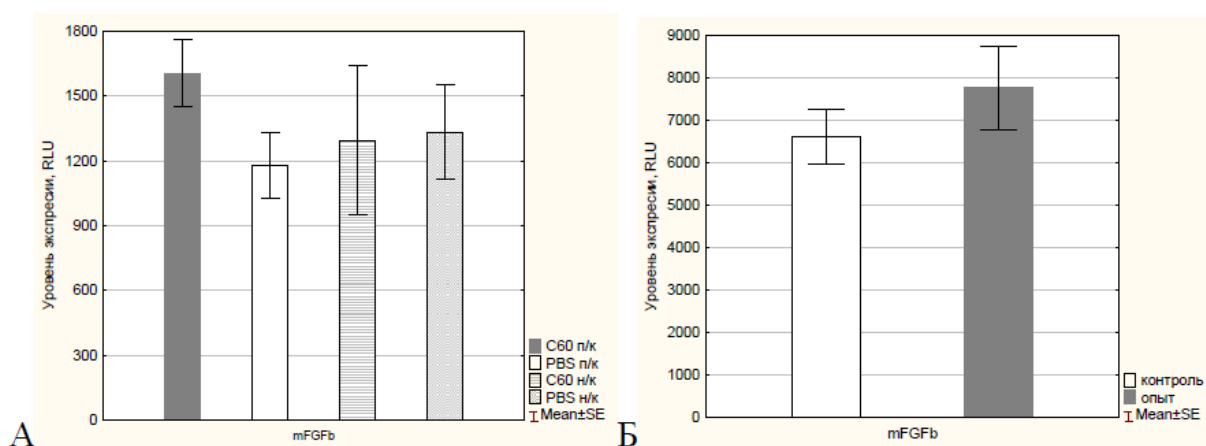


Рис. 92. Уровень мРНК FGFb в кожной ткани мышей Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Еще одним геном, участвующим в процессе ангиогенеза является *EGF*. Показано, что при подкожном введении фуллерена мышам обеих линий уровень экспрессии *EGF* достоверно повышался (Рис. 93). При накожных аппликациях фуллерена достоверной разницы между опытной и контрольной группами выявлено не было.

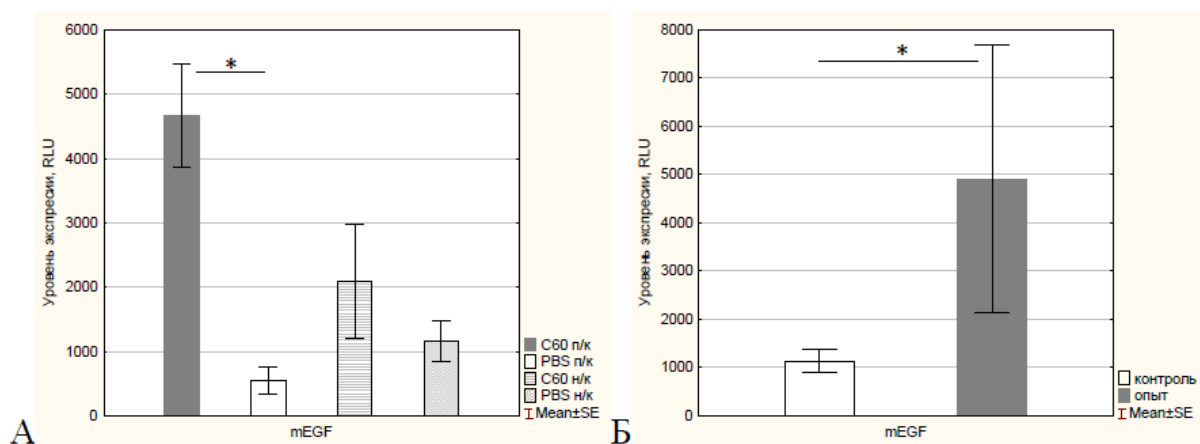


Рис. 93. Уровень мРНК *EGF* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: * - $p < 0.05$, п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Антагонистом гена *EGF* является ген *TGFβ1*, уровень экспрессии которого приведен на рисунке 94.

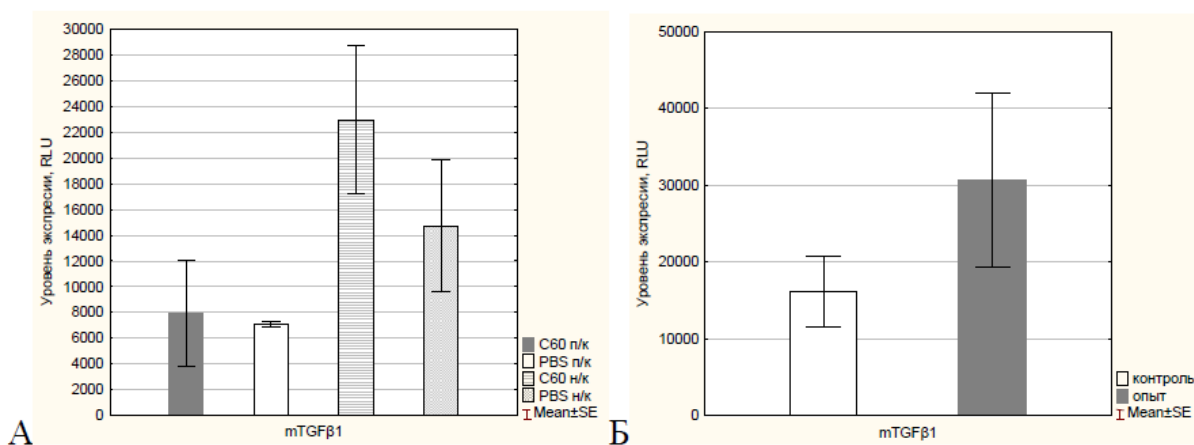


Рис. 94. Уровень мРНК *TGFβ1* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер.

На графике видно, что разницы между контрольной и опытной группами при подкожном способе введения у мышей Balb/c не выявлено, а в опытной группе при накожных аппликациях фуллерена замечена тенденция к увеличению экспрессии гена *TGFβ1* (Рис. 94А). При подкожном введении фуллерена у мышей Nu/nu наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии гена *TGFβ1* (Рис. 94Б).

Поскольку достоверной разницы между группами, получавшими фуллерен и соответствующими контрольными группами, которым вводили PBS, не наблюдалось, можно сделать вывод о том, что фуллерен не влияет на экспрессию гена *TGFβ1*, а тенденции к увеличению экспрессии согласуются с данными по экспрессии *EGF*.

Таким образом, анализ экспрессии факторов, участвующих в процессе ангиогенеза, позволяет сделать предположение о том, что достоверное повышение *EGF*, а также тенденция к увеличению экспрессии *VEGF-A* и *FGFb* генов говорит о наличии у фуллерена способности активировать ангиогенез в области развития ВФ.

В литературе описано, что выработку *VEGF-A*, тенденция к увеличению которой была зафиксирована у животных, получавших ВРФ, может стимулировать аденозин за счет активации аденозиновых рецепторов (A2AAR или Adora2A) клеточной поверхности [Hashimoto et al., 1994; Takagi et al., 1996]. В рамках текущих исследований было интересно оценить уровень экспрессии данных рецепторов (Рис. 95).

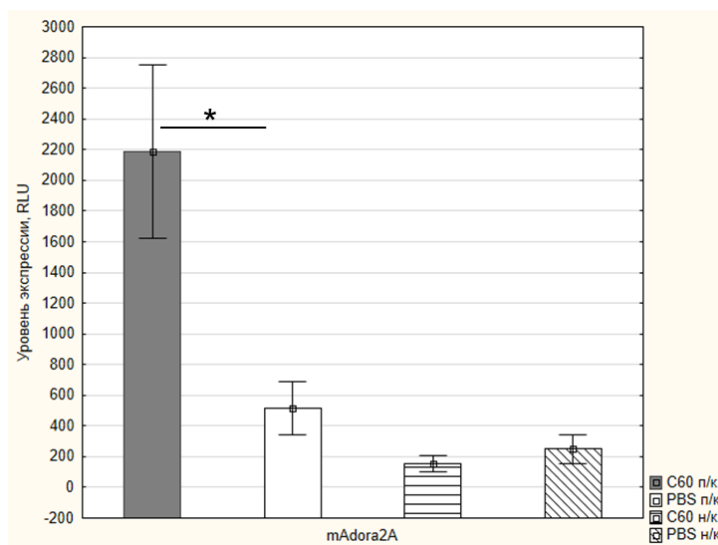


Рис. 95. Уровень мРНК *Adora2A* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, PBS – фосфатно-солевой буфер. $p < 0,05$

Было показано, что уровень экспрессии гена данного рецептора увеличивается при подкожном введении водного раствора фуллерена С60. Показанный результат подтверждает способность фуллерена С60 стимулировать выработку факторов ангиогенеза, которые участвуют в росте и развитии фолосяных фолликулов.

3.4.4. Изучение характера роста волос и анализ эффекта стимуляции роста после отмены введения ВРФ

Представленные выше эксперименты, показавшие способность ВРФ стимулировать рост волос, дали основание для проведения дальнейших исследований в данной области. Важным недостатком существующих средств для роста волос, в частности стандартно используемых для терапии алопеции препаратов на основе меноксидила, является отмена уже имеющегося эффекта практически сразу после прекращения лечения. Ввиду оценки длительности сохранения эффекта от введения ВРФ, были проведены исследования, подразумевавшие отмену введения ВРФ. На первом этапе эксперимент был построен на моделировании длительного введения ВРФ с целью оценки визуального эффекта. Так, мыши линии Nu/nu получали п/к инъекции ВРФ в дозе 3 мкг/мышь через день в течение 33 дней. Далее следовал период отмены, и на 51-й день было решено провести однократное введение ВРФ, после чего последовал повторный период отмены до завершающего 78-ого дня эксперимента. Результаты визуального осмотра животных представлены на рисунке 96.



Рис. 96. Интенсивность роста волос у мышей линии Nu/pu при п/к введении ВРФ.

Мышам Nu/pu вводили ВРФ п/к (3мкг/мышь) (А, Б, Г, Д, Ж, З, К, Л) или PBS (В, Е, И, М). Фотографирование мышей проводилось на 22-й (А, Б, В), 37-й (Г, Д, Е), 40-й (Ж, З, И) и 79-й (К, Л, М) дни эксперимента.

Результаты выше описанного эксперимента показали, что уже на 14-й день после введения ВРФ (с интервалом через день) у мышей Nu/pu был зафиксирован рост волос. Длина волосяного стержня была небольшой и составляла около 0,5-1мм. На представленных фотографиях видно, что на

22-й день введений ВРФ у мышей визуально заметен некоторый волосной покров. Длина стержня волоса составляла примерно 1-2 мм. Далее, на 37-й день введения у мышей появился уже достаточно выраженный шерстяной покров в области введения ВРФ и близ нее. Длина стержня волоса составляла порядка 2-3мм. На 79-й же день эксперимента волосной покров оставался преимущественно в области введения ВРФ, причем остановки роста шерсти замечено не было. Таким образом, к концу эксперимента на 79-й день длина волосного стержня была уже 3-4мм, а толщина видимых волос визуально была близка к таковой для нормального (не пушкового) шерстяного покрова. Таким образом, было показано, что ВРФ способен стимулировать рост волос. Важным результатом является также то, что данный эффект сохраняется даже после отмены введения препарата.

3.5. Изучение противовирусной активности водного раствора фуллерена C₆₀

Исследование проводилось на базе Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи.

3.5.1. Цитотоксичность соединений

При определении цитотоксичности использовали ВРФ (или водная дисперсия фуллерена C₆₀, dnC₆₀) в концентрациях от 125 до 1000 мкг/мл и 3 исследуемых производных фуллерена C₆₀ в концентрациях от 62,5 до 500 мкг/мл. Анализ данных показал, что ВРФ и аминокислотные производные C₆₀ в изученных концентрациях не обладали токсичностью в отношении клеток линии Vero. Рассчитанные графически значения ЦД₅₀ представлены на рисунке 97. Они показали, что наименьшую цитотоксичность проявляет ВРФ (1240±30 мкг/мл), сопоставимую с ацикловиром (АЦВ) – 1000±5 мкг/мл (p>0.05).

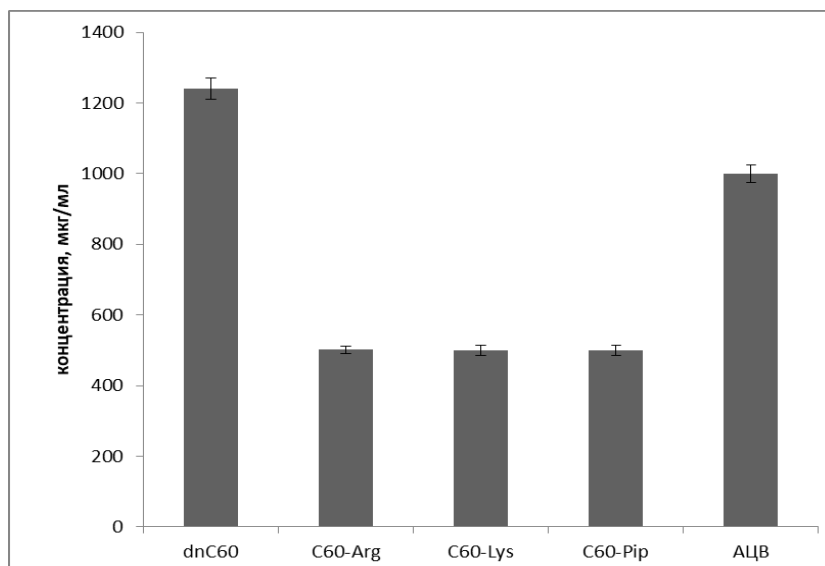


Рис. 97. Цитотоксичность исследуемых соединений в отношении клеток Vero.

По горизонтали – обозначения соединений; по вертикали – концентрация соединений, соответствующая 50%-ой цитотоксической дозе (ЦД50), $\text{mean} \pm \text{SD}$, мкг/мл.

3.5.2. Противовирусные свойства соединений *in vitro*

Анти-ВПГ1 активность соединений изучали, используя концентрации соединений 0.1 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл и 3 варианта заражения вирусом клеток Vero: после внесения соединений, до внесения соединений и при внесении вируса, предварительно инкубированного с соединениями. Результаты представлены на рисунке 98. Показано, что все исследуемые соединения ингибировали ВПГ1-инфекцию при внесении их до заражения вирусом. При внесении соединений после заражения статистически значимое ингибирование ВПГ1-инфекции было установлено для ВРФ ($P < 0,05$) и для АЦВ ($P < 0,05$). Анализ вирулицидной активности исследуемых соединений показал, что ВРФ практически полностью инактивировал ВПГ1 – снижение бляшкообразования составило $98,2 \pm 1,8\%$.

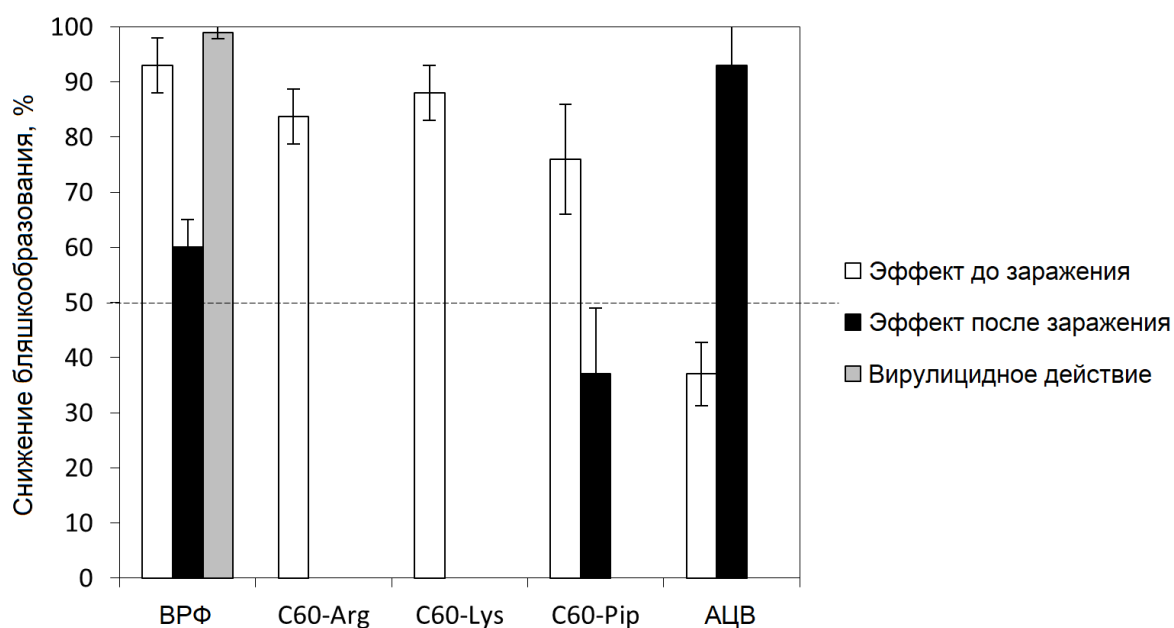


Рис. 98. Подавление ВПГ1 инфекции под действием тестируемых соединений *in vitro*. По горизонтали – обозначения соединений; по вертикали – ингибирование бляшкообразования ВПГ1, %. Белые столбики – обработка клеток соединениями до заражения вирусом; черные столбики – после заражения; серый столбик – обработка клеток смесью соединения с вирусом, после предварительной коинкубации. mean±SD, %.

Для вычисления значения ИД50 строили графики зависимости степени ингибирования вирусной инфекции от концентрации веществ. Рассчитанные значения ИД50 (IC₅₀) и ХТИ (индекс селективности – SI) представлены в таблице 27.

Табл. 27. Сравнительная оценка противовирусных свойств исследуемых соединений в отношении ВПГ1-инфекции клеток *in vitro*.

Соединение	CC ₅₀ *	Анализ					
		До заражения		После заражения		Вируцидность	
		IC ₅₀ **	SI ***	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
ВРФ	1240±5	5,8±0,15	213±5,5	9,4±0,15	131±2,1	0,73±0,15	1771±312
C ₆₀ -Arg	501±1,7	5,8±0,09	86±1,3	- [#]	-	-	-
C ₆₀ -Lys	500±3,1	4,7±1,2	104±1,3	-	-	40,1±0,1	12,5±0,15
C ₆₀ -Pip	500±5	3,5±0,1	143±4	13,5±0,5	37±1,45	-	-
АЦВ	1000±5	7,2±0,2	139±3,9	1,3±06	908±483	25±0,3	40±1,1

Примечание: * – 50% цитотоксическая концентрация, mean±SD, мкг/мл; ** – 50% ингибирующая концентрация, mean±SD, мкг/мл; *** – селективный индекс CC_{50}/IC_{50} ; # – ниже предела обнаружения; выделено жирным шрифтом – $SI>100$.

Результаты, представленные в таблице 27, показывают, что соединения ВРФ, C60-Lys, и C60-Pip подавляют развитие вирусной инфекции при добавлении до заражения ВПГ1 ($SI>100$). В других условиях заражения три изученных аминокислотных производных показали слабую или не показали анти-ВПГ1 активность. В то же время соединение ВРФ проявило высокую активность во всех вариантах изучения противовирусных свойств в отношении ВПГ1-инфекции.

3.5.3. Терапевтические свойства *in vivo*

Сравнительное изучение лечебных свойств водной дисперсии ВРФ и производного C60-Pip проводили на модели кожной ВПГ1-инфекции (Cutaneous HSV1 infection in mice). Соединения наносили местно (topically) в места заражения, в качестве положительного контроля использовали мазь, содержащую 5% АЦВ. Результаты лечения анализировали по степени подавления ВПГ-специфического поражения кожи и представляли в баллах. Фотографии, представленные на рисунке 99 показывают, какие клинические проявления соответствовали определенным баллам.



а – 0 (без изменений), б – 1 (покраснение, набухание), в – 2 (единичные эрозии), г – 3 (многочисленные эрозии), д – 4 (большое эрозивное изъязвление).

Рис. 99. Клинические проявления кожной ВПГ1-инфекции у инфицированных мышей, оцененные в баллах.

Последствия заболевания, соответствующие 5 баллам (паралич задних конечностей, потеря более 20% веса, агрессивность) и 6 баллам (смерть), на рисунке 99 не представлены.

Анализ клинических проявлений герпетической инфекции в динамике показал, что у животных контрольной группы 4 максимальные герпетические поражения кожи выявлены на 3 сут и 6 сут ($3,85 \pm 0,27$ балла и $3,75 \pm 0,2$ балла соответственно). Гибель 2/8 (25%) животных наблюдали на 5-7 сут, у оставшихся выживших мышей к 10 сут были единичные эрозии ($2 \pm 0,1$ балла). В группах 1-3 все животные были живы на протяжении всего срока наблюдения. Наименьшие поражения кожи выявлены у животных группы 1, обработанных ВРФ, и группы 3, обработанных АЦВ, выздоровление наблюдали на 8-е сут и 9-е сут после заражения соответственно. У мышей группы 2, обработанных производным фуллерена C60-Pip, клинические признаки ВПГ1-инфекции проявлялись на протяжении всего срока наблюдения приблизительно на одинаковом уровне, и выздоровление не наступило до конца срока наблюдения. У животных групп 1 и 2, начиная с 3-х сут лечения и до конца периода наблюдения, было установлено статистически значимое уменьшение признаков герпетического поражения кожи по сравнению с группой 4 – контроля, $P < 0,05$ (Рис. 100).

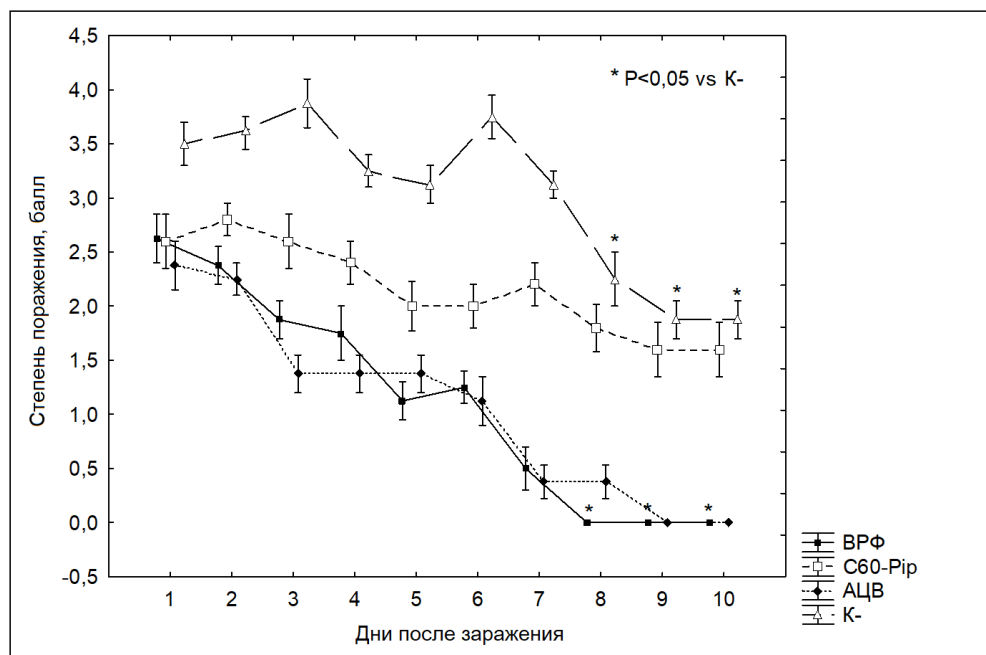


Рис. 100. Изменения клинических проявлений ВПГ1-инфекции у мышей в результате лечения тестируемыми соединениями.

По горизонтали – продолжительность инфекционного процесса, дни после заражения; по вертикали – клинические проявления ВПГ-инфекции, в баллах, $\text{mean} \pm \text{SD}$.

Средние значения баллов в каждой группе, суммированные за весь период наблюдения, приведены на рисунке 101. В результате лечения статистически значимое снижение герпетического поражения кожи по сравнению с контролем (3.1 ± 0.3 балла) наблюдали в группе 1 (ВРФ) и в группе 3 (АЦВ), средние значения составляли 1.1 ± 0.3 балла и 0.8 ± 0.5 балла соответственно ($P < 0,05$).

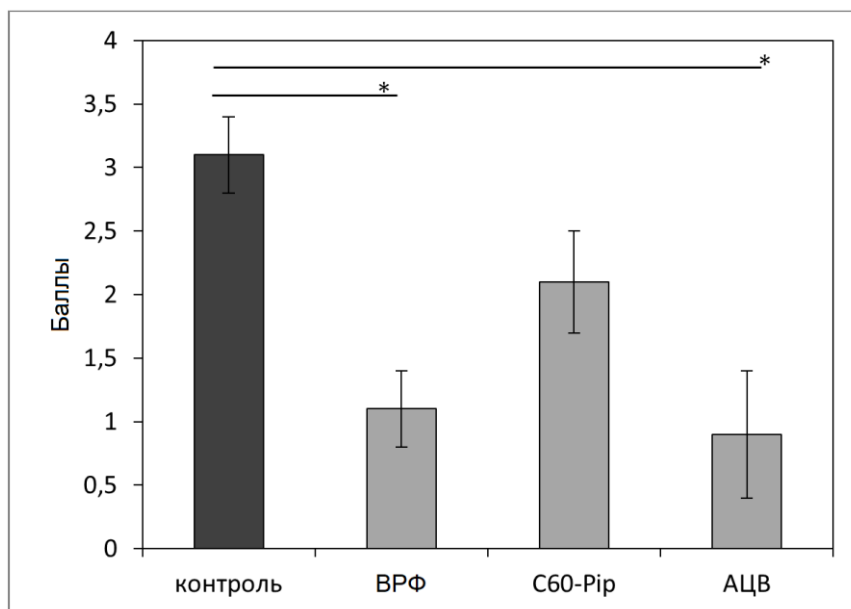


Рис. 101. Оценка лечебных свойств изученных соединений по снижению клинических проявлений ВПГ1-инфекции *in vivo*. По горизонтали – обозначения тестируемых соединений; по вертикали – клинические проявления, в баллах, $\text{mean} \pm \text{SD}$. *Различие статистически значимо: $p < 0.05$.

3.5.4. Анализ активности противовирусных антител

Анализ активности противовирусных антител в сыворотках мышей проводили на 10 сут после заражения. Было установлено (Рис. 102), что титр анти-ВПГ1 в сыворотках крови зараженных, но выживших мышей контрольной группы составил 1:1600. У погибших зараженных животных

титр АТ к ВПГ1 составил 1:100, что значимо не отличалось от уровня АТ в сыворотках незараженных животных. В сыворотках животных, обработанных ВРФ, активность АТ соответствовала титру 1:800, обработанных C60-Pip – 1:200, АЦВ – 1:400.

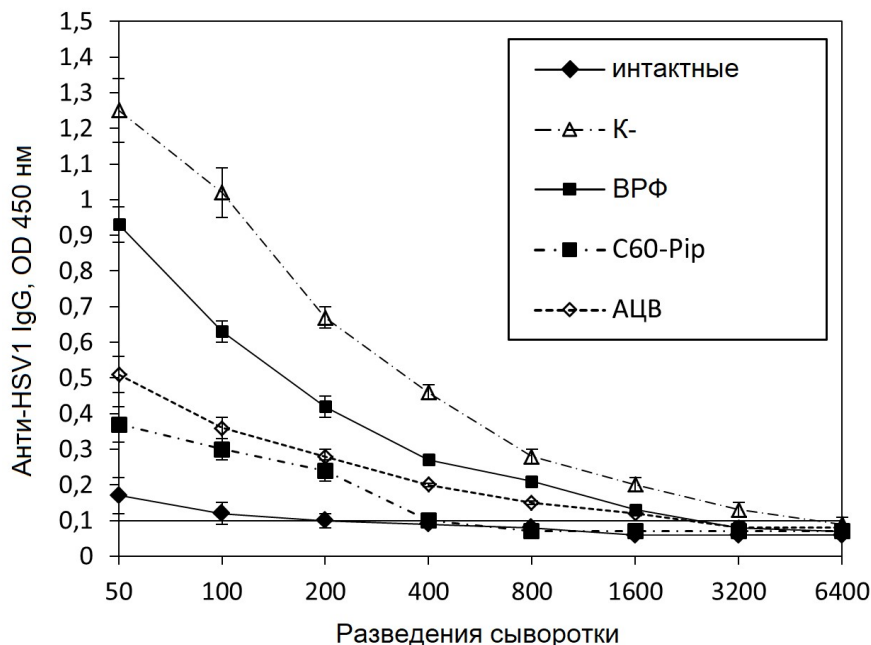


Рис. 102. Активность анти-ВПГ1 антител в сыворотках зараженных мышей после обработки тестируемыми соединениями. По горизонтали – обратные разведения сывороток крови; по вертикали – показатели активности АТ в ИФА, ОП (OD) при 450 nm. Сплошная линия соответствует фоновому значению ОП сывороток крови нормальных мышей.

3.6. Разработка гипотез механизма действия фуллерена C60

3.6.1. «Об антиоксидантной активности фуллерена C60»

3.6.1.1. Изучение антиоксидантной активности водного раствора фуллерена C₆₀ в NBT-тесте

На первом этапе исследований определение способности фуллерена и его производных ингибировать окислительный взрыв в клетках иммунной системы проводилось посредством количественного NBT-теста. Уровень стимуляции зависел от времени инкубации и от использованного ЛПС (выделенный или коммерчески доступный). Для выбора оптимальной

стимулирующей концентрации ЛПС, была изучена степень развития окислительного стресса в клетках во времени в присутствии различных концентраций ЛПС (в диапазоне 100-0,01 мкг/мл). При отработке методики, было показано, что при увеличении времени инкубации с ЛПС эффективность стимуляции увеличивалась. Для практических измерений было принято решение использовать ЛПС в концентрации 100 нг/мл в течение 4 часов. Результаты оценки антиоксидантной активности фуллерена C₆₀ в форме водного раствора представлены на рисунке 103.

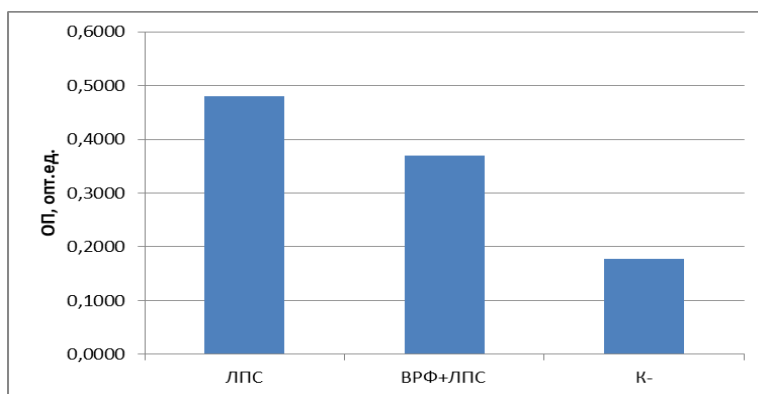


Рис. 103. Антиоксидантная активность водного раствора фуллерена C₆₀

Показано, что по данной методике определения антиоксидантной активности уровень ингибирования окислительного взрыва под действием ВРФ составлял около 25%.

3.6.1.2. Изучение антиоксидантной активности водного раствора фуллерена C₆₀ использованием флуоресцентного сенсора

На следующем этапе исследований, антиоксидантную активность изучали с использованием флуоресцентного сенсора белковой природы HyPer, который позволяет регистрировать динамику изменения внутриклеточной концентрации H₂O₂. Измерение антиоксидантной активности основано на измерении интенсивности флуоресценции клеток, трансфицированных вектором HyPer-cyto при внесении раствора пероксида водорода. В присутствии пероксида водорода увеличивается свопоглощение репортерного белка в области 480-520 нм, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции при длине волны испускания.

При этом максимум поглощения при 485 нм соответствует окисленной форме белка HyPer. Результаты определения антиоксидантной активности фуллерена C60 представлены на рисунке 104.

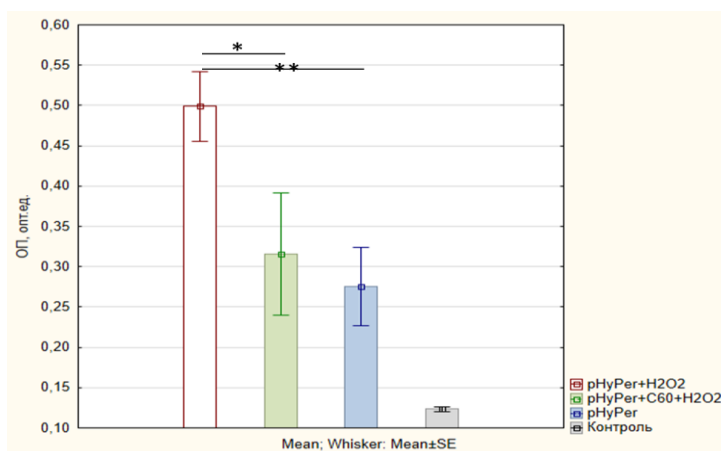


Рис. 104 – Антиоксидантная активность водного раствора фуллерена C60 с использованием флуоресцентного сенсора белковой природы HyPer (*- $p=0,1$; ** - $p<0,05$)

Таким образом, основываясь на разнице флуоресценции клеток в контрольной и экспериментальной группе можно отметить, что мы видим явную тенденцию того, что фуллерен препятствует окислению внутриклеточно локализованного белка. Уровень подавления окислительного процесса составлял 37%.

3.6.2. «О взаимодействии фуллерена C60 с арил-углеводородным рецептором»

3.6.2.1. Анализ взаимодействия молекулы фуллерена C60 с АУР методом молекулярного докинга

Для теоретического обоснования возможности взаимодействия молекулы C60 с АУР, методом гомологичного моделирования была построена структура PAS-B домена арил-гидрокарбонового рецептора AhR человека. Структура была уточнена методом молекулярной динамики, и было показано, что объем внутренней полости недостаточен для такого объемного лиганда, как фуллерен C₆₀. В структуре имеется два канала (E1

и E2), соединяющих внутреннюю полость с внешней поверхностью PAS-B домена. Из траекторий МД длиной 500 нс для комплексов, содержащих молекулу C₆₀ вблизи поверхностных участков этих каналов, следует, что такое связывание с каналом E2 является устойчивым, и приводит к блокировке этого канала. Методом докинга были построены модели связывания 6-формилиндола(3,2-b)-карбазола (FICZ, [2,3]), известного лиганда AhR, со свободным PAS-B и с комплексом PAS-B-C₆₀ (E2). Результаты показывают, что этот лиганд может связываться как во внутренней полости PAS-B, так и в канале E2. Расположение этого лиганда в канале E2 приводит к блокировке канала E2, то есть, к эффекту, аналогичному C₆₀. Следовательно, возможно наблюдение сходных биологических эффектов такого режима связывания для молекул FICZ и C₆₀.

3.6.2.2. *Способность фуллерена C₆₀ влиять на уровень экспрессии AHR*

В рамках разработки гипотезы о взаимодействии фуллерена C₆₀ и AYP, в настоящей работе мы попытались изучить способность фуллерена C₆₀ взаимодействовать с клетками, которые экспрессируют AYP и влиять на экспрессию AYP-ассоциированных генов, в том числе *NRF2*, *NQO1*, *CYP1A1*, *CYP1B1*. В качестве модельных культур были выбраны культуры клеток меланомы человека (mel Is и mel Cher). Положительным контролем в нашем исследовании являлся один из самых известных лигандов AYP – FICZ. Следует отметить, что в качестве дополнительных контролей были взяты ресвератрол и мелатонин по причине сходства с фуллереном C₆₀ некоторых их биологических эффектов. [Gumral et al., 2009; Salehi et al., 2018]

Для реализации поставленных задач, в первую очередь важно было оценить влияние фуллерена C₆₀ на уровень экспрессии клетками линий mel Is и mel Cher гена AYP (Рис. 105, 106).

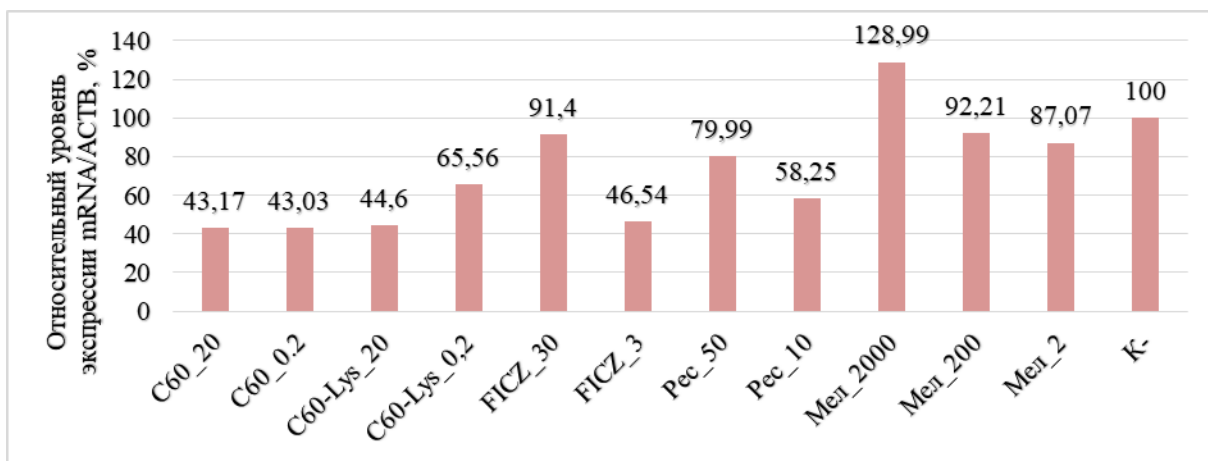


Рис. 105. Изменение экспрессии *AHR* после обработки ВРФ меланомы линии mel Cher.

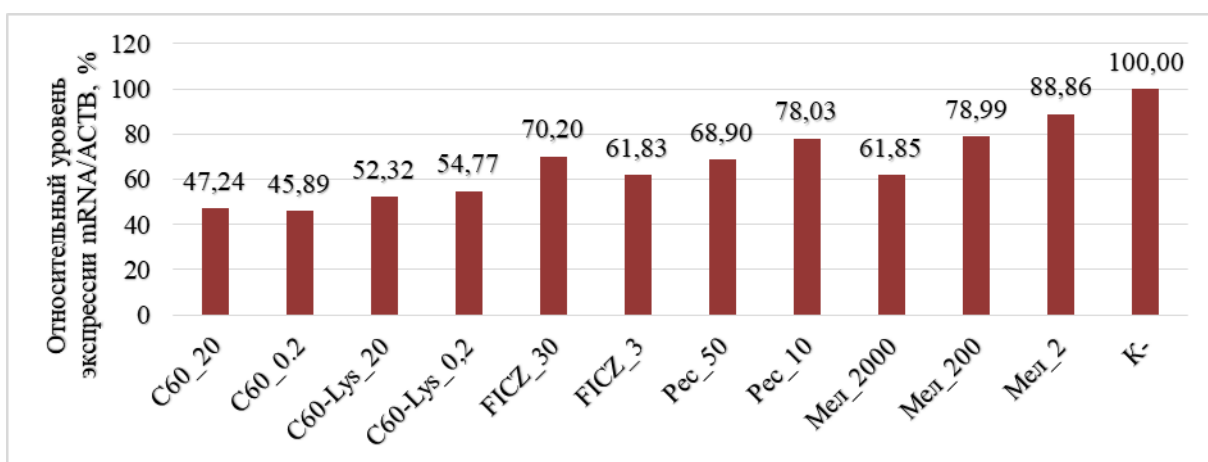


Рис. 106. Изменение экспрессии *AHR* после обработки ВРФ меланомы линии mel Is.

Было показано, что в присутствии водного раствора фуллерена C_{60} и его аддукта экспрессия *AHR* в клетках меланомы mel Is и mel Cher значительно понижалась в среднем примерно на 56 (ВРФ) и 47% (аддукт C_{60} –Lys), соответственно. Снижение экспрессии было зафиксировано на обеих клеточных линиях меланомы. Важно отметить, что снижение экспрессии данного гена наблюдалось также и в присутствии FICZ, ресвератрола и мелатонина максимум на 39, 31 и 38 %, соответственно. Корреляция изменения экспрессии *AHR* под воздействием фуллерена C_{60} и в присутствии других лигандов свидетельствует, на наш взгляд, о том, что, по-видимому, ВРФ способен взаимодействовать с указанным рецептором.

При респираторных вирусных патологиях экспрессия АУР часто увеличивается, поэтому на следующем этапе работ была проведена оценка экспрессии АУР в присутствии фуллерена C₆₀ на линии клеток A549, которая была выбрана в качестве модельной культуры ткани легкого (Рис. 107) [Giovannoni et al., 2021].

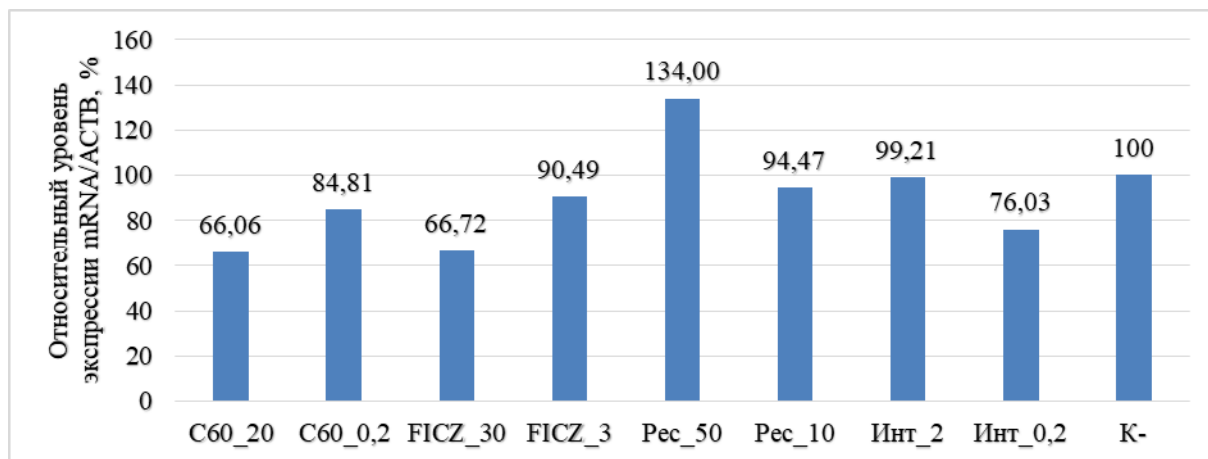


Рис. 107. Изменение экспрессии АНР в присутствии различных соединений на линии клеток аденокарциномы легкого А549.

Показано, что уровень экспрессии АНР в присутствии фуллерена C₆₀ в исследуемых дозах 0,2 и 20 мкг/лунку снижался на 15 и 34%, соответственно. Подавление экспрессии АНР наблюдалось также под воздействием FICZ и IFN- γ максимально на 34 и 24%, соответственно. Однако, в целом снижение экспрессии данного гена на линиях меланомы выглядело более явным по сравнению с таковым на линии А549. Причем, такая тенденция отмечалась как в присутствии фуллерена C₆₀, так и при добавлении контрольных лигандов.

3.6.2.3. Изменение уровня экспрессии NRF2 под влиянием фуллерена C₆₀ в экспериментах *in vitro*

На рисунках 108, 109, 110 представлен относительный уровень экспрессии гена NRF2 клетками линий mel Is, mel Cher и A549 в присутствии ВРФ и контрольных соединений.

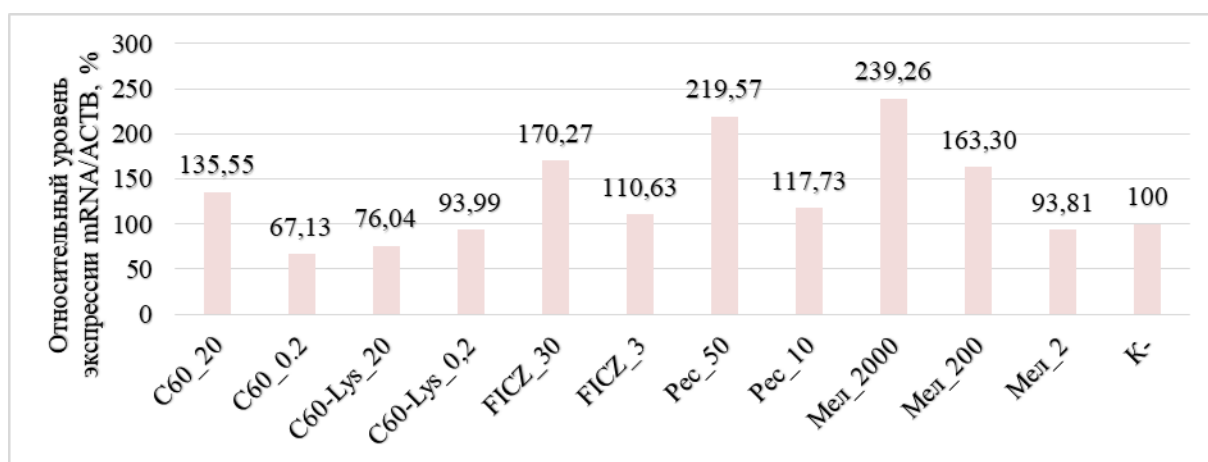


Рис. 108. Изменение экспрессии *NRF2* после обработки ВРФ меланомы линии mel Is.

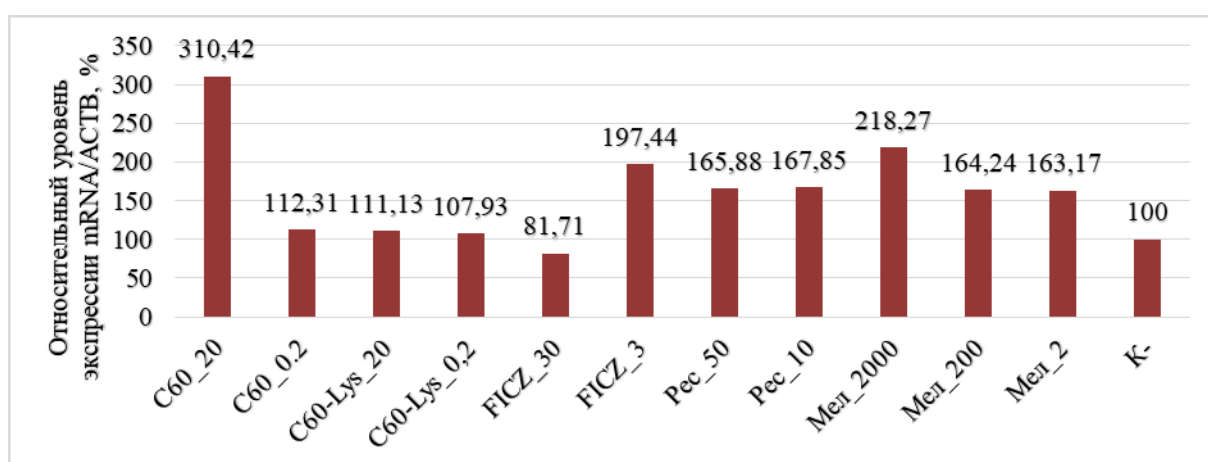


Рис. 109. Изменение экспрессии *NRF2* после обработки ВРФ меланомы линии mel Cher.

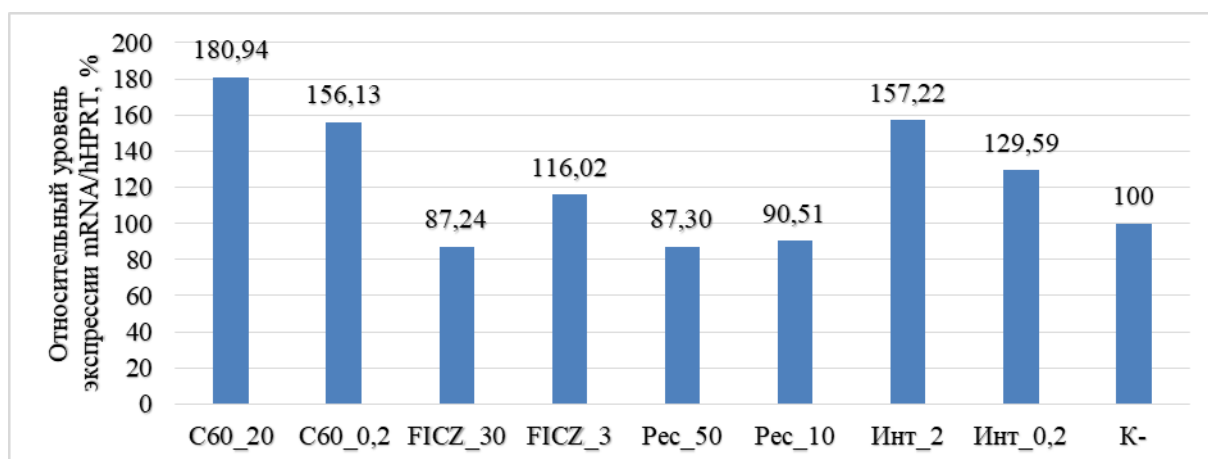


Рис. 110. Изменение экспрессии *NRF2* после обработки ВРФ аденокарциномы легкого линии A549.

Было показано, что при добавлении к культурам клеток ВРФ наблюдалось заметное увеличение экспрессии *NRF2*, которое являлось

дозозависимым. В присутствии аддукта фуллерена C_{60} такого заметного эффекта выявлено не было. Что касается контрольных соединений, то на всех трех культурах клеток также как в присутствии ВРФ было продемонстрировано усиление экспрессии *NRF2* при их введении, за исключением ресвератрола, который не влиял на экспрессию данного гена клетками линии A549. При этом, явный дозозависимый эффект на увеличение экспрессии наблюдался только на культуре клеток mel Is.

На культурах mel Cher и A549 в присутствии фуллерена было показано самое значительное увеличение степени экспрессии *NRF2* по сравнению с контрольными группами в 3 и 1,8 раза, соответственно, относительно группы отрицательного контроля.

3.6.2.4. Изменение уровня экспрессии *NQO1* под влиянием фуллерена C_{60} в экспериментах *in vitro*

На следующем этапе работы была проведена оценка способности ВРФ влиять на еще один фактор антиоксидантной защиты – антиоксидантный фермент НАДФН–хинондегидрогеназа 1 (*NQO1*), который является энзимом второй фазы детоксикации ксенобиотиков и конечным восстановителем для окисленных форм других антиоксидантов (Рис. 111, 112, 113).

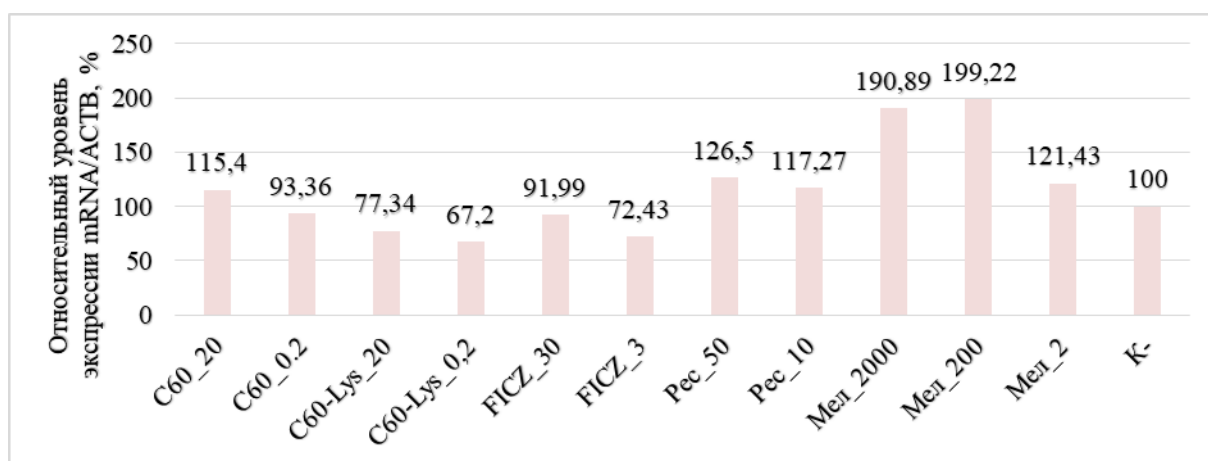


Рис. 111. Изменение экспрессии *NQO1* после обработки ВРФ меланомы линий mel Is.

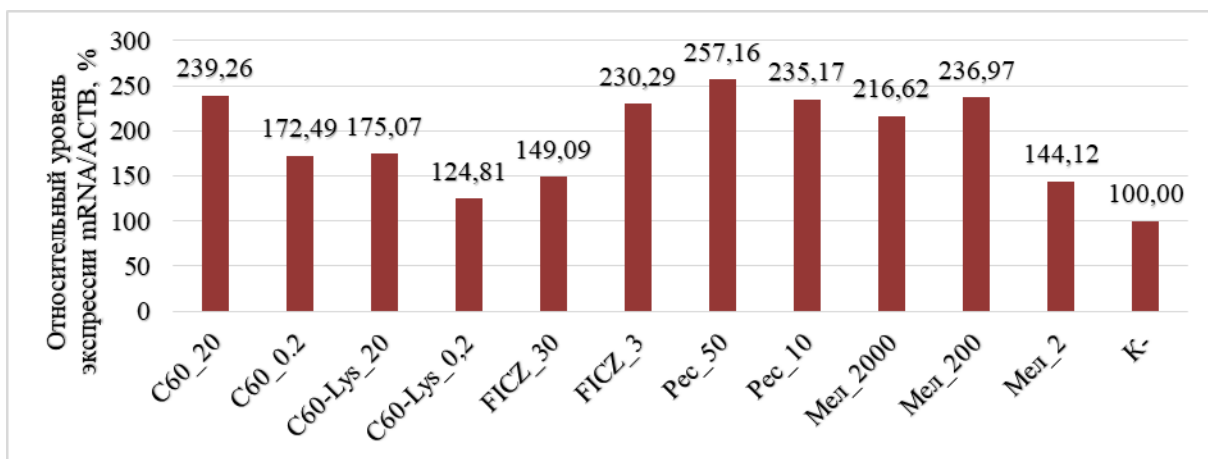


Рис. 112. Изменение экспрессии *NQO1* после обработки ВРФ меланомы линии mel Cher.

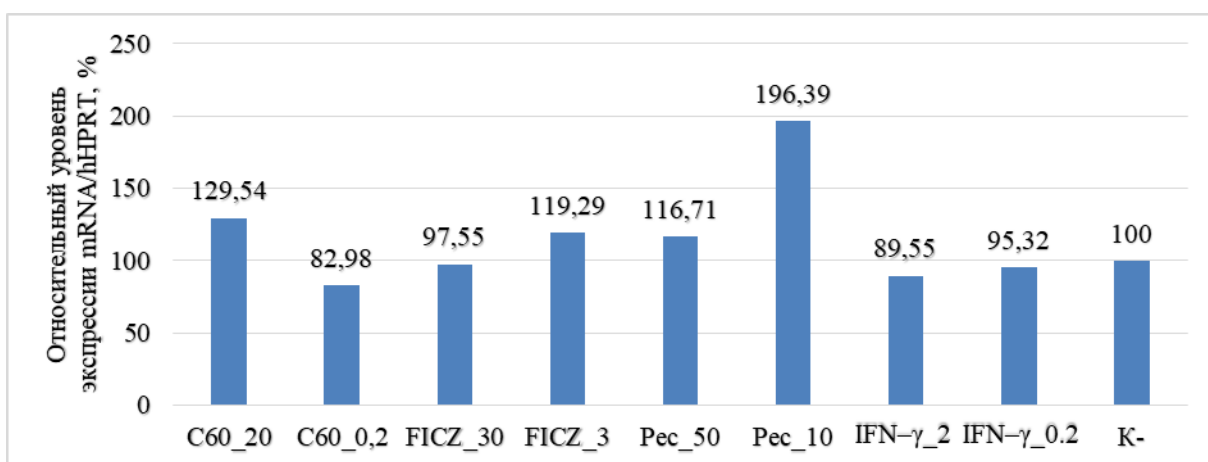


Рис. 113. Изменение экспрессии *NQO1* после обработки ВРФ аденокарциномы легкого линии A549.

Было показано, что уровень относительной экспрессии гена *NQO1* на клетках линий mel Is и A549 в присутствии фуллерена C_{60} повышался на 15 и 30%, соответственно, относительно группы отрицательного контроля. Однако, экспрессия данного гена клетками mel Cher под действием ВРФ была гораздо более выражена, усиливаясь на 140% по сравнению с отрицательным контролем. Что касается клеток линии A549, то экспрессия *NQO1* у них повышалась также под воздействием ресвератрола и FICZ.

3.6.2.5. Изучение влияния фуллерена C_{60} на изменение уровня экспрессии таких АУР–зависимых цитохромов, как *CYP1A1* и *CYP1B1*

Цитохромы *CYP1A1* и *CYP1B1*, участвующие в детоксикации ксенобиотиков, являются в организме АУР-зависимыми. В связи с этим, важно было оценить изменение уровня экспрессии указанных цитохромов в присутствии различных лигандов АУР и фуллерена C_{60} на трех линиях клеток. Результаты экспериментов на линиях меланомы человека представлены на рисунках 114, 115, 116 и 117.

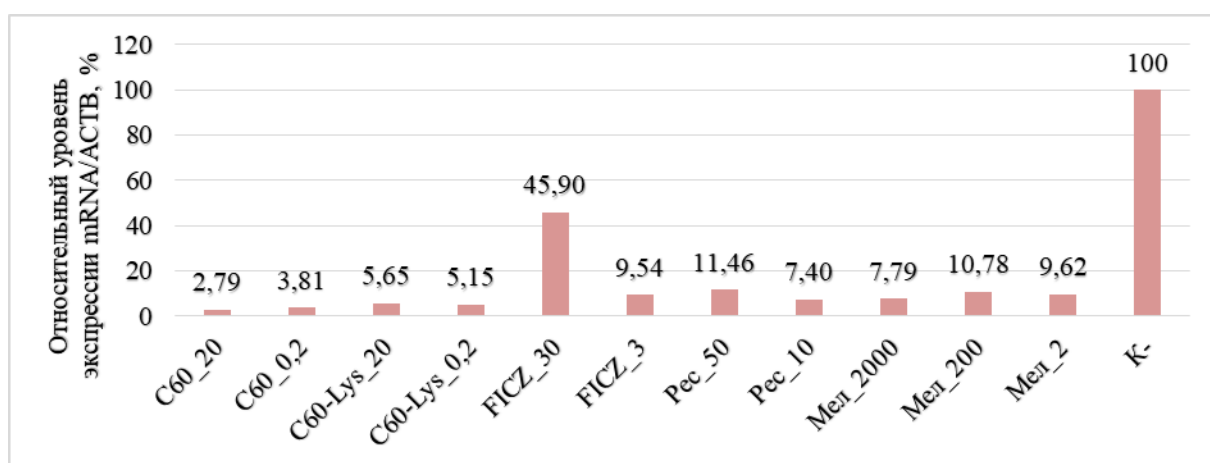


Рис. 114. Изменение экспрессии *CYP1A1* после обработки ВРФ меланомы линии mel Is.

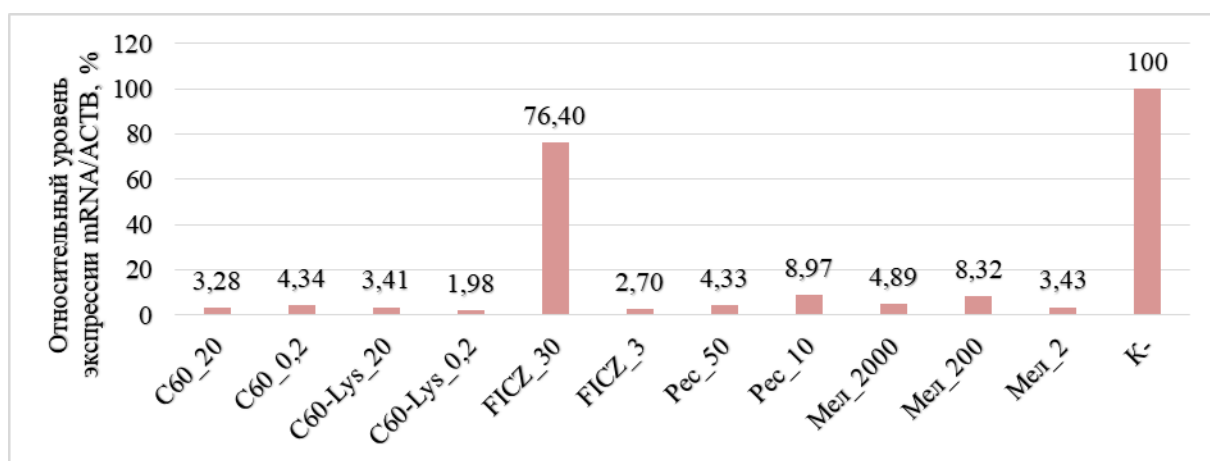


Рис. 115. Изменение экспрессии *CYP1B1* после обработки ВРФ меланомы линии mel Is.

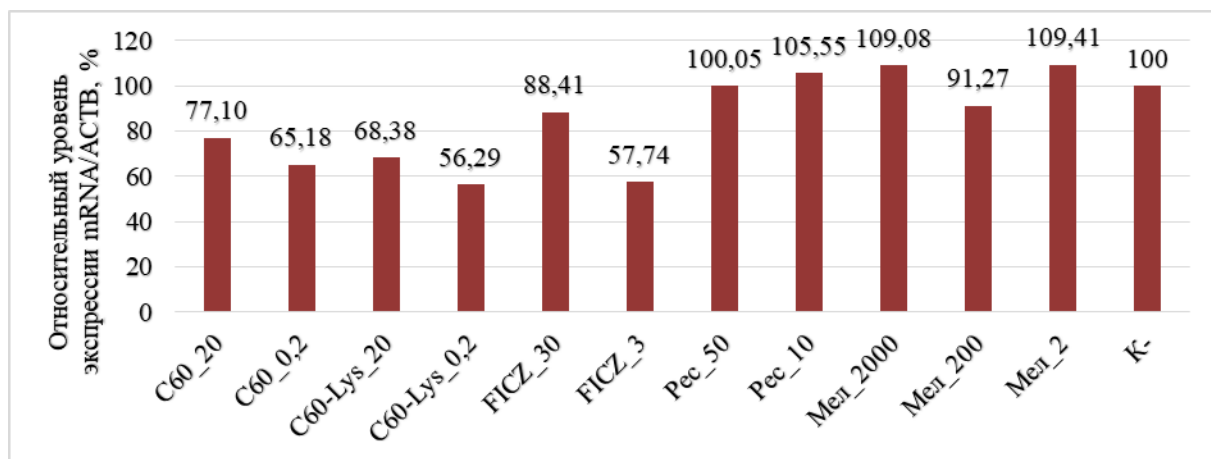


Рис. 116. **Изменение** экспрессии *CYP1A1* после обработки ВРФ меланомы линии mel Cher.

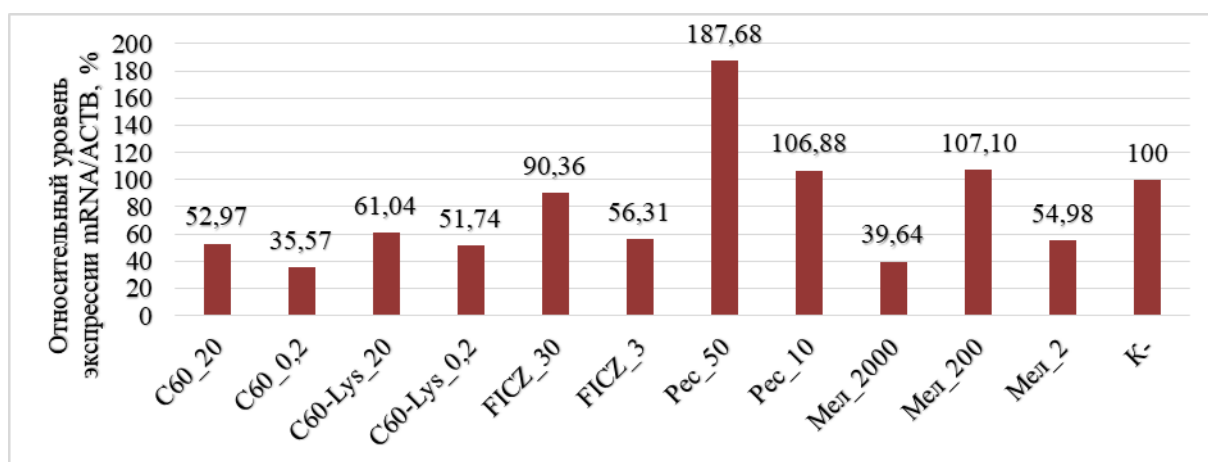


Рис. 117. Изменение экспрессии *CYP1B1* после обработки ВРФ меланомы линии mel Cher.

На рисунке 130 и 131 видно, что в культуре меланомы кожи человека линии mel IS наблюдается значительное подавление ресвератролом и ВРФ экспрессии обоих цитохромов приблизительно на 90%. Столь же значительное снижение экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* наблюдалось в присутствии FICZ и мелатонина. На клетках линии mel Cher (Рис. 116, 117) степень ингибирования экспрессии цитохромов не такая мощная, хотя тенденции снижения экспрессии сохраняются.

Далее, в рамках исследований мы провели анализ способности различных лигандов АУР и ВРФ влиять на экспрессию тех же цитохромов клетками линии A549 (Рис. 118, 119).

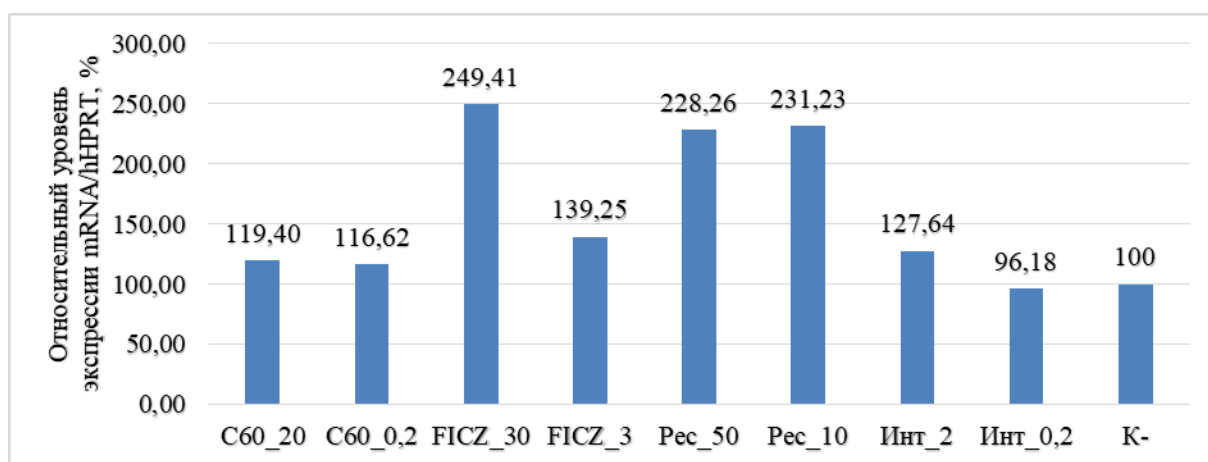


Рис. 118. Изменение экспрессии *CYP1A1* после обработки ВРФ аденокарциномы легкого линии A549.

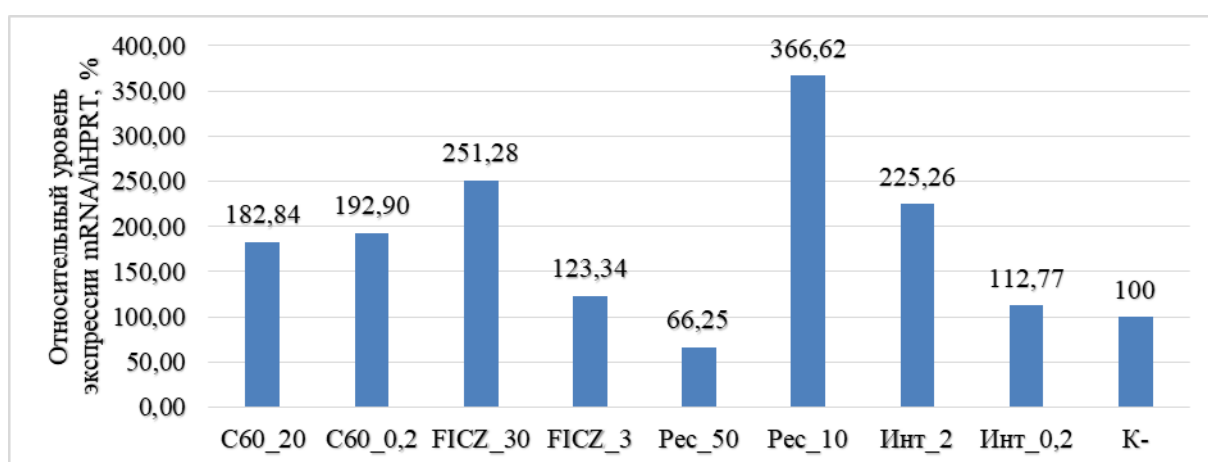


Рис. 119. Изменение экспрессии *CYP1B1* после обработки ВРФ аденокарциномы легкого линии A549.

Было показано, что уровень относительной экспрессии гена *CYP1A1* в присутствии фуллерена несколько превышает контрольное значение и составляет приблизительно 120%. В то время, как для гена *CYP1B1* значение экспрессии превышало контрольное значение на 80%. Есть данные литературы, где указывается, что агонист АУР TCDD существенно индуцировал экспрессию цитохромов в клетках A549, избыток которых приводил к повышенной продукции АФК и, как следствие, к окислительному стрессу и гибели клетки [Tsuji et al., 2011]. Однако, данный эффект показанный в представленном исследовании с антагонистами АУР может свидетельствовать о том, что на линии клеток

A549 увеличение экспрессии цитохромов, вероятно, возникало в ответ на индукцию выработки факторов антиоксидантной защиты NRF2 и NQO1.

Таким образом, в рамках разработки гипотезы, была показана способность фуллерена C60 ингибировать экспрессию АУР и цитохромов наряду с повышением продукции факторов антиоксидантной защиты.

3.6.3. «О способности фуллерена C60 влиять на хемотаксис, активность и профиль экспрессии генов макрофагов»

3.6.3.1. Изучение способности фуллерена C60 в форме раствора влиять на хемотаксис макрофагов

В рамках изучения влияния фуллерена C60 на хемотаксис макрофагов, был проведен *in vitro* эксперимент, целью которого была визуализация способности данного вещества влиять на локализацию макрофагов (Рис. 120).

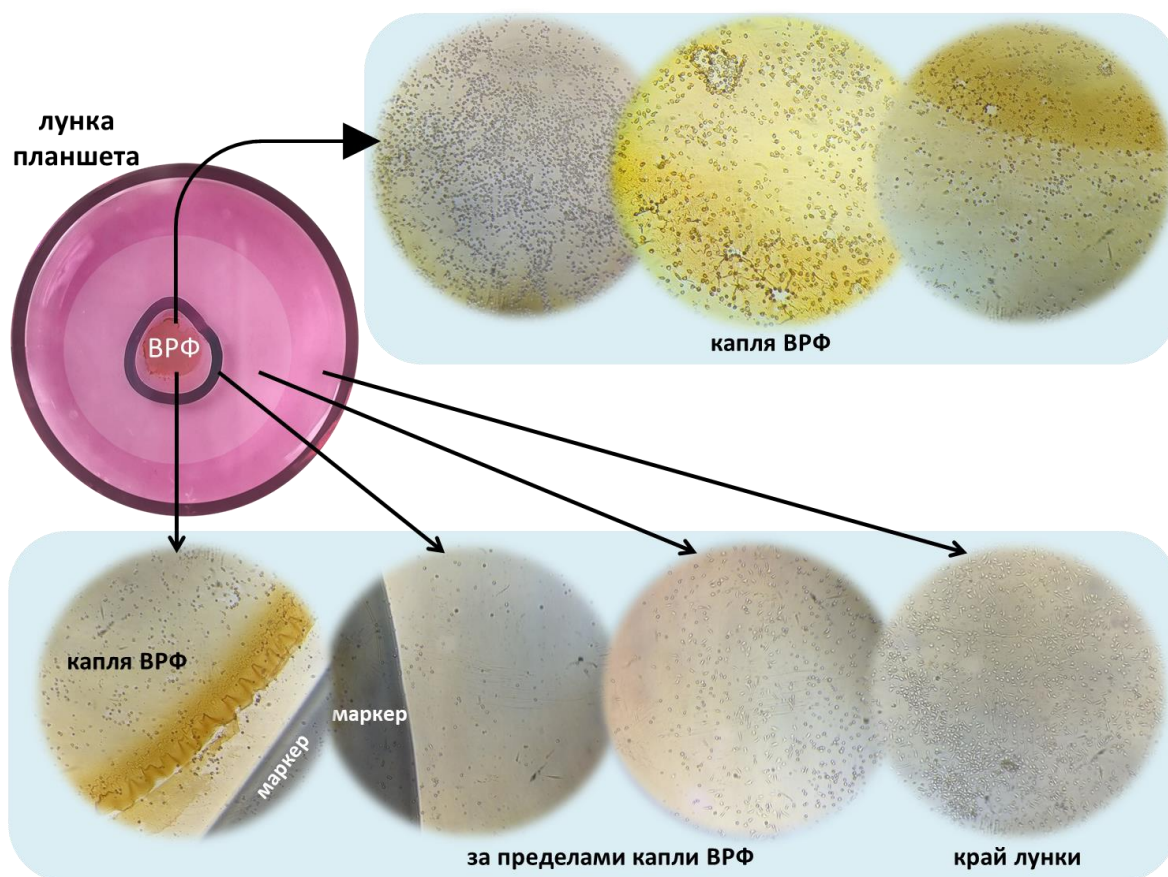


Рис. 120. Способность фуллерена C60 влиять на распределение макрофагов.

На рисунке видно, что капля водного раствора фуллерена C60 имеет желтовато-коричневатый оттенок. Для лучшей визуализации, граница капли была обозначена маркером черного цвета. Показано, что вокруг капли происходит перераспределение перитонеальных макрофагов, полученных из брюшной полости мыши. Так, внутри капли плотность клеток повышена. Кроме того, видны белесые участки, где фуллерен C60 был, по-видимому, поглощен макрофагами, которые располагаются четко по границе этих участков. За пределами капли концентрация макрофагов резко снижается. А при увеличении удаления от капли наблюдается нормальное распределение клеток, которое присутствует в лунках контроля, где ВРФ не вносили.

Далее, была изучена экспрессия такого хемокина, как CCL2/MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), который является мощным фактором хемотаксиса моноцитов/макрофагов в организме млекопитающих (Рис. 121).

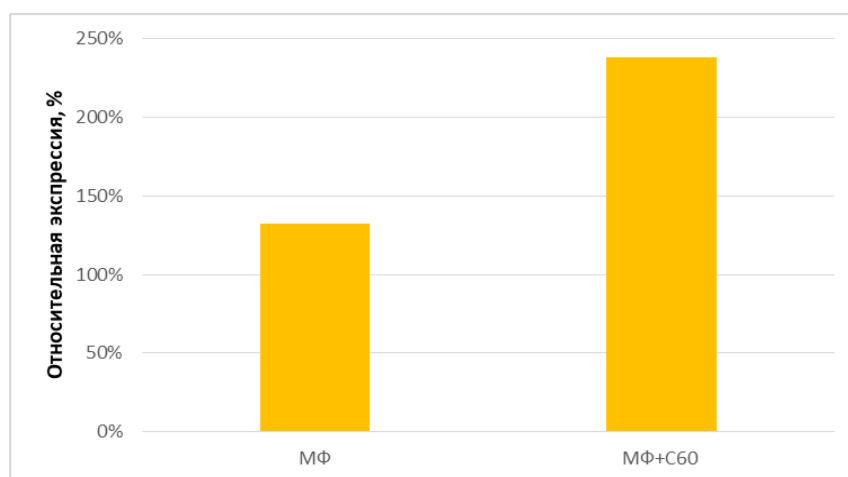


Рис. 121. Уровень экспрессии CCL2.

МФ – макрофаги, которые инкубировались без ВРФ;

МФ+C60 – макрофаги, которые инкубировались в присутствии ВРФ.

На графике видно, что в присутствии ВРФ экспрессия фактора хемотаксиса CCL2 увеличивается примерно в 1,8 раза, что согласуется с результатами эксперимента по визуализации перераспределения

макрофагов, и говорит, по-видимому, о способности фуллерена C60 значительно усиливать хемотаксис данных клеток.

3.6.3.2. Влияние фуллерена C60 на профиль экспрессии генов цитокинов дифференцированных клеток линии THP-1

Изучая взаимодействие фуллерена C60 с клетками врожденной иммунной системы, важно было провести анализ способности данного соединения влиять на такие важнейшие клетки, как макрофаги, которые участвуют во всех воспалительных, аллергических реакциях, являясь первой линией защиты организма и обуславливая дальнейший иммунный ответ.

В данном исследовании мы попытались получить макрофаги (M0), используя клетки линии THP-1 и далее смоделировать их дифференцировку до M1/M2 при помощи введения таких стимуляторов, как IFN- γ и IL-4, соответственно. Чтобы оценить способность фуллерена C60 взаимодействовать с макрофагами и влиять на экспрессию провоспалительных/противовоспалительных цитокинов мы, наряду с указанными стимуляторами, инкубировали клетки с водным раствором фуллерена C60. Степень экспрессии генов на клеточной линии THP-1 анализировали методом RT-PCR. Нами была проанализирована экспрессия следующего ряда генов: *TNF α* , *IFN γ* , *IL-6*, *IL-12*, *ATG5*, *IL-1 α* , *IL-1 β* , *CCL2*, *IL-10*, *c-Myc*, *VEGF-A*, *TGF β* .

Исследуемыми группами были следующие:

«PMA» - клетки линии THP-1, стимулированные только PMA (в присутствии PMA клетки данной линии дифференцируются до макрофагов M0);

«PMA_C60 2» - клетки линии THP-1, стимулированные PMA, а затем фуллереном C60 в концентрации 1 мкг/мл;

«PMA_C60 20» - клетки линии THP-1, стимулированные PMA, а затем фуллереном C60 в концентрации 10 мкг/мл;

«C60 2» - клетки линии THP-1, стимулированные только фуллереном C60 в концентрации 1 мкг/мл;

«C60 20» - клетки линии THP-1, стимулированные только фуллереном C60 в концентрации 10 мкг/мл;

«IFN γ +LPS» - клетки линии THP-1, стимулированные PMA, а затем смесью IFN γ +LPS (контроль стимуляции до макрофагов, которые должны экспрессировать цитокины M1);

«IL-4» - клетки линии THP-1, стимулированные PMA, а затем IL-4 (контроль стимуляции до макрофагов, которые должны экспрессировать цитокины M2);

«Контроль» - не стимулированные клетки линии THP-1.

Согласно литературным данным, макрофаги обычно активируются *in vitro* в сторону типа M1 под воздействием цитокинов Th1, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и IFN γ .

Изменение экспрессии TNF α представлено на рисунке 122.

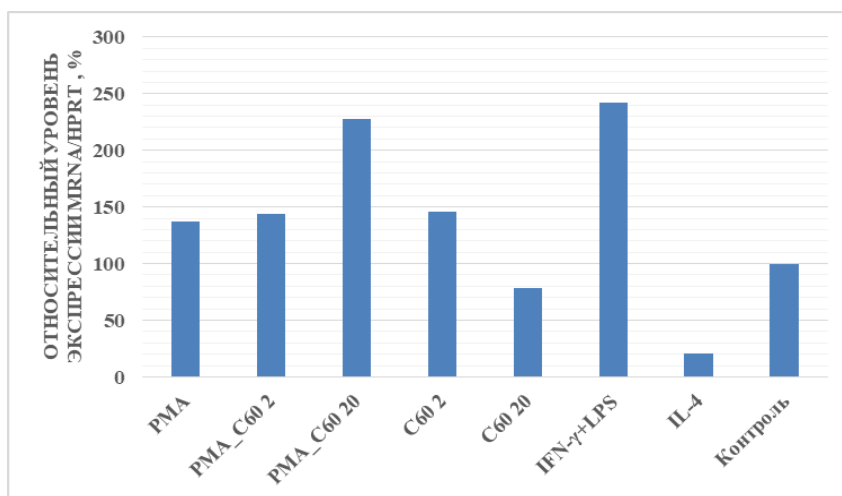


Рис. 122. Изменение уровня экспрессии гена *TNF α* в присутствии различных стимулирующих агентов.

Известно, что *TNF- α* является провоспалительным цитотоксическим цитокином [Sedger et al., 2014], активирующий врожденный иммунный ответ [Francisco et al., 2015] и способствующий выработке провоспалительных цитокинов [Kagoya et al., 2014]. На рисунке видно, что

экспрессия $TNF\alpha$ повышалась в присутствии $IFN\gamma$ и снижалась при введении IL-4. Показано, что в присутствии водного раствора фуллерена C60 в концентрации 20 мкг/лунку экспрессия данного цитокина была на уровне $IFN\gamma$, что говорит, по-видимому, о способности фуллерена C60 в данной концентрации активировать выработку $TNF\alpha$ дифференцированными клетками M0 в условиях *in vitro*. По сравнению с группой «Контроль» уровень экспрессии цитокина был выше в 2,3 раза, а с группой «PMA» - выше в 1,7 раза.

Далее, интересно было оценить степень экспрессии $IFN\gamma$, который играет ключевую роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунном ответе против вирусных, некоторых бактериальных и протозойных инфекций, способствует активации макрофагов, активизации белков главного комплекса гистосовместимости (МНС) и модуляции ответа Т-хелперных клеток [Panagiotakopoulou et al., 2020].

Степень экспрессия гена $IFN\gamma$ в присутствии различных биологически активных веществ представлена на рисунке 123.

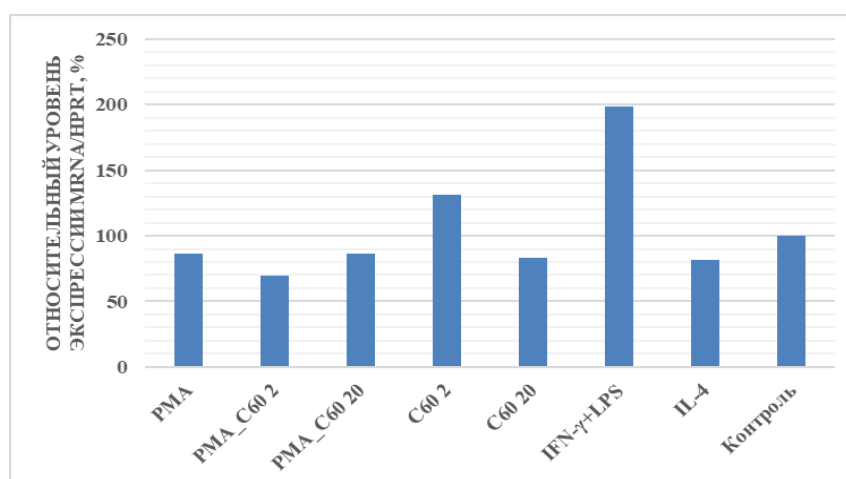


Рис. 123. Изменение уровня экспрессии гена $IFN\gamma$ в присутствии различных стимулирующих агентов.

Видно, что $IFN\gamma$ был несколько повышен только в контрольной группе, где клетки стимулировались смесью $IFN\gamma$ (20нг/мл) + LPS (10

пг/мл). Полученные данные выглядят логично, поскольку *IFN γ* являлся стимулятором и находился в клеточной популяции в избытке.

Ключевыми провоспалительными цитокинами являются также *IL-6*, *IL-12*. *IL-6* является воспалительным фактором, участвующим в регуляции онкогенеза, прогрессирования и метастазирования [Pan et al., 2020].

Экспрессия гена *IL-6* в присутствии различных активных соединений представлена на рисунке 124.

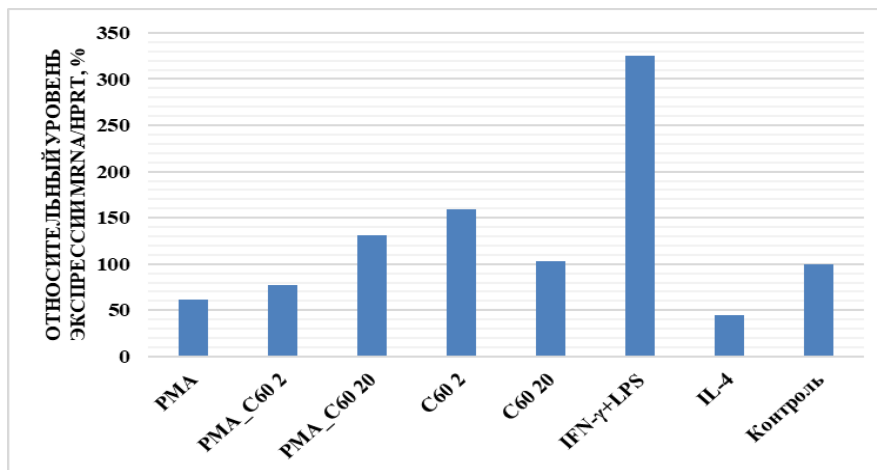


Рис. 124. Изменение уровня экспрессии гена *IL-6* в присутствии различных стимулирующих агентов.

В наших экспериментах экспрессия *IL-6* была повышена в присутствии *IFN-g* и снижалась при введении *IL-4*, что показывает работу контролей стимуляции. Показано, что *IL-6* незначительно повышался при введении только фуллерена C60 в концентрации 2 мкг/лунку (без предварительной стимуляции PMA). Таким образом, видно, что, очевидного влияния на экспрессию данного цитокина фуллерен C60 не оказывает.

Известно, что *IL-12* играет ключевую роль в инициации и регуляции клеточного иммунитета, он оказывает плеiotропное действие на Т-клетки, и естественные клетки-киллеры (NK) и стимулирует секрецию интерферона- γ . *IL-12* физиологически секретируется моноцитами и макрофагами в ответ на бактерии и бактериальные продукты, также

индуцирует развитие Т-хелперов типа 1 (Th1) и играет важную роль в поддержании *in vivo* баланса между ответами Th1 и Th2 [Quan et al., 2015].

Экспрессия гена IL-12 в том числе в присутствии фуллерена C60 представлена на рисунке 125.

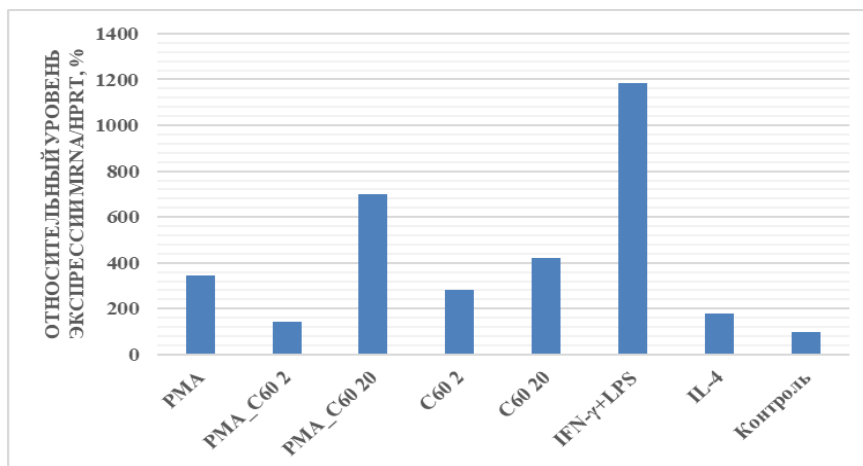


Рис. 125. Изменение уровня экспрессии гена IL-12 в присутствии различных стимулирующих агентов.

На рисунке показано, что наибольшая экспрессия IL-12 была в контрольной группе, где клетки стимулировали смесью IFN γ (20 нг/мл) и LPS (10 пг/мл). Явное увеличение экспрессии данного цитокина (в 7 раз) наблюдалось у клеток M0, стимулированных фуллереном C60 в концентрации 20 мкг/лунку, что говорит о способности фуллерена индуцировать экспрессию IL-12, который относится к цитокинам M1-ответа. Относительно незначительное увеличение экспрессии данного цитокина было отмечено в группах «PMA» и «C60 20».

Далее, в рамках данной работы была проанализирована экспрессия такого гена, как ATG5, который регулирует аутофагическую активность для изменения поляризации макрофагов, впоследствии изменяя степень воспаления [Ye et al., 2018] (Рис. 126).

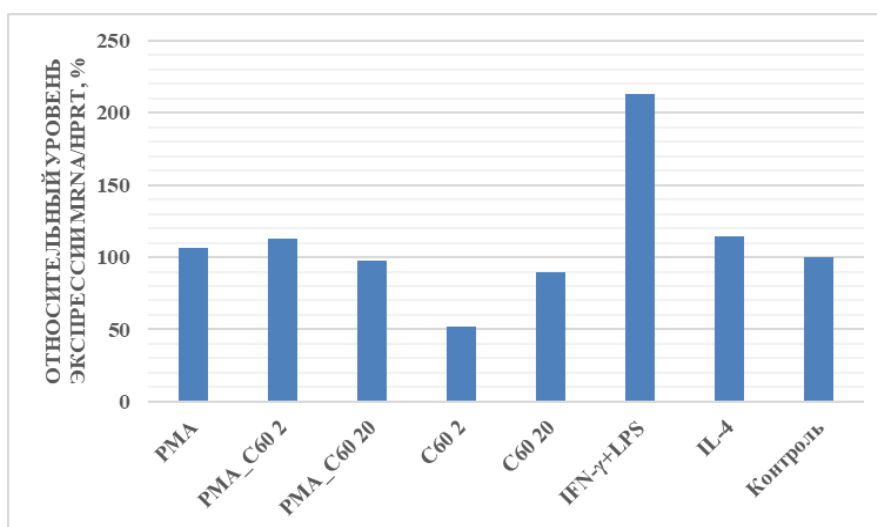


Рис. 126. Изменение уровня экспрессии гена ATG5 в присутствии различных стимулирующих агентов.

Было показано, что небольшое увеличение экспрессии данного гена (в 2,1 раза) наблюдалось только у клеток M0, стимулированных смесью IFN γ (20нг/мл) + LPS (10 пг/мл). Степень экспрессии гена в присутствии остальных стимулирующих агентов была на уровне группы «Контроль».

Далее, нами был проанализирован уровень экспрессии таких провоспалительных цитокинов, как IL-1 α и IL-1 β . IL-1 α экспрессируется во многих неиммунных типах клеток, но в основном остается в цитозоле или связан с клеточной поверхностью, высвобождаясь в случае клеточного некроза [Rider et al., 2013]. На рисунке 127 представлена экспрессия данного цитокина в присутствии различных стимуляторов.

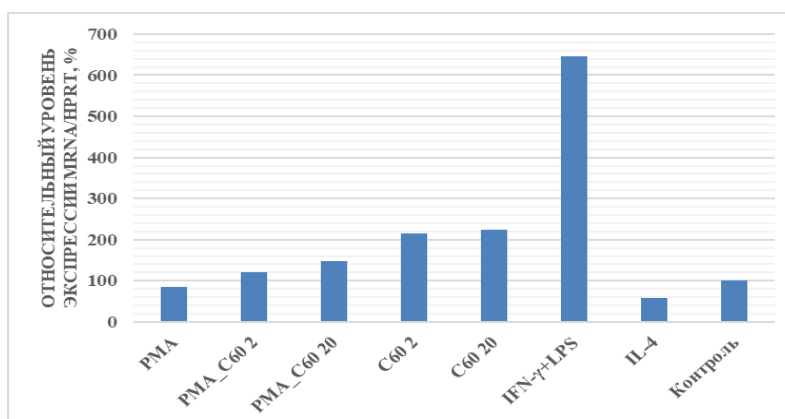


Рис. 127. Изменение уровня экспрессии гена IL-1 α в присутствии различных стимулирующих агентов.

Видно, что уровень экспрессии IL-1 α повышался под действием IFN γ (20 нг/мл) и LPS (10 пг/мл) в 7,7 раза относительно отрицательного контроля. Интересно отметить также, что мы получили небольшое (примерно двукратное) увеличение экспрессии данного цитокина при непосредственном воздействии водным раствором фуллерена C60 на недифференцированные клетки THP-1.

Экспрессия гена IL-1 β в присутствии различных стимулирующих агентов представлена на рисунке 128.

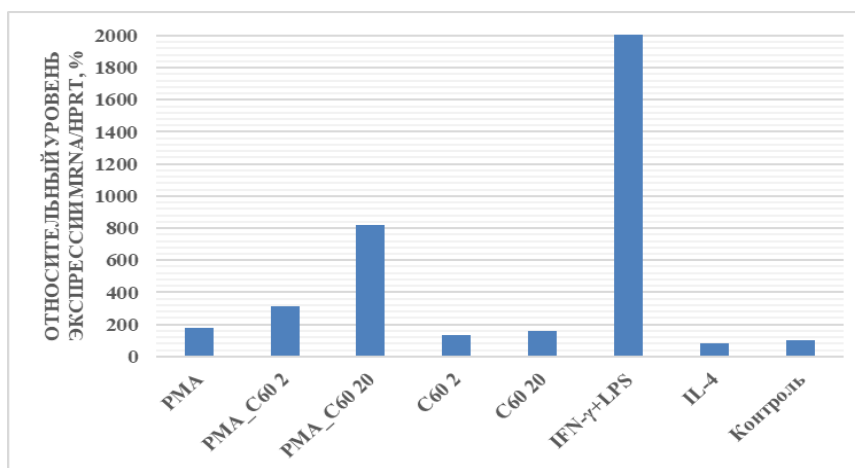


Рис. 128. Изменение уровня экспрессии гена IL-1 β в присутствии различных стимулирующих агентов.

Известно, что IL-1 β быстро генерируется и высвобождается многочисленными различными типами иммунных и неиммунных клеток в ответ на воспалительные сигналы [34]. Относительно экспрессии IL-1 β , полученной в рамках наших экспериментов, следует отметить, что ее степень увеличивалась в группе «IFN γ +LPS» в 37 раз, а в присутствии фуллерена C60 (после стимуляции PMA) в концентрации 2 мкг/лунку и 20 мкг/лунку – в 3,1 и 8,2 раза, соответственно, что является весьма значительным ростом. Изменение экспрессии данного цитокина в других группах было на наш взгляд относительно не значительным.

Далее, нами был проанализирован провоспалительный хемокин CCL2, продуцируемый как моноцитами, так и макрофагами. Он регулирует

накопление макрофагов в жировой ткани, играет ключевую роль в развитии воспаления жировой ткани, резистентности к инсулину и общем патогенезе метаболических заболеваний, таких как ожирение и диабет 2 типа [Akhter et al., 2018]. CCL2 регулирует миграцию моноцитов/макрофагов в очаг воспаления, являясь мощным фактором хемотаксиса [Deshmane, 2009]. Степень экспрессии гена CCL2 представлена на рисунке 129.

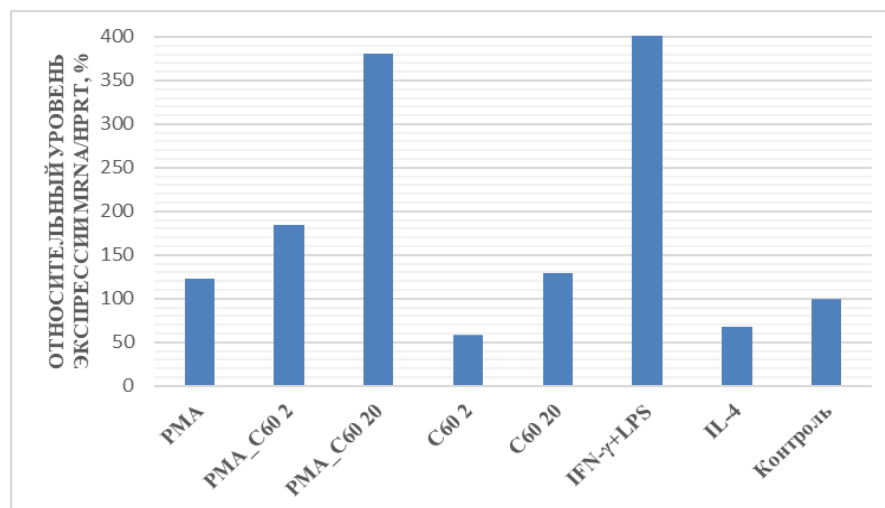


Рис. 129. Изменение уровня экспрессии гена CCL2 в присутствии различных стимулирующих агентов.

На рисунке видно, что очень мощное влияние на экспрессию CCL2 оказывало стимуляция M0 смесью IFN γ +LPS (увеличение экспрессии почти в 640 раз), что является очевидным, поскольку указанный ген отвечает за миграцию клеток в очаг воспаления, а вводимые стимуляторы сигнализируют именно о таком процессе. Так, интерферон-гамма – ключевой цитокин, уровень продукции которого отражает напряженность клеточного противовирусного и антибактериального иммунного ответа. Следует отметить, что при стимуляции M0 водным раствором фуллерена C60 в концентрации 20 мкг/лунку также происходило существенное увеличение экспрессии CCL2 – в 3,8 раза. Причем, мы наблюдали также концентрационную зависимость при изменении экспрессии, поскольку в присутствии фуллерена C60 в концентрации 2 мкг/лунку степень ее

увеличения составляла 1,8 раза. Полученные данные могут свидетельствовать о способности фуллерена C60 несколько стимулировать миграцию клеток в очаг воспаления, что будет интенсифицировать противовоспалительный ответ.

Известно, что макрофаги имеют способность поляризоваться и в иные типы, в том числе M2 и другие, которые характеризуются выработкой противовоспалительных цитокинов, таких как *IL-10*, *C-Myc*, *TGFβ*, *VEGF-A*.

Так, *IL-10* имеет множество клеточных функций, включая противовоспалительное, иммуномодулирующее действие, управляет регуляцией различных противовоспалительных процессов [Mattana et al., 2016]. Степень экспрессии гена *IL-10* в присутствии различных стимулирующих агентов представлена на рисунке 130.

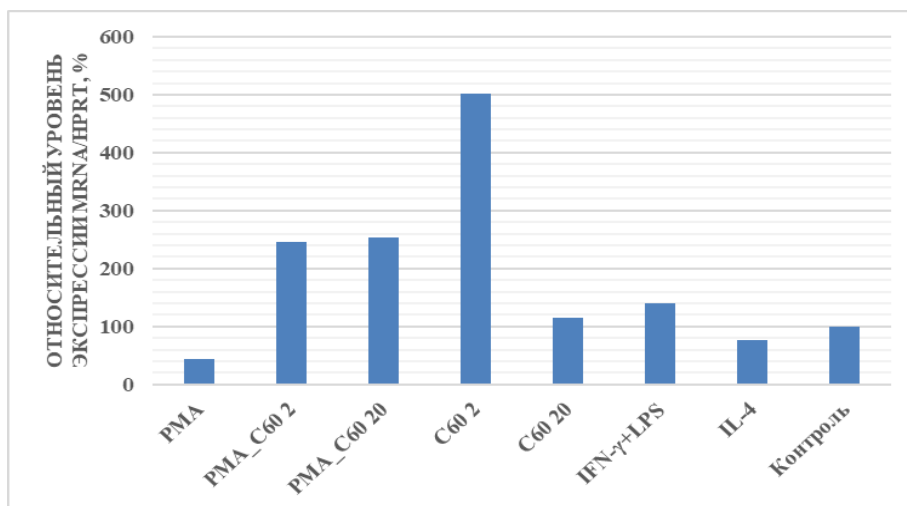


Рис. 130. Изменение уровня экспрессии гена *IL-10* в присутствии различных стимулирующих агентов.

На рисунке видно, что наибольший уровень экспрессии *IL-10* был зафиксирован в недифференцированных клетках, стимулированных фуллереном C60 в концентрации 2 мкг/лунку (в 5 раз выше относительно контрольной группы). Также увеличение степени экспрессии данного цитокина показан в группах, где клетки M0 стимулировали водным раствором фуллерена C60. Независимо от концентрации раствора степень

увеличения экспрессии составила 2,5 раза относительно контрольной группы.

Была проанализирована экспрессия гена с-Мус, который играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, а также регулирует программу транскрипции M2 в макрофагах, связан с развитием опухоли и участвует в путях, важных для роста и выживания клеток [Tikhonovich et al., 2017]. Экспрессия данного гена представлена на рисунке 131.

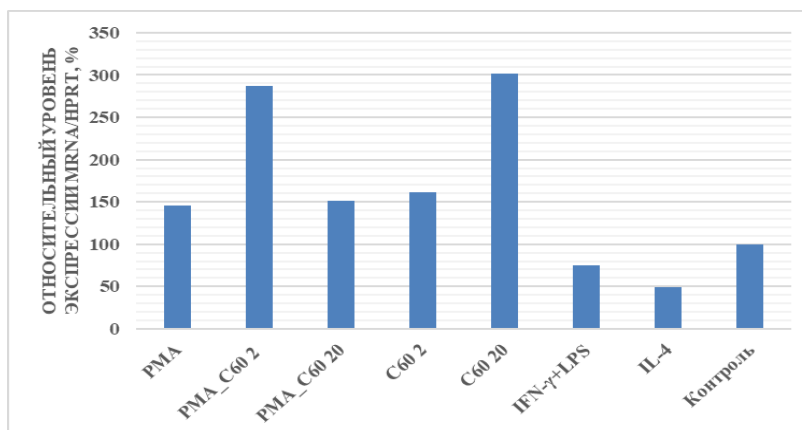


Рис. 131. Изменение уровня экспрессии гена с-Мус в присутствии различных стимулирующих агентов.

Было показано, что уровень экспрессии с-Мус увеличивался в присутствии PMA (примерно в 2,5 раза). Введение иных стимуляторов существенного влияния на экспрессию данного гена не оказывало. Следует отметить, что в присутствии фуллерена C60 в концентрации 20 мкг/лунку наблюдалось даже понижение экспрессии онкогена, которая была повышена введением PMA. Далее нами была проанализирована экспрессия гена TGFβ (Рис. 132).

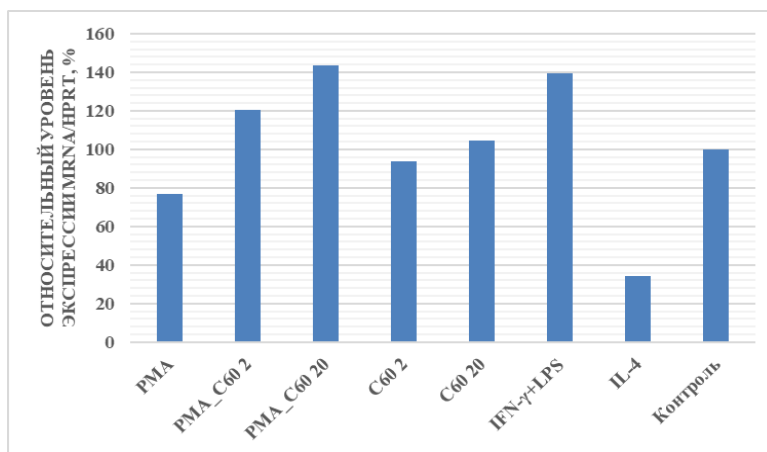


Рис. 132. Изменение уровня экспрессии гена TGFβ в присутствии различных стимулирующих агентов.

Данный ген участвует в таких процессах как иммунный гомеостаз, регенерация тканей, органогенез и др [Sun et al., 2021].

На графике видно, что существенного влияния на экспрессию TGFβ введение различных стимуляторов не оказывало. Однако, некоторое увеличение экспрессии указанного гена наблюдалось в группах, где клетки M0 обрабатывали водным раствором фуллерена C60 или смесью IFNγ и LPS.

Согласно литературным данным, фактор VEGF-A участвует в развитии сосудов во время эмбриогенеза (васкулогенез), способствует выживанию эндотелиальных клеток, ингибируя апоптоз, что в конечном счете приводит к «дозреванию» капилляров; в организме взрослого человека он участвует в хемотаксисе гранулоцитов и макрофагов, регулирует проницаемость сосудистой стенки, а также обладает ангиопротективным эффектом [Никулицкий, диссертация, 2018; Park et al., 2017].

В рамках данной работы нам было интересно оценить способность фуллерена C60 влиять на экспрессию данного фактора, поскольку ранее нами уже было зафиксировано увеличение экспрессии VEGF-A на модели раневого поражения *in vivo* на мышах, где водный раствор фуллерена показал усиление регенеративной активности тканей [Shershakova et al.,

2016]. Уровень экспрессии *VEGF-A* стимулированными клетками представлен на рисунке 133.

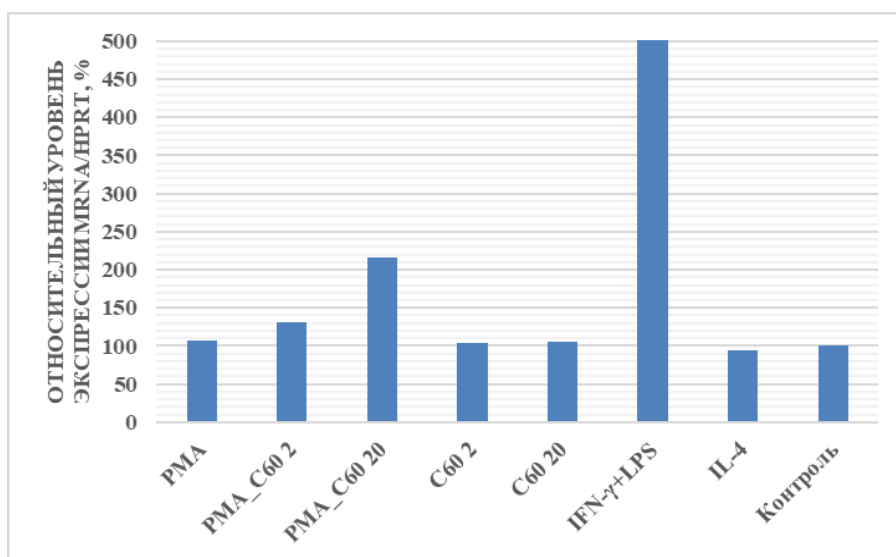


Рис. 133. Изменение уровня экспрессии гена *VEGF-A* в присутствии различных стимулирующих агентов.

Видно, что наибольшее увеличение экспрессии *VEGF-A* показано в контрольной группе «IFN γ +LPS» (в 17 раз). Однако, в группе, где клетки M0 обрабатывались водным раствором фуллерена C60 в концентрации 20 мкг/лунку мы зафиксировали, что экспрессия *VEGF-A* выросла в 2,2 раза. Полученные данные, согласуются с полученными ранее результатами по стимуляции регенеративной активности. По-видимому, данный эффект может быть опосредован, в том числе и макрофагальной реакцией.

Для наглядности, далее мы представили полученные нами результаты в виде сводной таблицы (Табл. 28).

Табл. 28. Сводная таблица изменения уровня экспрессии различных генов в присутствии стимулирующих агентов (%).

Ген/с тиму л.	Контрол ь	PMA	PMA +C60 2	PMA +C60 20	C60 2	C60 20	IFN γ +LPS	IL-4
TNFα	100	137	143	227	146	77	242	21
ATG 5		106	113	98	52	90	213	115
C- MYC		145	287	151	161	302	75	50
TGFβ		77	120	143	94	105	140	34
CCL2		122	185	381	59	129	63035	68
IL-12		346	144	701	284	419	1184	180
VEG F-A		107	130	217	104	105	1711	95
IFNγ		87	69	86	131	83	199	81
IL-1α		84	121	149	215	224	645	95
IL-1β		180	311	820	133	162	3753	58
IL-10		44	246	253	501	116	140	76
IL-6		62	77	131	159	103	325	45

По совокупности полученных в рамках проведенных исследований данных, можно сделать заключение о том, что, по-видимому, водный раствор фуллерена C60 способен взаимодействовать с дифференцированными макрофагами на стадии M0. Из полученных данных следует, что фуллерен C60 (20мкг) способен стимулировать экспрессию таких цитокинов, как CCL-2, IL-12, IL-1 β , IL-10. В меньшей степени под действием фуллерена C60 увеличивалась экспрессия IL-1 α , TNF α и TGF β . Таким образом, показано, что в присутствии фуллерена C60 происходит увеличение экспрессии преимущественно цитокинов типа M1, участвующих, в том числе в противоаллергическом ответе. Полученные данные согласуются с показанной нами ранее противоаллергической активностью фуллерена C60, которая, по-видимому, может быть опосредована макрофагами. Однако, учитывая стимуляцию экспрессии гена фактора хемотаксиса моноцитов/макрофагов CCL2, фуллерен C60

может способствовать привлечению в область воспаления указанных клеток и дифференцировка макрофагов будет осуществляться согласно характеру микроокружения.

3.6.4. «О способности фуллерена взаимодействовать с мембранными фосфолипидами и влиять на высвобождение арахидоновой кислоты»

3.6.4.1. Фенотипирование макрофагов

Для проведения исследований относительно разработки гипотезы необходимо было индуцировать воспалительный процесс *in vitro*. Для данного исследования было принято решение использовать клетки макрофагов человека. Получение макрофагов осуществляли с использованием моноклеарных клеток периферической крови (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) путем стимуляции соответствующими факторами (M-CSF). Индуцирование воспалительного процесса происходило путем стимуляции клеток смесью IFN γ и ЛПС. В результате внесения указанных стимуляторов макрофаги M0 меняли свой фенотип на M1. Для контроля процесса дифференцировки макрофагов и наглядности эксперимента была также проведена стимуляция смесью цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-13, которые приводили к изменению фенотипа макрофагов M0 до фенотипа M2. Внесение фуллерена C60 для изучения его способности взаимодействовать с фосфолипидами мембран клеток также происходило под контролем фенотипирования клеток для того, чтобы визуально оценить способность фуллерена влиять на дифференцировку макрофагов, которая происходит под действием факторов воспаления. Кроме того, фенотипирование было проведено для клеток, которые инкубировались в присутствии смеси фуллерена с лецитином, который был выбран в качестве конкурирующего агента за связывание с фосфолипидами мембран клеток. Важно было, в том числе, визуально проанализировать на сколько фуллерен C60 и его смесь с лецитином способны будут менять фенотип

макрофагов при их дифференцировке в условиях стимуляции воспалительными факторами (Рис. 134).

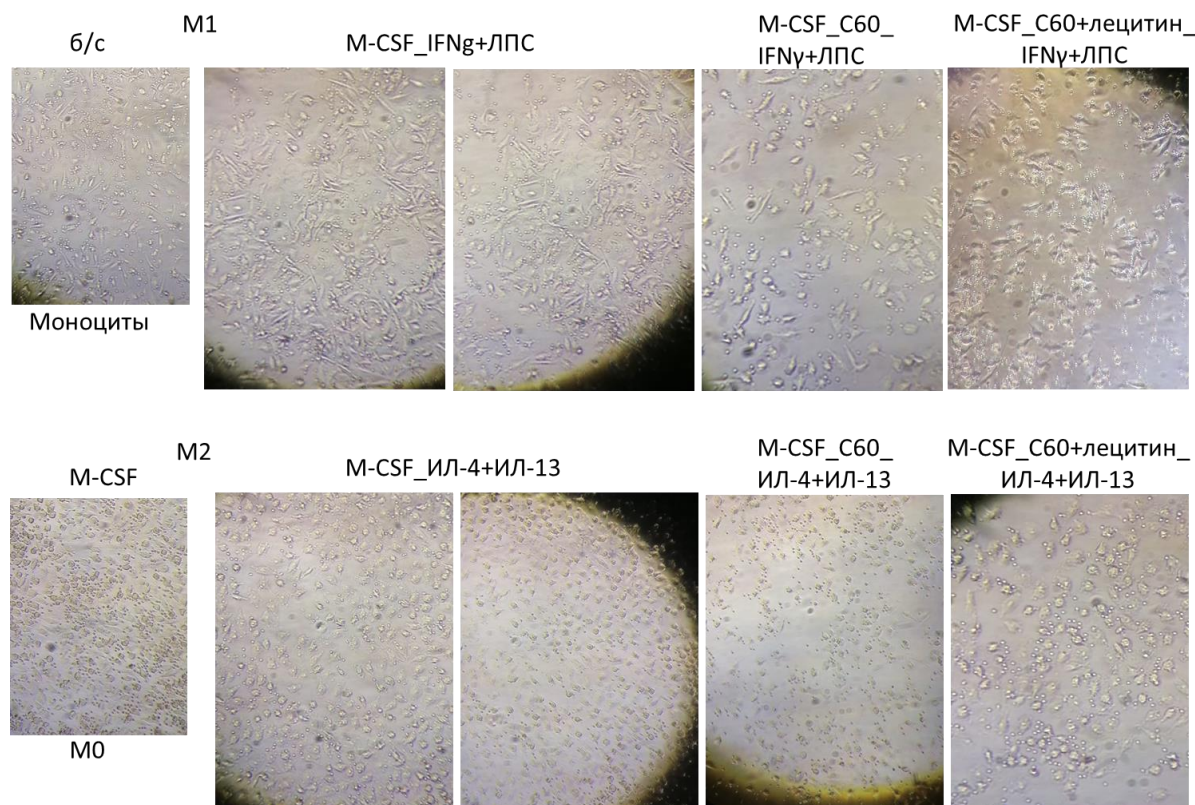


Рис. 134. Фото PBMC после проведения различных этапов стимуляции.

б/с – стимуляции клеток PBMC не проводилось;

М-CSF – клетки стимулировали только фактором М-CSF;

М-CSF_IFN γ +ЛПС - клетки стимулировали фактором М-CSF с последующей стимуляцией IFN γ и ЛПС;

М-CSF_C60_IFN γ +ЛПС - клетки стимулировали фактором М-CSF с последовательными отдельными инкубациями с ВРФ, а затем с IFN γ и ЛПС;

М-CSF_C60+лецитин_IFN γ +ЛПС - клетки стимулировали фактором М-CSF с последовательными отдельными инкубациями с ВРФ в смеси с лецитином, а затем с IFN γ и ЛПС;

М-CSF_ИЛ-4+ИЛ-13 - клетки стимулировали фактором М-CSF с последующей стимуляцией ИЛ-4 и ИЛ-13;

М-CSF_C60_ИЛ-4+ИЛ-13 - клетки стимулировали фактором М-CSF с последовательными отдельными инкубациями с ВРФ, а затем с ИЛ-4 и ИЛ-13;

М-CSF_C60+лецитин_ ИЛ-4+ИЛ-13 - клетки стимулировали фактором М-CSF с последовательными отдельными инкубациями с ВРФ в смеси с лецитином, а затем с ИЛ-4 и ИЛ-13.

На фото видны ярко выраженные отличия между фенотипом не стимулированных (моноциты) и стимулированных клеток. Фенотип клеток, стимулированных только М-CSF соответствует таковому, характерному для макрофагов М0. Далее, видно, что после стимуляции IFN γ и ЛПС клетки приобретают фенотип М1, а после стимуляции ИЛ-4+ИЛ-13 - фенотип М2. Следует отметить, что при предварительной инкубации клеток с фуллереном С60 и дальнейшей стимуляцией IFN γ +ЛПС, клетки приобретают фенотип, который схож с таковым М1, однако присутствуют клетки, схожие с клетками М2. Видны как немного вытянутые клетки, форма которых характерна для М1, так и клетки округлой формы, характерной для М2. Однако, при стимуляции клеток М0 ИЛ-4+ИЛ-13 после предварительной инкубации с фуллереном С60, клетки с фенотипом М1 отсутствуют и их фенотип схож с клетками М2. В условиях предварительной инкубации клеток М0 со смесью фуллерена С60 и лецитина наблюдалось аналогичная картина изменения фенотипа клеток как при инкубации с фуллереном С60 без лецитина. Таким образом, можно сказать, что внесение в среду лецитина, по-видимому, не оказывало влияние на изменение фенотипа клеток.

Характеристика фенотипа полученных клеток проводилась также методом проточной цитометрии. Известно, что функциональный фенотип макрофагов определяет не только спектр продуцируемых ими хемокинов, но и экспрессию хемокиновых рецепторов на клетках. Так, на М1-макрофагах преобладает экспрессия провоспалительного маркера CCR7, а

маннозный рецептор (CD206), характерен для M2-макрофагов [Чурина и др., 2019]. Определялось количество клеток, экспрессирующих CCR7, как маркер макрофагов фенотипа M1, и CD206, как маркер макрофагов фенотипа M2. Для наглядности результаты представлены в виде соотношения количества клеток, экспрессирующих CCR7, к клетками, экспрессирующим CD206 – для оценки наличия макрофагов M1. Для оценки же наличия макрофагов M2, было рассчитано обратное соотношение клеток CD206+/CCR7+ (Рис. 135).

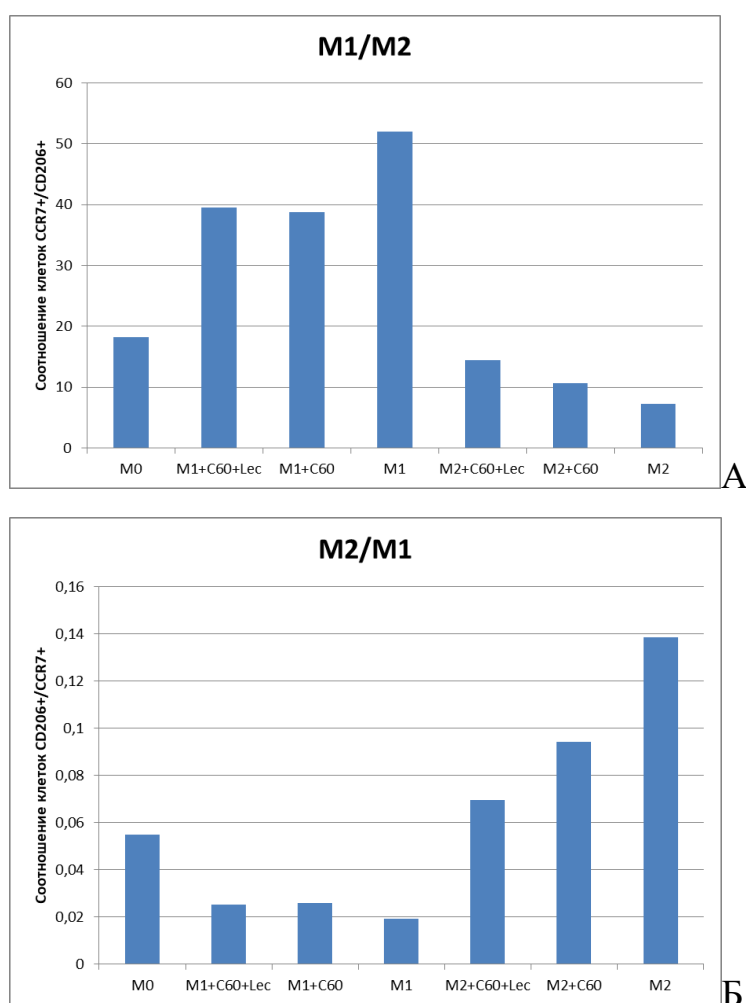


Рис. 135. Анализ фенотипа макрофагов методом проточной цитометрии.

А - соотношение клеток CCR7+/CD206+ (M1/M2); Б - соотношение клеток CD206+/CCR7+ (M2/M1).

На графиках видно, что визуальный анализ подтверждается данными проточной цитометрии. На макрофагах предположительно фенотипа M1

преимущественно экспрессируется CCR7, а на макрофагах предположительно фенотипа M2 – CD206. Интересно отметить, что на клетках, обработанных ВРФ, экспрессия указанных маркеров несколько меняется. Так, при предварительной инкубации с фуллереном C60 клеток M1, наблюдается уменьшение количества CCR7+ клеток, а при инкубации с фуллереном C60 клеток M2 – уменьшение количества CD206+ клеток. При этом внесение дополнительно свободного лецитина усиливает эффект уменьшения количества CD206+ клеток. Показанные результаты могут косвенно свидетельствовать о наличии у ВРФ модулирующей активности в отношении макрофагов, находящихся в разном микроокружении. Так, при внесении к макрофагам M0 IFN γ +ЛПС фуллерен C60 препятствует дифференцировке клеток в M1, а при добавлении IL-4+IL-13 – в M2.

3.6.4.2. Изучение влияния фуллерена C60 на in vitro индуцированное воспаление. Оценка экспрессии патогенетически значимых факторов

Оценка способности фуллерена C60 влиять на выработку патогенетически значимых факторов воспаления проводилась *in vitro* на модели индуцированного воспалительного иммунного ответа у дифференцированных моноклеарных клеток периферической крови (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) человека. Воспалительный иммунный ответ моделировали путем дифференцировки PBMC до клеток фенотипа M0 (клетки «M0») путем инкубирования в присутствии IMDM+MCSF, а затем до клеток фенотипов M1 (клетки «M1») или M2 (клетки «M2») путем стимуляции IFN γ +ЛПС или IL-4+IL-13, соответственно. В качестве патогенетически значимых факторов была проанализирована экспрессия циклооксигеназы 1 (ЦОГ-1, COX-1), циклооксигеназы 2 (ЦОГ-2, COX-2), арахидонат-12-липоксигеназы (АЛОГ-12, A12L), ИЛ-6 (IL-6), ФНО α (TNF α), ИФН γ (IFN γ), ИЛ1 β (IL-1 β), ИЛ-10 (IL-10), фосфолипазы A2 (sPLA2, ФЛА2), арил-углеводородного рецептора (AUR, AhR), редокс-чувствительного транскрипционного фактора (NRF2),

транскрипционного фактора (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, Nfkb), фактора хемотаксиса моноцитов (ФХМ, C-C motif ligand 2, CCL2), фактора некроза опухоли α (ФНО α , TNF α), арахидонат-5-липоксигеназы (АЛОГ-5, ALOX5).

В рамках оценки способности фуллерена C60 влиять на выработку патогенетически значимых факторов воспаления макрофагами в первую очередь проводился анализ экспрессии генов ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов. Было показано, что экспрессия гена фермента COX-1, которая является конститутивной и работает практически постоянно, выполняя физиологически важные функции, минимальна у клеток M0, M1 и клеток, обработанных ВРФ (Рис. 152). Увеличение же экспрессии данного гена наблюдалось только у клеток M2, стимулированных ИЛ-4+ИЛ-13. Таким образом, фуллерен C60, по-видимому, не влияет на экспрессию COX-1, в отличие от НПВС, которые ингибируют ее экспрессию, обуславливая развитие неблагоприятных эффектов. Увеличение экспрессии COX-1 ведет также к синтезу избыточного количества простагландинов и усилению воспаления.

Далее, было показано, что уровень экспрессии гена COX-2 был высоким в клетках «M1», в то время, как клетки фенотипов M0 и M2 практически не экспрессировали данный фактор (Рис. 136).

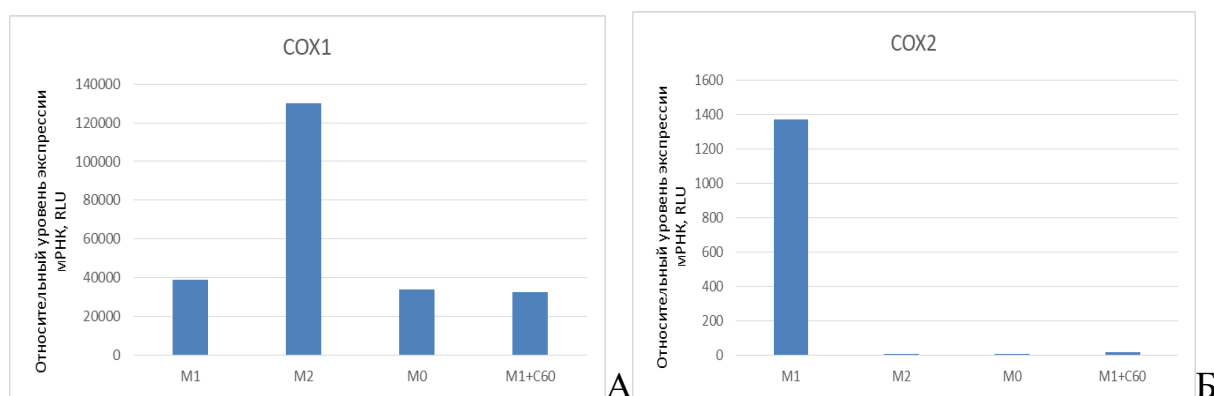


Рис. 136. Уровень экспрессии COX-1 (А) и COX-2 (Б).

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM+MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M2 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИЛ-4+ИЛ-13;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Предварительное инкубирование клеток M0 с ВРФ подавляло экспрессию COX-2 в условиях стимуляции клеток ИФН- γ +ЛПС. Ярко выраженное снижение экспрессии COX-2 под действием C60 может приводить к подавлению синтеза простагландинов и ингибированию развития воспалительного процесса, поскольку данный фактор участвует в синтезе простаноидов и его фармакологическое ингибирование ослабляет симптомы воспаления и боли.

Что касается экспрессии гена фермента ALOX12, то под действием C60 она существенно снижается, по сравнению с таковой у клеток M0, M1 и M2, не обработанных ВРФ, что также может говорить в пользу способности фуллерена C60 купировать воспалительные реакции, связанные с метаболизмом арахидоновой кислоты (Рис. 137).

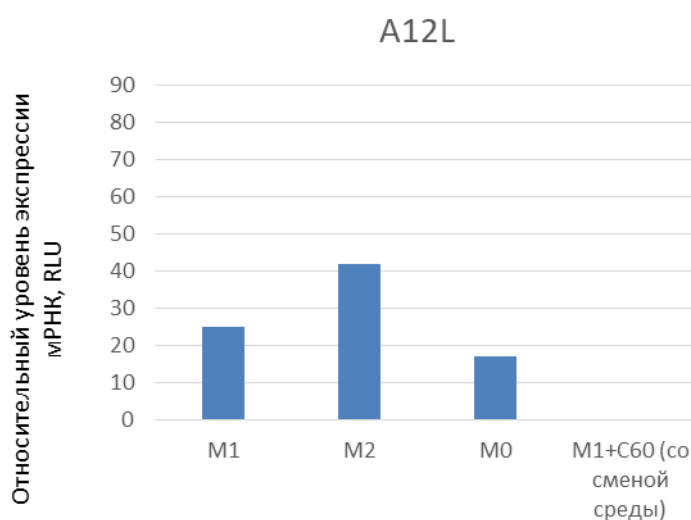


Рис. 137. Уровень экспрессии ALOX12.

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M2 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИЛ-4+ИЛ-13;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Далее, в рамках анализа экспрессии провоспалительных цитокинов, которые продуцируются макрофагами, была проведена оценка экспрессии ИЛ-6 и TNF α (Рис. 138).

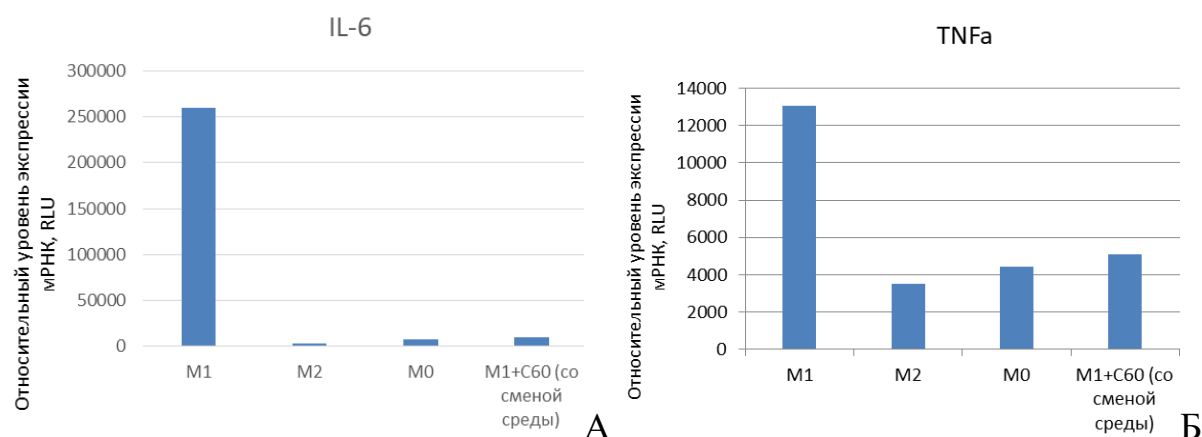


Рис. 138. Уровень экспрессии ИЛ-6 (А) и TNF α (Б).

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M2 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИЛ-4+ИЛ-13;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС.

На графиках видно, что максимальный уровень экспрессии наблюдается в клетках фенотипа M1, а минимальный – в клетках M0 и M2. Уровень экспрессии указанных генов клетками в условиях предварительной инкубации с ВРФ с последующей стимуляцией ИФН- γ +ЛПС также сопоставим с уровнем таковой для клеток M0 и M2, что

свидетельствует о способности фуллерена C60 подавлять воспалительный ответ макрофагов *in vitro*.

Результат анализа уровня экспрессии таких факторов, как NFkB и NRF2 представлен на рисунке 139.

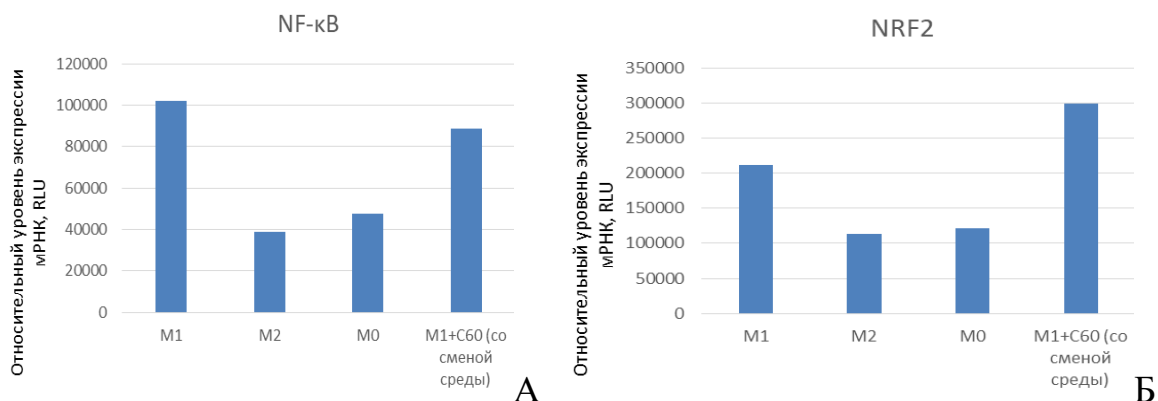


Рис. 139. Уровень экспрессии NFkB (А) и NRF2 (Б).

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M2 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИЛ-4+ИЛ-13;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Показано, что высокий уровень экспрессии NFkB продемонстрировали клетки фенотипа M1, значительно меньше данного фактора экспрессировалось в клетках M0 и M2. В условиях инкубации клеток с фуллереном C60 видна тенденция к снижению NFkB. Что касается экспрессии NRF2, то на графике видно, что уровень его экспрессии выше в клетках M1 по сравнению с клетками фенотипа M0 и M2. Тенденция к увеличению NRF2 под действием C60 может говорить об усилении антиоксидантной активности клетки, обеспечиваемой активацией NRF2.

Важным противовоспалительным фактором является STAT6. Увеличение его экспрессии под действием ВРФ может способствовать

активации макрофагов M2 и свидетельствовать о противовоспалительной активности фуллерена C60 (Рис. 140).

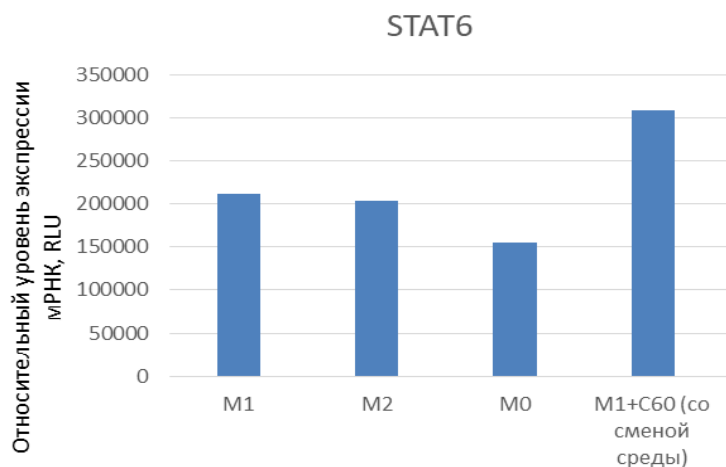


Рис. 140. Уровень экспрессии STAT6.

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M2 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИЛ-4+ИЛ-13;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Весьма интересным результатом исследований стал анализ способности фуллерена C60 влиять на экспрессию CCL2, который вырабатывается моноцитами и макрофагами фенотипа M2 и проявляет хемотаксическую активность, играя важную роль в подавлении воспалительной реакции за счет локального привлечения макрофагов в зону воспаления (Рис. 141).

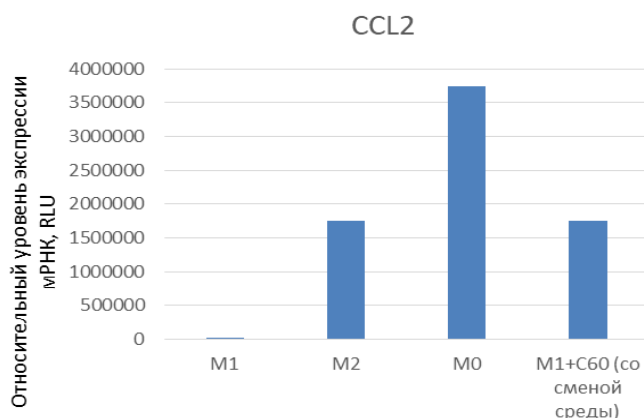


Рис. 141. Уровень экспрессии CCL2.

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M2 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИЛ-4+ИЛ-13;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Показанное увеличение экспрессии CCL2 в условиях предварительной инкубации клеток с ВРФ по сравнению с клетками M1 без обработки ВРФ может свидетельствовать о способности фуллерена C60 сдвигать процесс дифференцировки макрофагов M0 в сторону репаративного фенотипа M2, усиливая хемотаксис моноцитов.

3.6.4.3. Изучение влияния фуллерена C60 на in vitro индуцированное воспаление в условиях предварительной инкубации с лецитином. Оценка экспрессии патогенетически значимых факторов.

Важным этапом разработки гипотезы о механизме противовоспалительной активности стали исследования, посвященные изучению способности фуллерена C60 связываться с фосфолипидами. В качестве модельного фосфолипида был выбран лецитин. Лецитины — это сложные эфиры аминок спирта холина и диглицеридфосфорных кислот.

Ввиду того, что основой лецитина являются фосфолипиды, иногда эти термины используются даже как синонимы [Малая медицинская энциклопедия. — М.: Медицинская энциклопедия. 1991—96 гг.]. Основными фосфолипидами, содержащимися в соевом лецитине, являются фосфатидилхолин (19—21 %), фосфатидилэтаноламин (8—20 %), инозитол-содержащие фосфатиды (20—21 %) и фосфатидилсерин (5,9 %).

Целью данных исследований было подтвердить или опровергнуть предположение о том, что вероятной мишенью для взаимодействия фуллерена C₆₀ в организме являются фосфолипиды мембран клеток. Для оценки способности фосфолипидов влиять на противовоспалительную активность ВРФ, эксперименты проводились в условиях предварительной инкубации ВРФ с лецитином (до внесения к клеткам).

На первом этапе исследований важно было оценить способность лецитина влиять на способность фуллерена C₆₀ подавлять экспрессию ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов. На рисунке 142 видно, что у макрофагов, дифференцированных до фенотипа M1 путем стимуляции ИФН- γ и ЛПС, наблюдалась повышенная продукция COX-1 и COX-2. При этом в присутствии фуллерена C₆₀ их экспрессия заметно падала. Введение же лецитина снова повышало экспрессию, например, ALOX5 и COX-1.

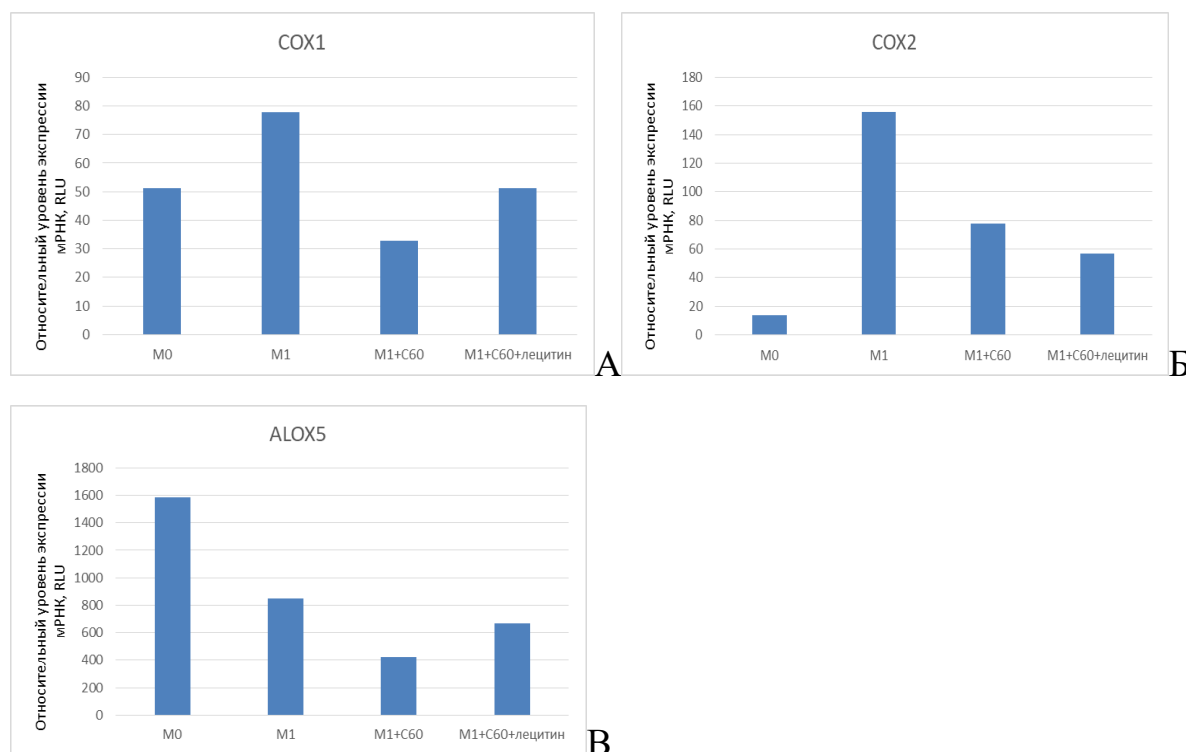


Рис. 142. Уровень экспрессии COX-1 (А), COX-2 (Б) и ALOX5 (В).

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM+MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60+лецитин - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ+лецитин, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Следует отметить, что увеличения экспрессии COX-2 при добавлении к фуллерену С60 лецитина не происходило.

Важнейшим этапом исследований в рамках разработки гипотезы механизма противовоспалительной активности фуллерена С60, являлась оценка способности лецитина влиять на показанную ранее ингибирующую активность фуллерена С60 в отношении провоспалительных цитокинов, в том числе TNF α , ИЛ-6, ИЛ-1 β и NF- κ B (Рис. 143).

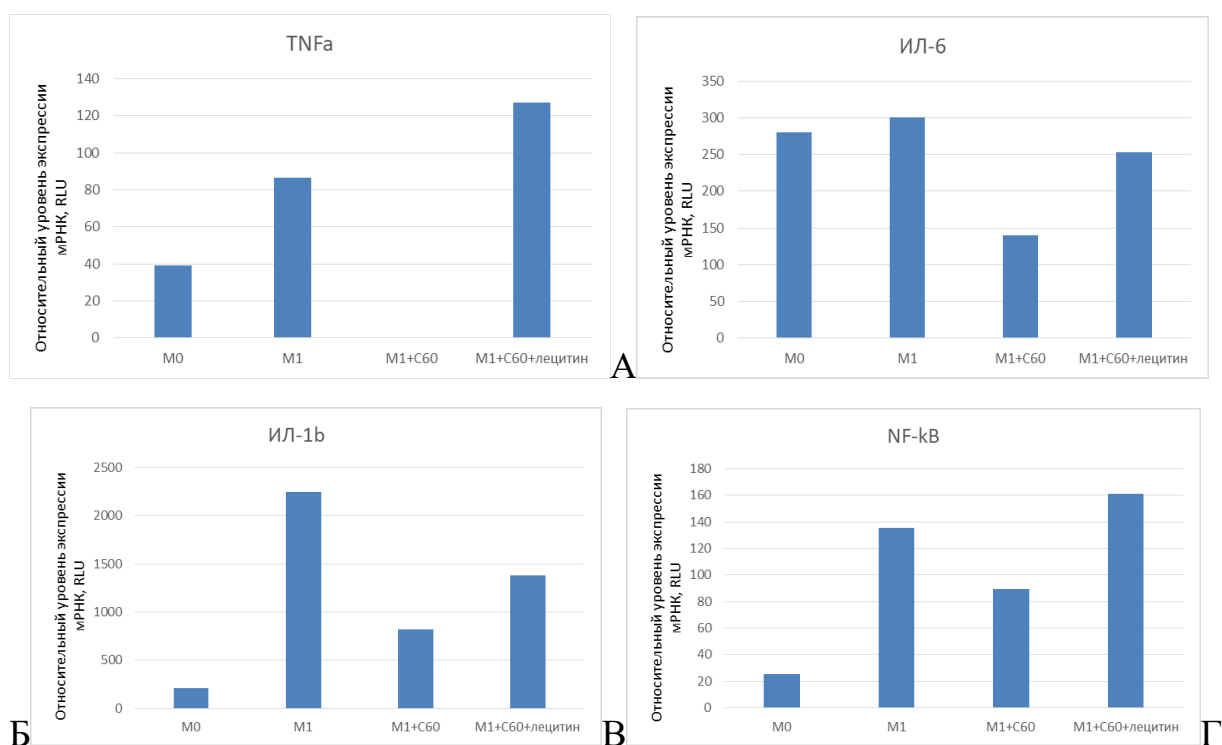


Рис. 143. Уровень экспрессии TNFα (А), ИЛ-6 (Б), ИЛ-1β (В) и NF-κB (Г).

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM+MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН-γ +ЛПС;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60+лецитин - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ+лецитин, а затем ИФН- γ +ЛПС.

На графиках видно, что уровень экспрессии TNFα, ИЛ-6 и ИЛ-1β повышен у клеток фенотипа M1. Также показано, что в присутствии фуллерена C60 экспрессия указанных цитокинов существенно падала. При этом добавление к фуллерену лецитина приводило к тому, что уровень экспрессии провоспалительных факторов TNFα, ИЛ-6 и ИЛ-1β снова повышался. Что касается фактора NF-κB, который играет значимую роль в классической поляризации макрофагов по фенотипу M1, то было показано, что его экспрессия действительно повышается при стимуляции ИФН-γ и ЛПС. Однако, при внесении фуллерена C60 в виде ВРФ наблюдалось явное

снижение экспрессии данного фактора. Лецитин же, находясь в смеси с фуллереном C60, препятствовал указанному эффекту и уменьшения экспрессии NF-κB в его присутствии не наблюдалось. Полученные данные могут говорить о способности ВРФ влиять на поляризацию макрофагов в сторону фенотипа M2, усиливая их противовоспалительную активность в зоне воспаления. Можно сделать предположение о том, что фуллерен C60 способен ингибировать индуцированную ЛПС дифференцировку макрофагов до фенотипа M1, стимулируя дифференцировку макрофагов до фенотипа M2, что сопровождается уменьшением секреции провоспалительных цитокинов.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что фуллерен C60, по-видимому, действительно способен взаимодействовать с лецитином, который ингибирует его противовоспалительную активность. Данный факт может свидетельствовать в пользу выдвинутой гипотезы и говорить о том, что механизм противовоспалительной активности фуллерена C60 связан с его способностью взаимодействовать с фосфолипидами мембран клеток, предотвращая развитие воспалительной реакции.

На следующем этапе исследований был проведен анализ влияния лецитина на показанную ранее способность фуллерена C60 стимулировать экспрессию фактора антиоксидантной защиты клеток Nrf2, который подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов в макрофагах (Рис. 144).

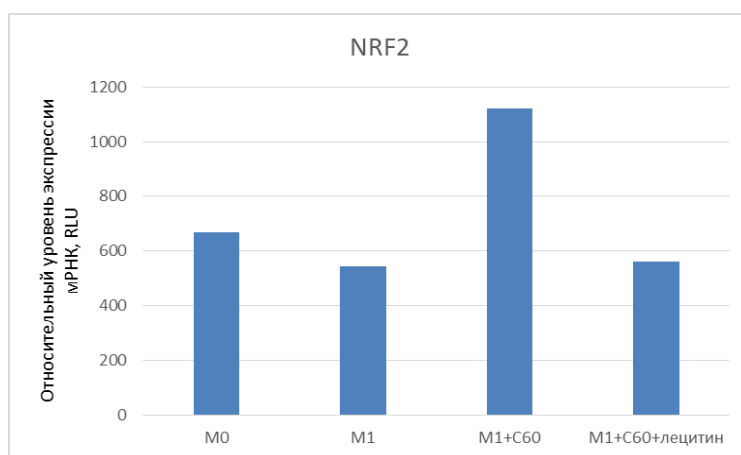


Рис. 144. Уровень экспрессии Nrf2.

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM+MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60+лецитин - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ+лецитин, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Было показано, что в присутствии фуллерена C60 экспрессия Nrf2 существенно повышалась. Однако, при добавлении к ВРФ свободного лецитина указанный эффект исчезал, что говорит, по-видимому, о способности фуллерена C60 усиливать степень антиоксидантной защиты клеток.

Далее, в продолжение исследований, был проведен анализ экспрессии такого цитокина, как ИЛ-10 (Рис. 145).

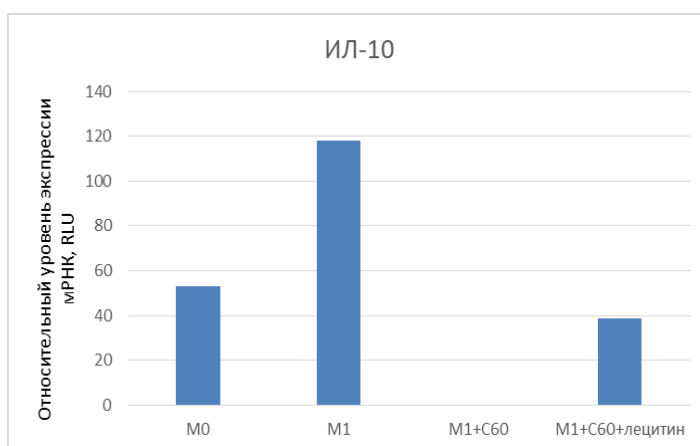


Рис. 145. Уровень экспрессии ИЛ-10.

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM+MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60+лецитин - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ+лецитин, а затем ИФН- γ +ЛПС.

Показано, что при стимуляции макрофагов фенотипа M0 до фенотипа M1 путем внесения ИФН- γ и ЛПС, экспрессия ИЛ-10 повышалась. Однако, при внесении ВРФ его экспрессия падала до ничтожных значений. Уменьшение экспрессии данного цитокина наблюдалась также и в присутствии ВРФ с лецитином, но в меньшей степени, что говорит, вероятно, о способности лецитина ингибировать активность фуллерена C60.

На следующем этапе работ была проанализирована экспрессия арил-углеводородного рецептора, лигандами которого являются, в том числе, метаболиты арахидоновой кислоты липоксин A4 и простагландин G (Рис. 146).

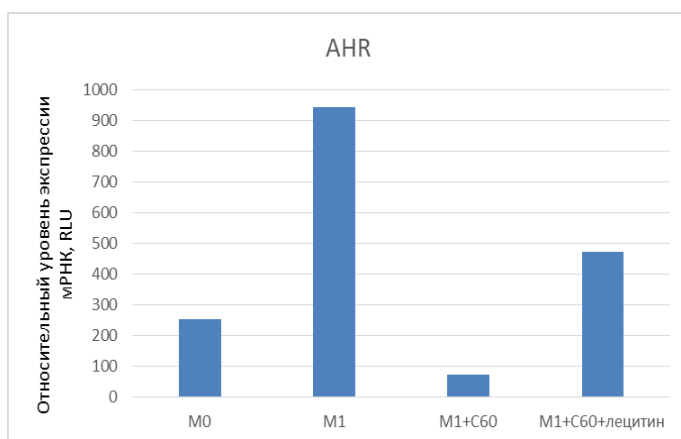


Рис. 146. Уровень экспрессии AHR.

M0 – клетки инкубировали в присутствии IMDM+MCSF;

M1 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, а затем - ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60 - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ, а затем ИФН- γ +ЛПС;

M1+C60+лецитин - клетки инкубировали в присутствии IMDM +MCSF, затем – ВРФ+лецитин, а затем ИФН- γ +ЛПС.

На графике видно, что экспрессия гена указанного рецептора повышалась при дифференцировке макрофагов до фенотипа M1 и блокировалась при внесении фуллерена C60. Показано также, что присутствие наряду с ВРФ лецитина заметно ингибировало активность ВРФ. Поскольку AhR действует как негативный регулятор иммунного ответа, ингибируя экспрессию противовоспалительных цитокинов (M2) [Climaco-Arvizu et al., 2016], можно сделать заключение о том, что лецитин ингибирует противовоспалительную активность фуллерена C60.

3.7. Изучение острой токсичности ВРФ

3.7.1. Кожная токсичность

Для оценки кожной токсичности ВРФ были проведены *in vivo* эксперименты на крысах. Крысам вводили ВРФ подкожно в холку или внутримышечно в область бедра в дозе 2 мг однократно. Группе

отрицательного контроля вводили воду для инъекций. Визуальный осмотр места инъекции проводился ежедневно. Поражения кожи для гистологического анализа были взяты через 7 дней наблюдений (Рис. 147).

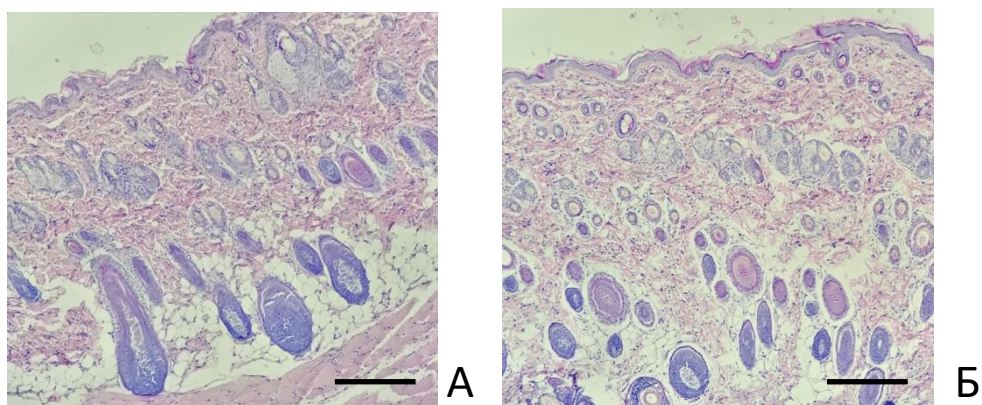
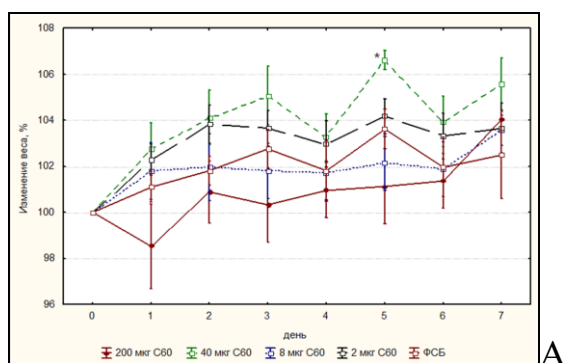


Рис. 147. Кожная токсичность ВРФ. Гистологические особенности (шкала 100 мкм). Крысам вводили ВРФ подкожно в холку в дозе 2 мг однократно (А). Группе отрицательного контроля вводили воду для инъекций (Б).

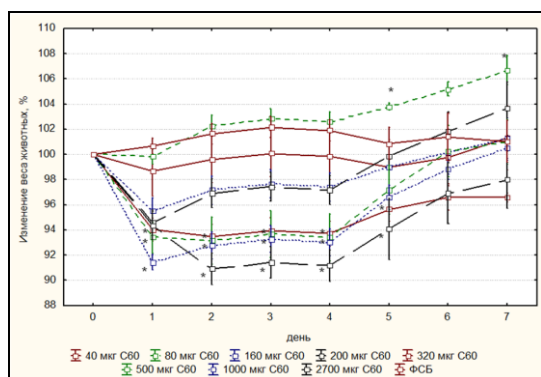
Было показано, что после п/к и в/м инъекций ВРФ крысам патологических изменений не наблюдалось.

3.7.2. Оценка изменения массы тела и поведения мышей

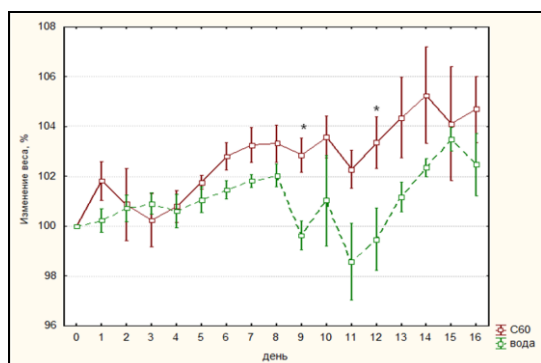
Токсическое действие препарата С60 изучено при однократном в/в, в/б и и/г введении. В течение 7 дней после его введения проводили мониторинг массы тела и поведенческих реакций мышей. После однократного в/в введения различных доз препарата падежа мышей зафиксировано не было. Кроме того, за все время наблюдения никаких изменений в поведении мышей не выявлено. Потери массы тела у мышей после введения фуллерена С60 в целом не наблюдается (Рис. 148).



А



Б



В

Рис. 148. Изменение массы тела мышей при однократном введении ВРФ в/в (А), в/б (Б) и и/г (В). * - $p \leq 0,05$

Однако при дозе 200 мкг происходит недостоверная потеря массы примерно на 1,5%, что составляет около 0,3 г. Такое изменение массы, на наш взгляд, находится в допустимом диапазоне неспецифических колебаний. Например, на 4—6-й дни наблюдений у животных контрольной группы отмечено подобное неспецифическое колебание массы тела. При введении небольших доз фуллерена (2 и 40 мкг) наблюдают тенденцию к лучшему набору массы тела у мышей. Таким образом, при в/в введении фуллерена токсических проявлений и изменения поведения животных выявлено не было. Потери массы тела у мышей тоже не наблюдали. Затем

было изучено токсическое действие различных доз ВРФ при введении в/б. Показано, что однократное в/б введение не приводит к падежу животных, а также не влияет на поведенческие реакции мышей в течение 7 дней наблюдения. Введение больших доз фуллерена C60 (500; 1000 и 2700 мкг) приводит к достоверному снижению массы тела животных. Важно, что уже на 6-й день наблюдений разница в весе опытных и контрольных животных перестает быть достоверной. На 7-й день мониторинга масса животных, получавших 500 мкг фуллерена C60 и не получавших препарат, выравнивается. При введении небольших доз фуллерена C60 (до 500 мкг) достоверной разницы между массой тела опытных и контрольных животных выявлено не было. Однако после 5-го дня наблюдений отмечено достоверное увеличение массы тела животных, получивших 80 мкг фуллерена C60. Для изучения токсического эффекта ВРФ при и/г введении препарат вводили в дозе 1000 мкг. Показано, что при однократном введении и/г фуллерена C60 гибели животных не происходило. Поведенческие реакции у животных контрольной и опытной групп не отличались. В процессе внешнего клинического осмотра не обнаружено никаких патологических изменений шерсти и кожи мышей, не наблюдали процессы экссудации, кровоизлияний, пролиферативные процессы; дефекация и мочеиспускание были регулярными и без патологических особенностей, кал и моча обычного цвета. Через час после введения фуллерена C60 у мышей была взята кровь на анализ содержания в ней введенного препарата. Анализ показал, что содержание фуллерена C60 в крови составляло более 100 нг/мл.

Средняя масса тела мышей в опытной группе статистически не отличалась от средней массы в контрольной группе. Ни у одного животного не выявили снижения массы тела относительно исходных значений. Кроме того, набор тела у животных, получивших фуллерен C60, происходил несколько лучше, чем в контрольной группе. На 9-й и 12-й дни наблюдений разница становилась даже достоверной. Однако в целом

введение фуллерена C60 не повлияло на набор животными массы тела. Таким образом, по совокупности полученных данных по изменению массы тела мышей и их поведения при однократном введении фуллерена C60 можно сделать вывод о том, что независимо от пути введения препарат не обладает токсическим эффектом.

3.7.3. Клиническая картина и гистологический анализ после введения ВРФ

Проведение некропсии у мышей после однократного интрагастрального введения ВРФ показало отсутствие у животных опытной и контрольной групп патологических признаков воспаления, некроза, геморагии, отека внутренних органов; внутренние полости тела не содержали свободной или осумкованной жидкости. Общего раздражающего действия исследуемого вещества и растворителя на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта отмечено не было. Процедура некропсии и результаты исследования показали следующее (Рис. 149).

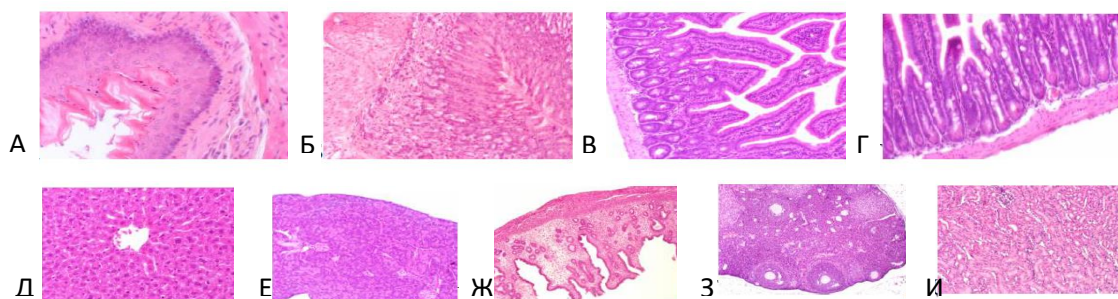


Рис. 149. Гистологическое исследование внутренних органов после введения ВРФ, окраска гематоксилин-эозин. А. Пищевод, увеличение 400. Б. Желудок, увеличение 400. В. Тощая кишка, увеличение 200. Г. Толстая кишка, увеличение 200. Д. Печень, увеличение 400. Е. Поджелудочная железа, увеличение 200. Ж. Матка, увеличение 100. З. Яичник, увеличение 100. И. Почка, увеличение 200.

Ротовая полость свободна, зубы сохранены, язык свободно вытаскивается из ротовой полости, подвижен. Просвет пищевода свободен, кардиальный сфинктер сжат, слизистая пищевода гладкая, серовато-розового цвета. Полость желудка заполнена измельченной непереваренной пищей, желудочным соком и небольшим количеством слизи, пилорический сфинктер сжат, тело желудка достаточно четко подразделяется на кардиальную и фундальную части, слизистая оболочка желудка умеренно складчатая, сероватого цвета. Просвет двенадцатиперстной и тощей кишки заполнен химусом и желчью, слизистая оболочка тонкого отдела кишечника серовато-розового цвета, илеоцекальный клапан состоятелен. Просвет толстого отдела кишечника заполнен каловыми массами, слизистая оболочка серовато-розового цвета. На всем протяжении желудочно-кишечного тракта не обнаружено явлений непроходимости, стенка его была нормальной толщины, слизистая оболочка была обычного вида. Исследовали также и пищеварительные железы: печень и поджелудочную железу, в которых внешних патологических изменений не было обнаружено. Печень красно-коричневого цвета, мягкой консистенции, умеренно кровенаполнена, желчный пузырь обычной формы, немного наполнен желчью. Поджелудочная железа расположена диффузно в брыжейке тонкой кишки. Брыжейка тонкой и подвздошной кишки обычного вида, содержит небольшое количество жира, сосуды и комплекс брыжеечных лимфатических узлов. Почки расположены в брюшной полости, темно-коричневого цвета, на разрезе корково-медуллярная дифференцировка сохранена, лоханка почки не расширена, конкрементов не обнаружено. Матка обычного вида, состоит из шейки, тела и двух рогов, миометрий не утолщен, в полости матки не содержится макроскопически видимой жидкости. Яичники обычного вида, бугристые, кист и выраженных образований не обнаружено. Не выявлено никаких патологических изменений, свидетельствующих за воспалительные, некробиотические, гипопластические или гиперпластические процессы,

дистрофии и атрофии, кровоизлияния и новообразования в органах и тканях мышц как в опытной, так и в контрольной группе. Пищевод в гистологических препаратах представлен полый гладкомышечной трубкой, выстланной изнутри многослойным плоским эпителием, снаружи пищевод покрыт адвентицией. Стенка желудка состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоев. Эпителиальный слой представлен однослойным железистым эпителием. Его клетки характеризуются ярко выраженной полярной дифференциацией. Железы желудка не атрофированы. Собственная пластинка построена из рыхлой соединительной ткани. Мышечная оболочка состоит из гладкомышечных клеток. Серозная оболочка построена из рыхлой соединительной ткани и снаружи покрыта мезотелием. Тонкий кишечник представлен трубчатым мышечным органом, который состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоя. Эпителиальный внутренний слой образует множество выпячиваний — кишечных ворсинок. Мышечный слой состоит из гладкой мышечной ткани. Серозный слой — из соединительной ткани, которая переходит на него с брыжейки. Толстый кишечник также представлен трубчатым мышечным органом, который состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоя. Но в отличие от тонкого отдела кишечника в толстом кишечные ворсинки отсутствуют. В слизистой оболочке тонкого и толстого отдела кишечника расположены кишечные железы. При микроскопическом исследовании печени отмечено сохранение балочно-радиарного расположения гепатоцитов, перипортальные и центролобулярные зоны без патологических особенностей. Микроскопическое строение поджелудочной железы характеризует ее нормальное развитие и функционирование: ацинусы и протоки железы сохранены, островки Лангерганса обычного вида. Матка состоит из трех слоев: серозного, мышечного и эпителиального. Эпителий матки и маточные железы в неактивном состоянии. Яичники имеют фолликулы

всех стадий созревания и единичные желтые тела. В почках клубочки, каналы и собирательные трубочки без видимой патологии.

Таким образом, макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов и тканей у подопытных животных показало отсутствие токсического и раздражающего действия водного раствора фуллерена.

3.8. Изучение хронической токсичности ВРФ

3.8.1. Оценка изменения массы тела и поведения мышей.

Хроническая токсичность ВРФ была изучена при многократном в/б введении. ВРФ вводили мышам ежедневно в течение месяца в дозе 400мкг/мышь со стабилизатором (Группа I, без осадка) и без стабилизатора (Группа II, с осадком), проводя мониторинг массы тела и поведенческих реакций животных. Контрольная группа III получала PBS. На 31 день в/б введения ВРФ падежа мышей зафиксировано не было. Кроме того, за все время наблюдения никаких изменений в поведении мышей также не было выявлено. Потери массы тела у мышей после введения фуллерена C₆₀ в целом не наблюдалось (Рис. 150).

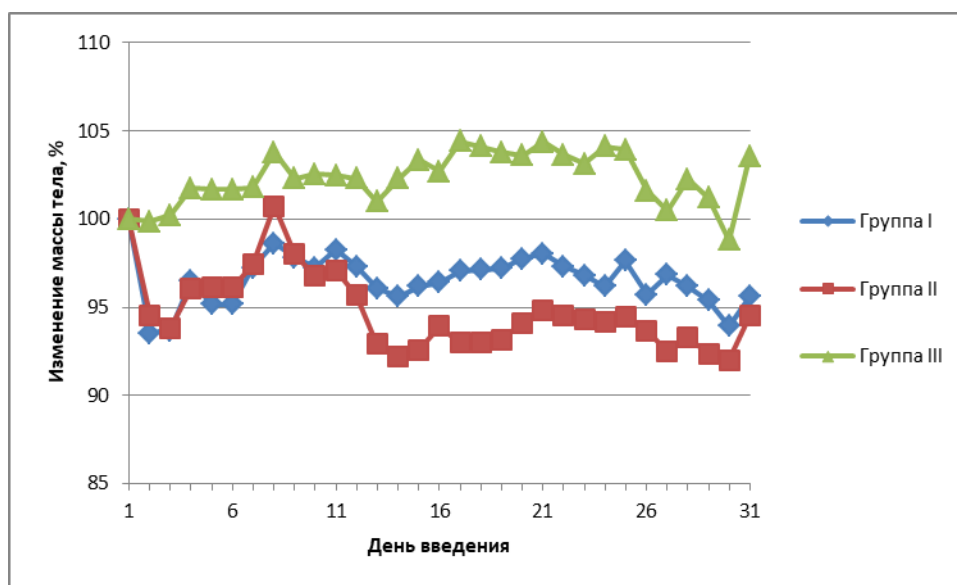


Рис. 150. Изменение массы тела мышей при многократном введении ВРФ в/б.

На графике видно, что изменение массы животных в рамках группы не превышает 5%. Разница в весе контрольной и опытных групп на 31 день

введения ВРФ не значительно отличается от уровня колебаний данного показателя в рамках группы отрицательного контроля и составляет 8%. Таким образом, можно сделать заключение о том, что вводимый препарат ВРФ не проявляет токсических эффектов, связанных со снижением массы тела, при многократном в/б введении.

3.8.2. Гистологический анализ. Патоморфологическое описание внутренних органов после многократного внутрибрюшинного введения ВРФ.

При макроскопическом исследовании в процессе necropsy мышей в группах, получавших фуллерен внутрибрюшинно в виде раствора без осадка и с осадком, были обнаружены одинаковые по выраженности и частоте встречаемости (у 100% животных в каждой группе) изменения: в брыжейке желудка, селезёнки и тонкого кишечника на всём её протяжении, в малом и большом сальнике, а также в свободной жировой ткани брюшной полости, в паранефральной клетчатке определяются полиморфные образования от нескольких миллиметров до 1,5 сантиметров в максимальном поперечнике, плотной консистенции, от светло-коричневого до почти чёрного цвета (интенсивность цвета зависит от величины образований). Располагались данные образования чаще скоплениями, реже одиночно. Несмотря на значительный объем патологических образований в брюшной полости, признаков компрессии сосудов, кишечника и паренхиматозных органов, выраженного изменения топографии внутренних органов, проявления кишечной непроходимости не было обнаружено. По всей вероятности данные образования являются депозитами исследуемого вещества или компонентов этого вещества, которые не подверглись всасыванию из брюшной полости. Данные депозиты, сформированные из макрофагов, нагруженных инородным для организма веществом — суспензией фуллерена, формировали гранулёмоподобные образования, фотографии микропрепаратов которых представлены на рисунках 151А, 151Б, 151В.

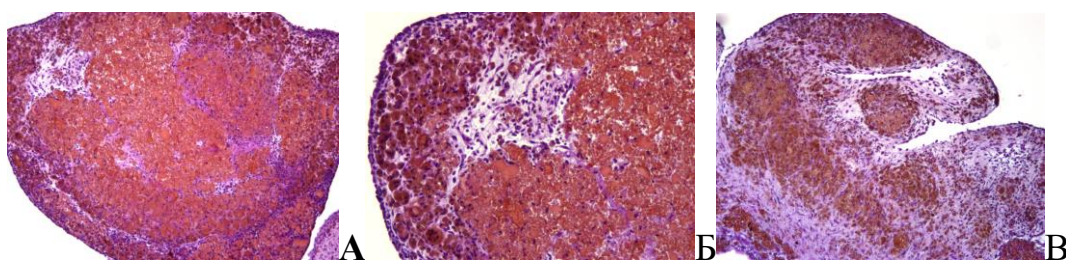


Рис. 151. Гранулёмоподобное образование, состоящее из депозитов инородного вещества, расположенного внутри- и внеклеточно. Гематоксилин-эозин, увеличение в 100 раз (А), увеличение в 200 раз (Б), гранулёмоподобное образование, состоящее из депозитов инородного вещества, расположенного внутри- и внеклеточно и активно развивающейся соединительной ткани. Гематоксилин-эозин, увеличение в 100 раз (В).

При микроскопическом исследовании данных гранулём видно, что состоят они из макрофагов (Рис. 152), которые в цитоплазме содержат зернистую субстанцию коричневого цвета, а также из свободнолежащих полиморфных гранул и глыбок этого же вещества, по-видимому, высвободившегося из разрушенных макрофагов или ещё не поглощённых ими.

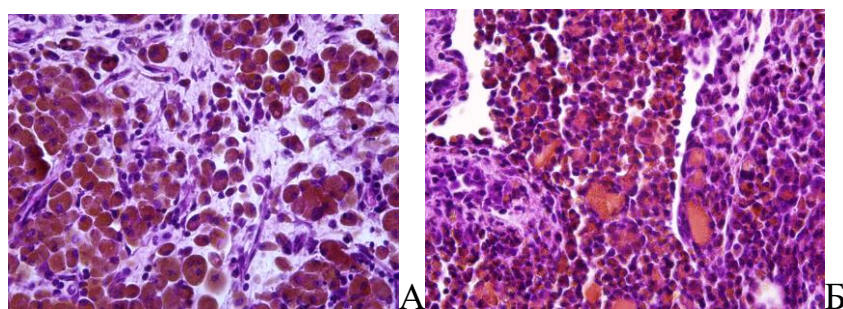


Рис. 152. Макрофаги, содержащие в цитоплазме инородное вещество буро-коричневого цвета, среди новообразованной соединительной ткани. Гематоксилин-эозин, увеличение в 400 раз (А), макрофаги, содержащие в цитоплазме инородное вещество буро-коричневого цвета. Гематоксилин-эозин, увеличение в 400 раз (Б).

Следует отметить, что в составе гранулём не отмечалось никакой воспалительной полинуклеарной реакции, наблюдалось лишь умеренное развитие соединительной ткани – пролиферация фибробластоподобных элементов. Макрофаги, содержащие инородный компонент, располагались преимущественно крупноочагово в жировой ткани сальников, а также располагались в перинефральной, перивариальной жировой клетчатке (Рис. 153А, Б, В), сами органы в окружении инфильтратов из макрофагов не были патологически изменены.

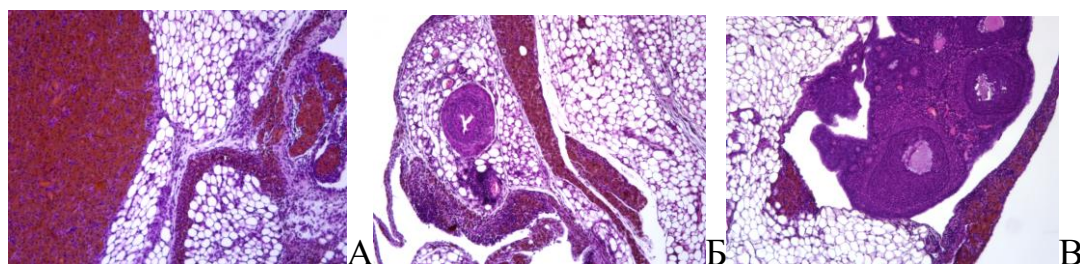


Рис. 153. Внутриклеточное отложение инородного вещества, расположенное очагово в жировой ткани сальника (А); внутриклеточное отложение инородного вещества, расположенное очагово в жировой паранефральной клетчатке (Б); внутриклеточное отложение инородного вещества, расположенное очагово в жировой перивариальной клетчатке. Яичник, показанный на микрофотографии, без патологических особенностей (В). Гематоксилин-эозин, увеличение в 100 раз.

Обращает на себя внимание то, что в группе мышей, получавших раствор фуллерена без осадка, в единичных случаях наблюдалось расположение макрофагов, содержащих фуллерен, в паратимических лимфатических узлах (Рис. 154А, Б, В, Г) и в альвеолах лёгких (Рис. 155А, Б).

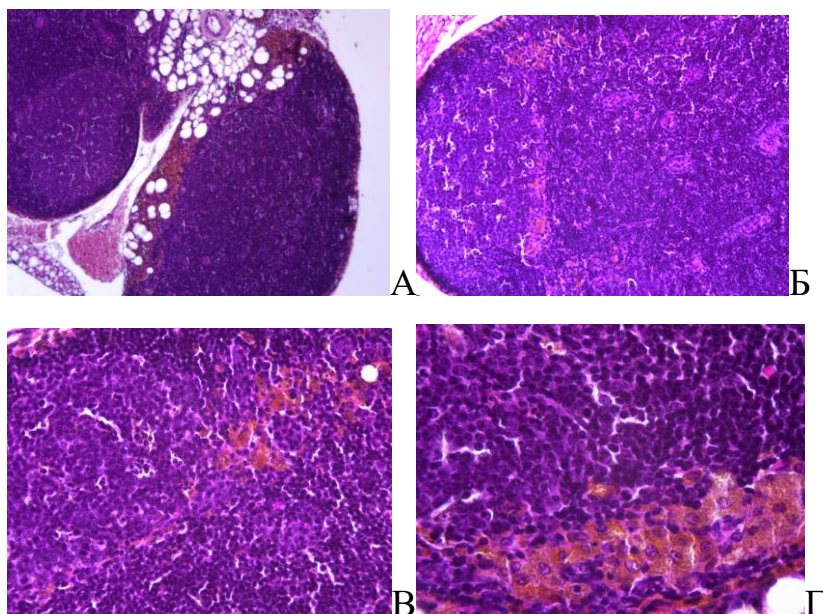


Рис. 154. Внутриклеточное накопление инородного вещества в жировой ткани, окружающей паратимические лимфатические узлы. Лимфатический узел, показанный на микрофотографии, без патологических изменений. Гематоксилин-эозин, увеличение в 100 раз (А); накопление инородного вещества в макрофагах, расположенных в мозговом веществе и вблизи герминативного центра в паратимическом лимфатическом узле. Лимфатический узел, показанный на микрофотографии, без патологических изменений. Гематоксилин-эозин, увеличение в 200 раз (Б); накопление инородного вещества в макрофагах, расположенных в мозговом веществе и вблизи герминативного центра в паратимическом лимфатическом узле. Лимфатический узел, показанный на микрофотографии, без патологических изменений. Гематоксилин-эозин, увеличение в 400 раз (В); накопление инородного вещества в макрофагах, расположенных в мозговом веществе и вблизи герминативного центра в паратимическом лимфатическом узле. Лимфатический узел, показанный на микрофотографии, без патологических изменений. Гематоксилин-эозин, увеличение в 600 раз (Г).

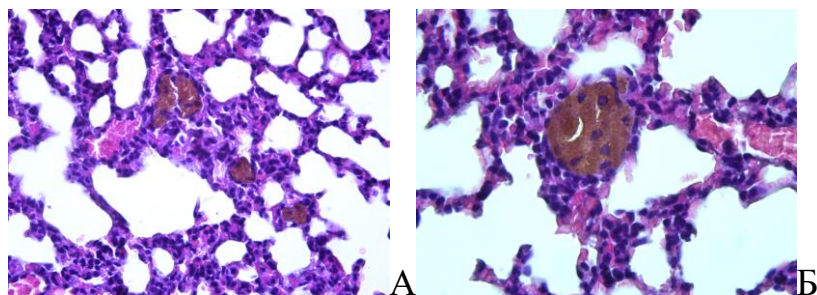


Рис. 155. Накопление инородного вещества в макрофагах, расположенных в альвеолах лёгкого. Гематоксилин-эозин, увеличение в 400 раз (А); накопление инородного вещества в макрофагах, расположенных в альвеолах лёгкого. Гематоксилин-эозин, увеличение в 600 раз (Б). Лёгкое, показанное на микрофотографии, без патологических изменений.

В обеих группах мышей, получавших фуллерен с осадком и без осадка, макроскопический анализ всех остальных внутренних органов не выявил иных патологических изменений и отличий от группы контроля в топографическом расположении, цвете, консистенции, форме, размере внутренних органов. Не было обнаружено также некрозов, геморрагий, свободной и осумкованной жидкости в серозных полостях организма.

При микроскопическом анализе сердца, тимуса, лёгких, печени, селезёнки, тонкого и толстого отдела кишечника, поджелудочной железы (Рис. 156), почек, надпочечников, матки, яичников и лимфатических узлов (Рис. 157) в группах мышей, получавших раствор фуллерена без осадка и с осадком, структурной патологии, некроза, воспаления, геморрагий, признаков дистрофических и дегенеративных процессов, гипоплазии или гиперплазии, нарушения кровообращения не было обнаружено.

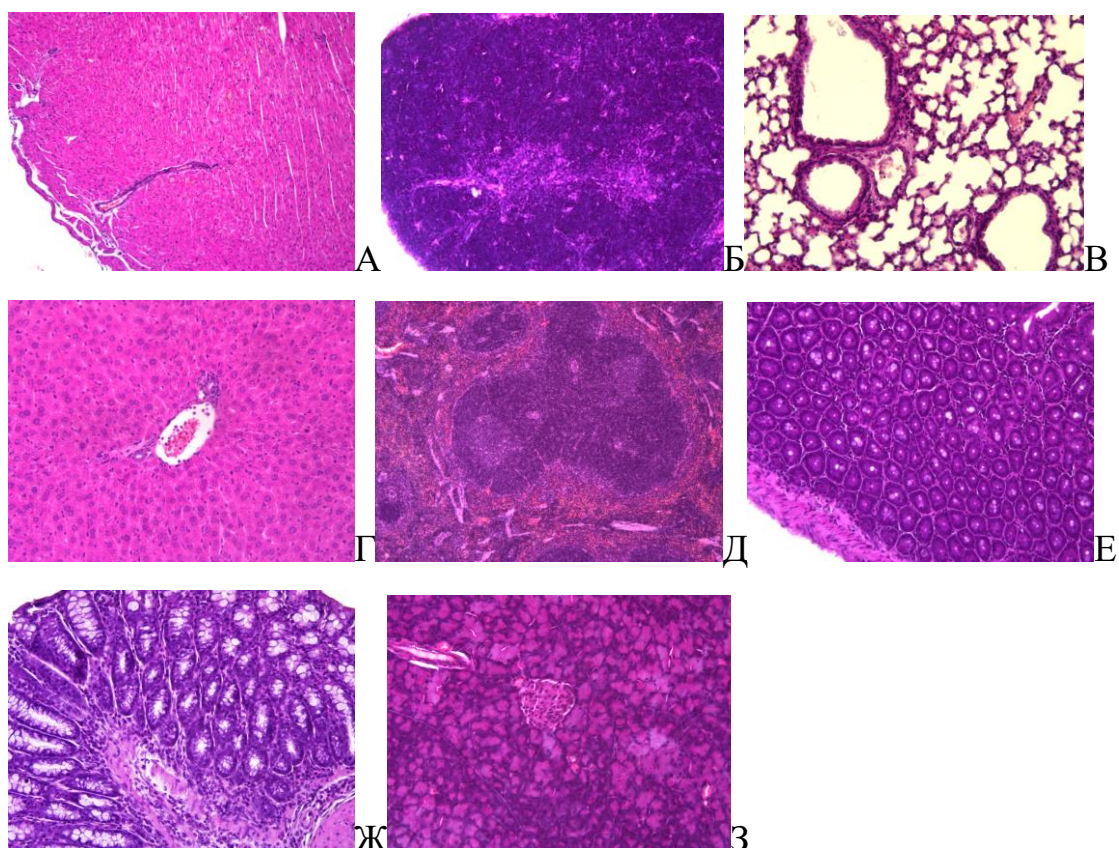


Рис. 156. Миокард сердца после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань сердца без патологических изменений, увеличение в 100 раз (А); тимус после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань тимуса без патологических изменений, увеличение в 200 раз (Б); лёгкое после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань лёгкого без патологических изменений, увеличение в 200 раз (В); печень после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань печени без патологических изменений, увеличение в 200 раз (Г); селезёнка после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань селезёнки без патологических изменений, увеличение в 100 раз (Д); тонкий отдел кишечника после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань кишечника без патологических изменений, увеличение в 200 раз (Е); толстый отдел кишечника после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань кишечника без

патологических изменений, увеличение в 200 раз (Ж); поджелудочная железа после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань железы без патологических изменений, увеличение в 200 раз (З). Окраска - гематоксилин-эозин.

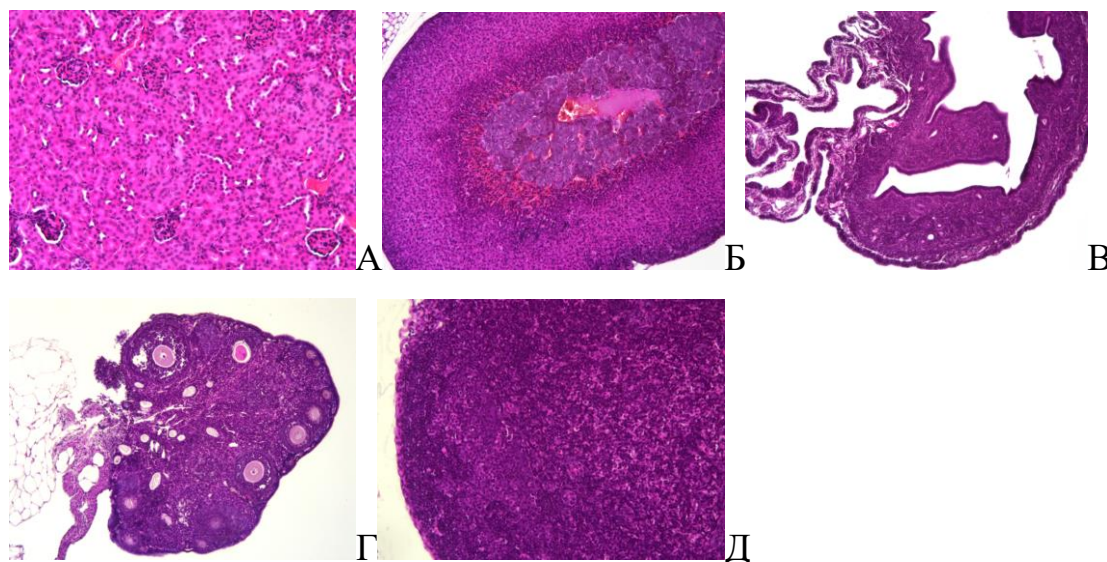


Рис. 157. Почка после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань почки без патологических изменений, увеличение в 200 раз (А); надпочечник после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань надпочечника без патологических изменений, увеличение в 100 раз (Б); матка после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань матки без патологических изменений, увеличение в 100 раз (В); яичник после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань яичника без патологических изменений, увеличение в 100 раз (Г); лимфатический узел брыжеечный после многократного внутрибрюшинного введения С60. Микрофотография демонстрирует ткань лимфоузла без патологических изменений, увеличение в 200 раз (Д). Окраска - гематоксилин-эозин.

Увеличение относительной и абсолютной массы селезенки в обеих группах животных относительно контроля возможно связано с функциональными изменениями органа и это увеличение не выходит за пределы границ физиологической нормы, данные массы органов мышей представлены в таблице 29.

Табл. 29. Абсолютная и относительная масса внутренних органов мышей, получавших многократно внутрибрюшинно раствор фуллерена с осадком и без осадка, $M \pm m$

Группы Показатели	№ групп		
	1 (без осадка)	2 (с осадком)	3 (контроль)
масса тела, г	$19,40 \pm 0,26$	$21,87 \pm 0,74$	$20,04 \pm 0,25$
печень, г	$0,94 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,06$
печень, %	$4,79 \pm 0,13$	$4,36 \pm 0,14$	$4,93 \pm 0,28$
почки, г	$0,24 \pm 0,009$	$0,24 \pm 0,009$	$0,24 \pm 0,02$
почки, %	$1,19 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,09$
сердце, г	$0,08 \pm 0,001$	$0,09 \pm 0,003$	$0,09 \pm 0,002$
сердце, %	$0,43 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$
легкие, г	$0,11 \pm 0,004$	$0,12 \pm 0,009$	$0,11 \pm 0,003$
легкие, %	$0,56 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,05$	$0,58 \pm 0,01$
тимус, г	$0,04 \pm 0,006$	$0,03 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,009$
тимус, %	$0,19 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,04$
селезенка, г	$0,13 \pm 0,005 *$	$0,12 \pm 0,009 *$	$0,08 \pm 0,006$
селезенка, %	$0,67 \pm 0,03 *$	$0,53 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,131$

*-достоверно отличается от контроля ($\leq 0,05$)

Далее, проводилось гематологическое исследование периферической крови мышей каждой группы. Кровь брали пулом для каждой группы в пробирки с ЭДТА, определение гематологических показателей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet, (Diatron, Австрия). Из крови готовили мазки на предметных стёклах, фиксировали в метаноле и окрашивали коммерческим набором красителей

по методу Романовского-Гимза. В мазках подсчитывали 100 лейкоцитов на микроскопе LEICA DM 2000, (Leica, Германия).

Данные гематологического исследования представлены в таблице 30.

Табл. 30. Показатели общего клинического анализа крови мышей, получавших раствор фуллерена с осадком и без осадка многократно внутрибрюшинно, $M \pm m$.

Показатель	Номера групп животных		
	1 (без осадка)	2 (с осадком)	3 (контроль)
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	9,65	10,32	10,44
Гемоглобин, г/л	161	164	176
Гематокрит, %	40,23	45,83	48,18
Средний объем эритроцита, фл	42	44	46
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН), пг	16,7	15,9	16,8
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (МСНС), г/л	401	359	365
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	960	899	981
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	7,26	6,72	11,07
Нейтрофилы палочкоядерные, %	1	3	2
Нейтрофилы палочкоядерные, $\times 10^9/л$	0,073	0,202	0,221
Нейтрофилы сегментоядерные, %	41	38	27
Нейтрофилы сегментоядерные, $\times 10^9/л$	2,97	2,55	2,99
Эозинофилы, %	2	4	4
Эозинофилы, $\times 10^9/л$	0,145	0,269	0,443
Моноциты, %	3	1	1
Моноциты, $\times 10^9/л$	0,218	0,067	0,111
Лимфоциты, %	53	54	66
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	3,85	3,63	7,31

Показано, что патологических изменений по показателям периферической крови ни в одной группе животных обнаружено не было.

Таким образом, из представленных исследований можно сделать вывод, что исследуемое вещество (ВРФ), введенное в виде раствора без осадка или с осадком, не оказывает раздражающего и токсического действия на организм мышей самок. Однако фуллерен C60, будучи инородным, вызывает сильновыраженную макрофагальную реакцию с накоплением в брюшной полости и формированием гранулёмоподобного, но не воспалительного процесса, возможно ввиду отсутствия цитотоксического эффекта на фагоциты.

3.9. Изучение фармакокинетики и кинетики выведения фуллерена C60

Когда идет речь о потенциальном медицинском применении новых соединений, вопросы об их биораспределении, фармакокинетики и выведении являются одними из важнейших. Для этой цели был разработан чувствительный и специфичный метод анализа, основанный на экстракции фуллерена из биологических проб с использованием специальных картриджей, с последующей высокоэффективной хроматографией и тандем-селективной масс-спектрометрической детекцией фуллерена.

3.9.1. Анализ фармакокинетики фуллерена C60 при накожном нанесении

Накожное нанесение водного раствора фуллерена C60 мышам показало отсутствие какого-либо всасывания в кровь и, как следствие, отсутствие фуллерена в исследованных внутренних органах. Однако фуллерен обнаруживался в коже в течение 6 часов после нанесения (Рис. 158). Динамика изменения концентрации фуллерена C60 представлена в таблице 31, а фармакокинетические параметры – в таблице 32.

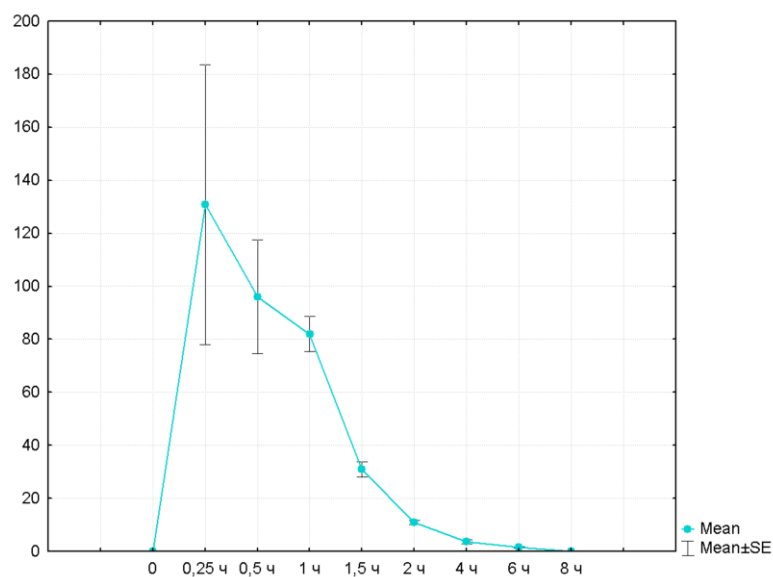


Рис. 158. Фармакокинетическая кривая присутствия фуллерена C60 в коже мышей после накожного нанесения.

Табл. 31. Динамика изменения концентраций фуллерена в коже мышей после накожного нанесения, нг/мл

Показатель	Время после нанесения препарата, час								
	0	0,25	0,5	1	1,5	2	4	6	8
Mean	нп о	130,83	96,06	82,03	30,91	10,87	3,67	1,60	нпо
GMean	-	112,35	90,57	81,48	30,62	10,80	3,47	1,56	-
SD	-	91,56	37,25	11,62	5,08	1,44	1,46	0,44	-
CV	-	69,99	38,78	14,16	16,44	13,29	39,75	27,56	-
Median	-	89,57	103,7	81,52	31,74	11,64	3,66	1,52	-

*нпо – ниже предела определения.

Табл. 32. Фармакокинетические параметры фуллерена C60 в органах и тканях после кожного введения ВРФ в дозе 20 мкг/мышь

Биообъект	Фармакокинетический параметр								
	C _{max} , нг/мл	T _{max} , ч	AUC _{0-t} , нг*ч ⁻¹	AUC _{0-inf} , нг*ч ⁻¹	AUC _{0-t} / AUC _{0-inf} , %	l _z , ч ⁻¹	T1/2, ч	MRT, ч	Cl, мл/мин
Селезенка	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Печень	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Почки	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Легкие	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Мозг	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кожа	130,83	0,25	142,95	145,6	98,18	0,604	1,48	1,22	-
Кровь	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии всасывания фуллерена в кровь при кожном применении, что говорит о минимизации потенциальных побочных эффектов и токсичности фуллерена. Детектирование фуллерена в коже животных в течение 6 часов после нанесения подтверждает его местную активность и доказывает перспективность использования ВРФ в качестве средства для терапии аллергических заболеваний кожи.

3.9.2. Анализ фармакокинетики фуллерена C60 при интрагастральном введении

При интрагастральном введении мышам ВРФ (в дозе 150мкг/мышь), фуллерен C60 определялся во всех исследуемых органах и тканях, за исключением кожи. Динамика концентрации фуллерена C60 во внутренних органах представлена в таблице 33.

Табл. 33. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 во внутренних органах мышей после интрагастрального введения ВРФ, нг/мг органа

Орган		Время после введения препарата, час								
		0	0,25	0,5	1	1,5	2	4	6	8
Селезенка	Mean	нпо	2,32	5,71	3,38	1,76	нпо	нпо	нпо	нпо
	GMean	-	2,06	5,67	3,32	1,71	-	-	-	-
	SD	-	1,30	0,78	0,83	0,57	-	-	-	-
	CV	-	56,21	13,58	24,53	32,37	-	-	-	-
	Median	-	2,16	5,39	3,09	1,55	-	-	-	-
Печень	Mean	нпо	1,53	6,30	10,71	9,21	6,28	2,36	1,08	нпо
	GMean	-	1,48	5,74	10,10	8,75	6,28	2,21	1,08	-
	SD	-	0,46	2,89	4,60	3,28	0,33	0,93	0,06	-
	CV	-	30,19	45,84	42,90	35,63	5,25	39,48	5,24	-
	Median	-	1,65	7,46	9,34	10,43	6,29	2,82	1,08	-
Почки	Mean	нпо	нпо	3,49	8,89	8,91	5,91	3,95	1,89	нпо
	GMean	-	-	3,32	8,81	8,39	5,70	3,58	1,85	-
	SD	-	-	1,23	1,42	3,50	1,95	2,27	0,47	-
	CV	-	-	35,17	15,92	39,24	33,09	57,40	24,80	-
	Median	-	-	3,90	9,54	9,63	5,31	2,88	1,72	-
Легкие	Mean	нпо	нпо	1,92	5,52	6,11	4,89	1,74	1,04	нпо
	GMean	-	-	1,87	5,47	5,68	4,06	1,70	1,04	
	SD	-	-	0,56	0,92	2,62	3,51	0,48	-	
	CV	-	-	29,21	16,76	42,84	71,87	27,66	-	
	Median	-	-	1,65	5,41	6,57	3,99	1,70	1,04	
Мозг	Mean	нпо	нпо	нпо	1,78	4,23	3,05	1,69	нпо	нпо
	GMean	-	-	-	1,58	3,59	3,00	1,64	-	-
	SD	-	-	-	1,10	2,57	0,69	0,47	-	-
	CV	-	-	-	62,11	60,68	22,69	27,59	-	-
	Median	-	-	-	1,18	4,48	2,90	1,89	-	-

Нпо – ниже предела определения.

Фармакокинетическая кривая присутствия фуллерена C60 во внутренних органах мышей после интрагастрального введения ВРФ представлена на рисунке 159.

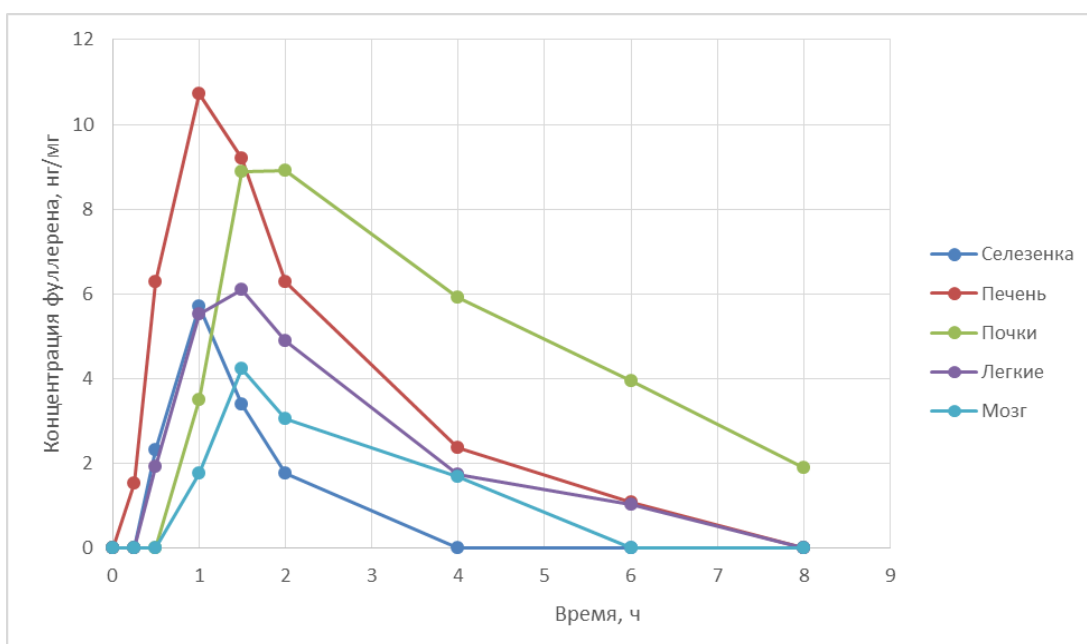


Рис. 159. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 во внутренних органах мышей после интрагастрального введения ВРФ.

Анализ количественного содержания фуллерена C60 в сыворотке крови после интрагастрального введения ВРФ представлен в таблице 34.

Табл. 34. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 в сыворотке крови мышей после интрагастрального введения ВРФ, нг/мл

Показатель	Время после нанесения препарата, час								
	0	0,25	0,5	1	1,5	2	4	6	8
Mean	нпо	3,24	13,76	7,09	5,68	3,29	1,59	1,12	нпо
GMean	-	2,93	12,80	5,34	5,30	3,09	1,52	1,12	-
SD	-	1,58	6,51	6,42	2,37	1,26	0,61	-	-
CV	-	48,84	47,30	90,53	41,83	38,23	38,13	-	-
Median	-	3,51	11,87	4,55	6,07	3,83	1,25	1,12	-

Нпо – ниже предела определения.

Результат анализа фармакокинетических параметров представлен в таблице 35.

Табл. 35. Фармакокинетические параметры фуллерена C60 в органах и тканях интрагастрального введения ВРФ в дозе 150 мкг/мышь

Биообъект	Фармакокинетический параметр								
	C _{max} , нг/мл	T _{max} , ч	AUC _{0-t} , нг*ч ⁻¹	AUC _{0-inf} , нг*ч ⁻¹	AUC _{0-t} / AUC _{0-inf} , %	l _z , ч ⁻¹	T _{1/2} , ч	MRT,ч	Cl, мл/мин
Селезенка	5,71	1	6,05	7,55	80,13	1,176	0,59	1,48	-
Печень	10,71	1	24,99	26,31	94,98	0,552	1,26	2,4	-
Почки	8,91	2	39,22	46,71	83,96	0,252	2,75	4,98	-
Легкие	6,11	1,5	15,82	16,35	96,76	0,659	1,95	2,43	-
Мозг	4,23	1,5	8,81	13,69	64,35	0,346	2,01	3,88	-
Кожа	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кровь	13,76	0,5	19,28	19,93	96,74	0,568	1,22	1,95	752,15

Фармакокинетическая кривая присутствия фуллерена C60 в сыворотке крови мышей после интрагастрального введения ВРФ представлена на рисунке 160.

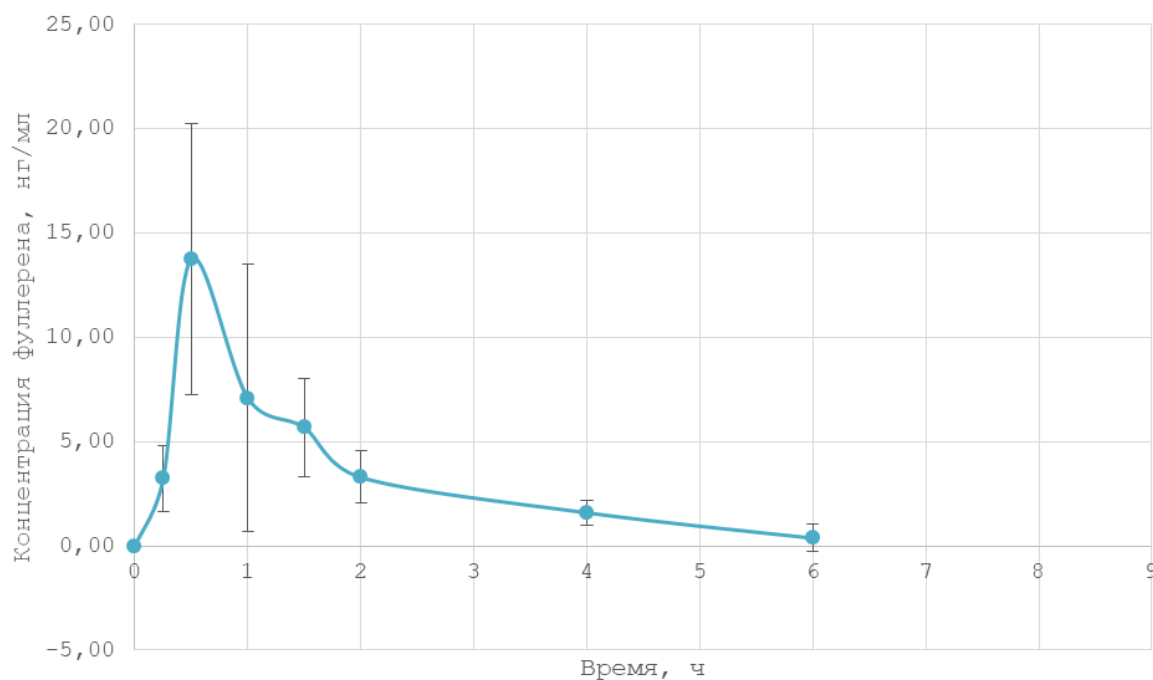


Рис. 160. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 в сыворотке крови мышей после интрагастрального введения ВРФ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при интрагастральном введении ВРФ наблюдается всасывание фуллерена C60 в

кровь и наличие распределения его по органам. При этом Через 8 часов в крови фуллерен C60 уже не обнаруживался. Что касается выведения из внутренних органов, то видно, что из селезенки он выводится уже через 4 часа, в мозге он не обнаруживается через 6 часов, а в печени, почках и легких – через 8 часов от момента введения ВРФ.

3.9.3. Анализ фармакокинетики фуллерена C60 при внутривенном введении

Было показано, что при внутривенном введении ВРФ (10мкг/мышь) максимум концентрации фуллерена C60 в сыворотке наблюдался уже через 2 мин, но через 8-10 часов его концентрация снижалась почти до 0 (Рис. 161, Табл. 36).

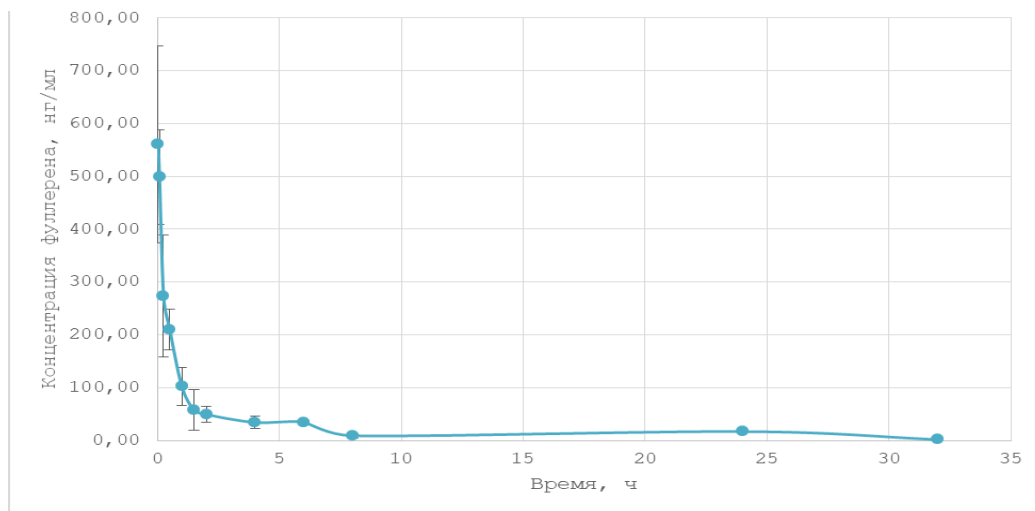


Рис. 161. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 в крови мышей после в/в введения.

Табл. 36. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 в сыворотке крови мышей после внутривенного введения, нг/мл

Показатель	Время после введения препарата, час													
	0	0,03	0,083	0,025	0,5	1	1,5	2	4	6	8	24	32	48
Mean	нп о	560 ,7	498 ,6	273 ,4	210 ,6	102 ,1	57, 7	49, 3	34, 1	34, 6	9,1	16, 9	1,8	нп о
GMean	-	542 ,5	472 ,8	264 ,6	190 ,0	96, 9	50, 6	41, 0	31, 6	33, 2	8,9	16, 5	1,6	-
SD	-	163 ,4	186 ,1	89, 3	114 ,8	38, 6	36, 6	38, 1	15, 4	11, 8	2,3	4,2	1,0	-
CV	-	29, 2	37, 3	32, 7	54, 5	37, 8	63, 4	77, 4	45, 1	34, 2	25, 6	24, 8	56, 7	-
Median	-	639 ,1	528 ,5	229 ,5	187 ,0	102 ,9	45, 3	29, 8	34, 1	33, 1	8,9	18, 7	1,8	-

Далее, в рамках анализа кинетики распределения фуллерена C60 была изучена динамика изменения концентрации фуллерена C60 во внутренних органах при внутривенном введении ВРФ (Рис. 162, Табл.37).

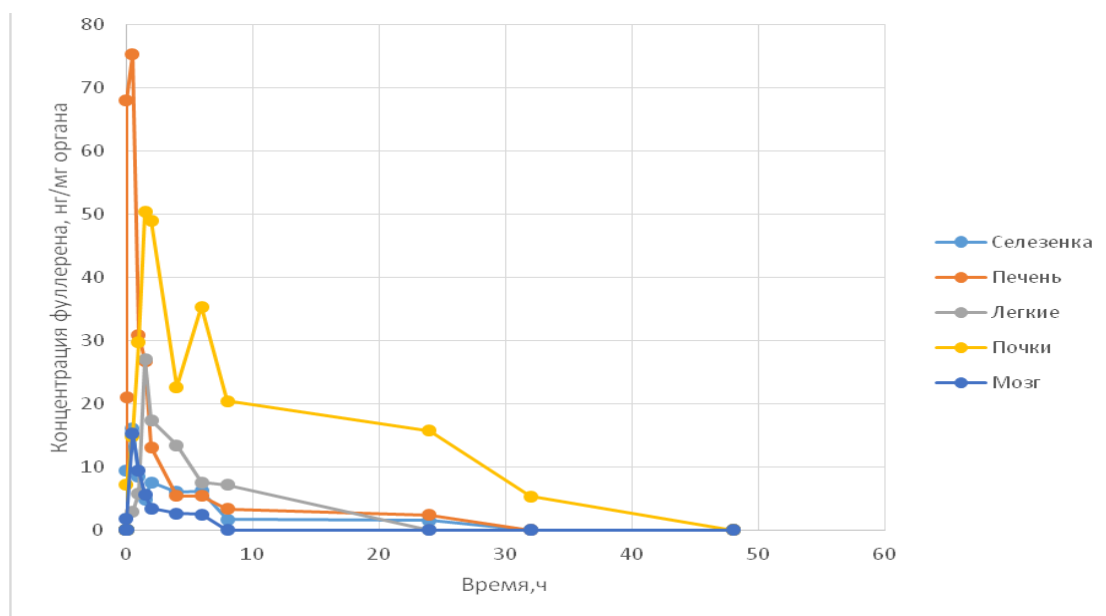


Рис. 162. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 во внутренних органах мышей после в/в введения ВРФ.

Табл. 37. Динамика изменения концентрации фуллерена C60 во внутренних органах мышей после внутривенного введения ВРФ, нг/мг органа

Орган		Время после введения препарата, час													
		0	0,03	0,083	0,025	0,5	1	1,5	2	4	6	8	24	32	48
Селезенка	Mean	нпо	нпо	нпо	9,38	16,10	8,45	4,87	7,52	6,06	6,23	1,65	1,55	нпо	нпо
	GMean	-	-	-	9,16	15,62	7,51	3,01	7,30	5,92	6,14	1,59	1,47	-	-
	SD	-	-	-	2,60	4,49	4,57	5,69	2,08	1,50	1,33	0,59	0,66	-	-
	CV	-	-	-	27,70	27,90	54,10	116,81	27,66	24,70	21,36	35,46	42,56	-	-
	Median	-	-	-	7,92	18,20	8,59	2,00	8,13	6,87	5,79	1,39	1,55	-	-
Печень	Mean	нпо	нпо	21,06	68,04	75,33	30,93	26,77	13,10	5,36	5,36	3,37	2,39	нпо	нпо
	GMean	-	-	20,36	67,09	68,86	30,76	25,49	10,15	5,15	5,15	3,34	2,35	-	-
	SD	-	-	6,26	13,38	35,28	4,04	10,28	11,87	1,82	1,82	0,48	0,51	-	-
	CV	-	-	29,73	19,66	46,84	13,06	38,41	90,64	33,88	33,88	14,26	21,35	-	-
	Median	-	-	23,43	75,23	81,25	29,32	24,77	6,35	5,46	5,46	3,48	2,37	-	-
Почки	Mean	нпо	нпо	нпо	7,12	14,86	29,79	50,49	49,03	22,63	35,33	20,41	15,71	5,34	нпо
	GMean	-	-	-	7,07	13,45	29,57	48,54	47,56	21,71	28,79	20,09	15,24	3,26	-
	SD	-	-	-	1,02	7,98	4,42	16,03	14,75	8,13	28,13	4,41	4,79	5,98	-
	CV	-	-	-	14,40	53,75	14,82	31,75	30,09	35,91	79,62	21,62	30,50	112,02	-
	Median	-	-	-	6,77	13,20	29,30	57,00	47,17	20,55	23,46	20,23	14,66	5,34	-
Легкие	Mean	нпо	нпо	нпо	2,83	5,83	27,07	17,38	13,41	7,56	7,15	нпо	нпо	нпо	нпо
	GMean	-	-	-	2,80	5,68	26,41	14,22	13,27	6,76	6,79	-	-	-	-
	SD	-	-	-	0,52	1,53	7,61	13,41	2,36	3,80	2,65	-	-	-	-
	CV	-	-	-	18,26	26,20	28,12	77,14	17,58	50,27	37,13	-	-	-	-
	Median	-	-	-	2,58	6,26	23,90	12,61	14,13	8,71	7,46	-	-	-	-
Мозг	Mean	нпо	нпо	нпо	1,13	10,22	6,67	7,62	3,28	2,37	1,92	нпо	нпо	нпо	нпо
	GMean	-	-	-	1,72	22,61	14,63	3,64	3,63	2,08	3,47	-	-	-	-
	SD	-	-	-	2,47	13,28	6,9	5,77	3,32	3,46	2,02	-	-	-	-
	CV	-	-	-	1,13	10,22	6,67	7,62	3,28	2,37	1,92	-	-	-	-
	Median	-	-	-	1,72	22,61	14,63	3,64	3,63	2,08	3,47	-	-	-	-

Нпо – ниже предела определения.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные для внутривенного введения, являются самыми информативными (Табл. 38).

Табл. 38. Фармакокинетические параметры фуллерена C60 при внутривенном введении ВРФ.

Биообъект	Фармакокинетический параметр								
	$C_{\max}$, нг/мл	$T_{\max}$, ч	AUC_{0-t} , нг*ч ⁻¹	$AUC_{0-\infty}$, нг*ч ⁻¹	$AUC_{0-\infty} / AUC_{0-t}$, %	l_z , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, ч	MRT, ч	Cl, мл/мин
Селезенка	16,1	0,5	74,94	96,62	77,56	0,071	9,69	14,44	-
Печень	75,33	0,5	160,69	213,84	75,15	0,045	1,41	15,91	-
Почки	50,49	1,5	604,59	697,08	86,73	0,058	12,01	17,38	-
Легкие	27,07	1	63,37	99,77	63,52	0,196	3,53	5,73	-
Мозг	15,37	0,5	25,48	36,32	70,14	0,228	3,04	4,68	-
Кожа	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кровь	560,68	-	749,93	771,55	97,19	0,083	8,38	9,39	259,2

$C_{\max}$ – максимальная концентрация;

$T_{\max}$ – время достижения максимальной концентрации;

AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой в пределах длительности наблюдений;

$C_{\max} / AUC_{0-t}$ – по индивидуальным значениям (характеристика скорости всасывания),

$T_{1/2}$ – период полувыведения.

После внутривенного введения мышам фуллерен C60 определялся во всех исследуемых органах и тканях, за исключением кожи. Было показано, что фуллерен C60 обнаруживался в селезенке, печени и легких в течение 24 часов. В почках фуллерен C60 фиксировался в течение 48 часов. Важным результатом анализа являлось то, что фуллерен C60 способен проникать через гематоэнцефалический барьер в мозг, где он обнаруживался в течение 8 часов. На графике видно, что через 48 часов фуллерен C60 во внутренних органах уже не определялся, что

свидетельствует о достаточно быстром его метаболизме или выведении из организма.

3.9.4. Анализ кинетики выведения фуллерена C60 из организма при внутривенном введении

Оценка кинетики выведения фуллерена C60 из организма была проведена на мышах линии BALB/с и оценивалась по содержанию фуллерена в моче и кале. Результаты анализа представлены на рисунке 163.

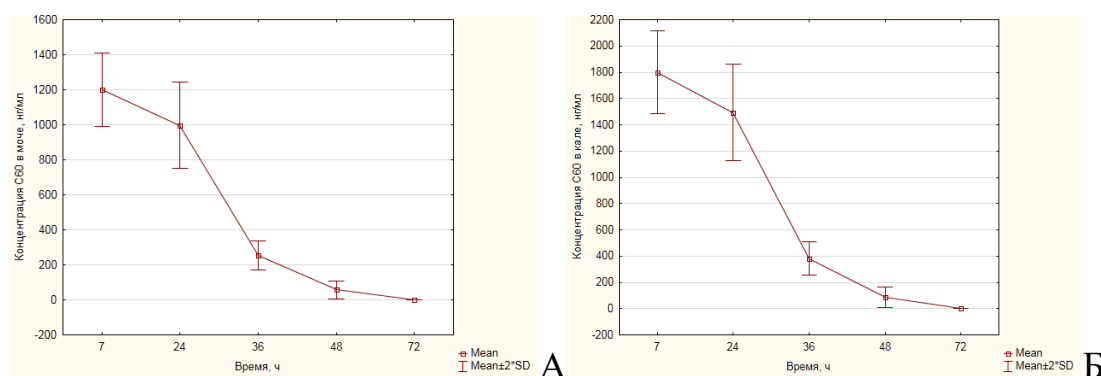


Рис. 163. Изменение концентрации фуллерена C60 в моче (А) и кале (Б) животных в зависимости от времени после внутривенного введения ВРФ в дозе 10мкг/мышь.

Впервые было показано, что фуллерен C60 может активно выводиться из организма. Во-первых, через почки, попадая в мочу, и, во вторых, очевидно, через желчные протоки, попадая затем в фекалии. Наличие его в моче и кале фиксировалось в течение 72 часов. По истечении этого времени даже следовых количеств фуллерена C60 не обнаруживалось. Важно отметить, что степень выведения фуллерена C60 в неизменном виде составляла, по крайней мере, около 70%. Но не исключено, что часть его выводится также в форме метаболитов путем окисления в печени.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Противоаллергическая активность фуллерена C60

Механизм, связанный с IgE-зависимой аллергией, объясняется образованием Th2-клеток, которые продуцируют IL-4 с дальнейшей генерацией IgE-антител. Кроме того, активированные тучные клетки продуцируют цитокины Th2-типа, такие как IL-5, что приводит к накоплению эозинофилов, которые способствуют увеличению клеток Th2 в воспаленных тканях и высвобождению провоспалительных медиаторов [de Matos et al., 2012]. Секретируемый Th1-клетками IFN γ и IL-12 блокирует образование IgE, подавляет активность Th2-лимфоцитов и стимулирует дифференцировку Th1. Низкий уровень IFN γ и IL-12 может говорить о преобладании Th2 иммунного ответа.

В литературе описаны данные, что водная дисперсия фуллерена C60 может ингибировать IgE-зависимую дегрануляцию тучных клеток и секрецию ими цитокинов и простагландинов в ответ на действие аллергенов [Андреев и др., 2015; Ryan et al., 2007; Arkwright et al., 2013; Bosi et al., 2003; Park et al., 2010]. Таким образом, изучение влияния фуллерена C60 на аллергическое воспаление является перспективным направлением исследований в данной области.

В результате изучения влияния фуллерена C60 при накожном и подкожном способах введения на характер иммунного ответа у мышей с экспериментальным атопическим дерматитом было показано, что при накожных аппликациях C60 наблюдалось снижение уровня специфических IgE, а также уменьшение соотношения IgG1/IgG2a. Независимо от способа введения раствора фуллерена уровень экспрессии IL-4 и IL-5 также снижался. При накожном введении раствора фуллерена C60 наблюдалось повышение экспрессии IL-12 и IFN γ , что свидетельствовало о существенном сдвиге иммунного ответа в сторону Th1. При накожном

введении раствора фуллерена было показано увеличение экспрессии гена важнейшего белка кожного барьера филаггрина.

Путем визуальной оценки было выявлено, что в опытных группах, где мыши получали фуллерен C60, интенсивность аллергической диареи была ниже по сравнению с группой «Модель ПА». Наиболее сильный терапевтический эффект наблюдался в группе «C60», где раствор фуллерена C60 животные получали ежедневно. В этой группе также был зафиксирован прирост веса, что может говорить о нормализации функций кишечника. Оценка уровня специфических IgE показала, что при ежедневном введении фуллерена C60 уровень IgE заметно снижался, чего не наблюдалось в группе, где животные получали фуллерен C60 один раз в неделю. Известно, что IgE связывается с рецепторами на тучных клетках, тем самым способствуя их дегрануляции и высвобождению медиаторов воспаления [Ярилин, 2010]. Тучные клетки продуцируют такие цитокины как IL-4 и IL-5. Так как при введении раствора фуллерена наблюдалось значительное понижение уровня IgE, то снижение уровня Th2-цитокинов у животных, получавших фуллерен, выглядит логично. Наши экспериментальные данные указывают на то, что при введении фуллерена C60 наблюдается снижение IL-5, что в свою очередь обуславливает уменьшение степени проявления эозинофилии в кишечнике. Следует отметить, что эффект усиливался с увеличением частоты введения фуллерена. Так, в группе «Модель ПА» наблюдались умеренные признаки аллергического энтерита – еюнита с функциональным увеличением слизиобразования, а в группах, получавших фуллерен, было отмечено снижение признаков еюнита. В группе же «C60» не было отмечено не только признаков еюнита, но и структурно-патологических и функциональных морфологических изменений в тощей кишке тонкого отдела кишечника.

Ряд исследователей указывает на низкий уровень маркеров Th1-иммунного ответа при ПА [Golias et al., 2012]. Показанное нами

увеличение продукции IL-12 и IFN γ в группах получавших фуллерен может говорить о подавлении Th2-иммунного ответа и о подавлении аллергического воспаления.

Различные исследования указывают на то, что в тощей кишке тонкого отдела кишечника отбираются и представляются антигены. Слизистая оболочка тонкой кишки является активно метаболизирующим, быстро пролиферирующим, адсорбирующим эпителием с питательными и гомеостатическими функциями. Высокий уровень цитокинов Th2 влияет на проницаемость кишечника [Tanabe et al., 2015]. У иммунной системы слизистой оболочки есть ряд механизмов, позволяющих избежать неконтролируемого иммунного ответа против пищевых антигенов, включая наличие регуляторных Т-клеток в лимфоидной ткани кишечника и слизи (физический барьер против антигенов). В соответствие с этим, при моделировании ПА может наблюдаться увеличение секреции слизи, продукция которой снижается в отсутствие IL-4 и IgE и несколько повышенное количество бокаловидных клеток [de Matos et al., 2012].

В ходе наблюдения за мышами при моделировании состояния АШ, после разрешающего введения, мы отмечаем ряд симптомов: замедленность в движениях, тяжелое дыхание, кожный зуд, цианоз, диарея, тремор и конвульсии. Данные симптомы часто отмечают у пациентов при анафилактическом шоке, что дает нам основание предположить, что воспроизведение данной патологии у животных было успешным. Группы, получавшие фуллерен C60 («2C60 11/28» и «20 C60 4/28») показали наименьший процент гибели. Среди мышей, получавших мелатонин, в качестве препарата сравнения, группы с дозой 20 мкг имели самый высокий процент выживаемости. Вероятно, дозы 2 мкг мелатонина оказалось недостаточно для нивелирования последствий анафилактического шока.

Литературные данные указывают, что при системной анафилаксии уровень IL-4 незначительно повышены [Li et al., 2010]. В другом

исследовании мыши BALB/c продемонстрировали высокую концентрацию IL-4, IL-5 при моделировании анафилактического шока [Marco-Martín et al., 2017]. Результаты представленных исследований показали, что в группах «20 C60 4/28» и «20MeI 11/28» уровень специфического IgE и Th2-цитокинов был понижен. Также было показано, что уровень IL-4 в группе «Модель» достоверно выше, чем в группе «Интактные». Кроме того, следует отметить, что уровень IL-5 был несколько выше уровня IL-4 во всех экспериментальных группах. Наши результаты показали высокие уровни IFN γ в экспериментальных группах, в том числе в группе «Модель» (АШ). Анализ литературных данных показал, что в ряде работ по моделированию АШ на мышах линии BALB/c, исследователи выявляли высокие уровни IFN γ [Pablos-Tanarro et al., 2016; Marco-Martín et al., 2017]. Некоторые авторы высказывают предположение, что повышение уровня данного цитокина является отличительной чертой линии мышей BALB/c [Pablos-Tanarro et al., 2016]. В других источниках ставят под сомнение, что IFN γ может рассматриваться в качестве ингибитора Th-2 иммунного ответа [Perrier et al., 2009].

По итогам проведенных исследований, на основе анализа клинических, иммунологических и гистологических параметров оценки, можно сделать вывод о том, что фуллерен C₆₀, подавляя Th2-иммунный ответ и снижая эозинофилию в тканях, может являться перспективным кандидатом в препараты для терапии аллергии.

4.2. Ранозаживляющая активность фуллерена C₆₀

В литературе описаны данные, свидетельствующие о наличии у фуллерена C₆₀ антиоксидантной активности, в частности, показано, что молекулы C₆₀ способны стимулировать заживление кожного покрова [Zhou et al., 2010]. Как уже было описано, терапия раневых поражений является актуальной задачей для ученых. Поэтому поиск новых подходов к терапии

кожных поражений является перспективным направлением для исследования в настоящее время.

Путем визуальной оценки было выявлено, что в опытных группах, где животные получали фуллерен C_{60} , процесс восстановления кожного покрова шел интенсивнее относительно контрольной группы, где мыши получали мазь без действующего вещества («самозаживление»). Наиболее интенсивный процесс заживления отмечался при нанесении фуллерена C_{60} на участок кожи после иссечения. Результаты гистологического анализа подтверждают данные визуальной оценки и свидетельствуют о наличии у фуллерена C_{60} способности стимулировать заживление ран.

Оценка экспрессии генов, вовлеченных в процесс ангиогенеза, воспаления и регенерации кожи, показала, что экспрессия таких генов как: *HMGB1*, *VEGF-A* повышалась. Кроме того, было продемонстрировано подавление уровня экспрессии генов $TNF\alpha$, $IL1\alpha$, $IL1\beta$ и $IL6$. Таким образом, данные молекулярно-генетического анализа позволяют нам сделать предположение о том, что применение фуллерена C_{60} может быть эффективно при терапии не только раневого, но и ожогового поражения.

Относительно гена *HMGB1* известно, что его экспрессия при кожных поражениях повышается, так как белок *HMGB1* активно участвует в процессе заживления ран [Grellner, 2002]. Таким образом, повышение уровня экспрессии данного гена, которое наблюдалось у мышей, получавших терапию фуллереном C_{60} , при моделировании ожогового поражения, может свидетельствовать о наличии активного регенеративного процесса в коже.

Другим не менее важным белком является $HIF-1\alpha$, снижение уровня которого приводит к замедлению процесса заживления ран [Duscher et al., 2015]. Xing D. с соавторами показали, что увеличение экспрессии *HIF-1\alpha* при раневых поражениях коррелирует с активацией процесса ангиогенеза и способствует более быстрому стягиванию раны [Xing et al., 2011]. Так как достоверного увеличения экспрессии данного гена при нанесении

фуллерена C_{60} относительно других экспериментальных групп не наблюдалось, можно предположить, что фуллерен не оказывает влияния на выработку *HIF-1 α* .

Согласно данным литературы, такие факторы как VEGF-A, EGF и FGFb, участвуют в процессе образования новой кровеносной сети в области раневого поражения [Bao et al., 2009]. Таким образом, повышение экспрессии данных маркеров у мышей после терапии щелочного ожога фуллереном C_{60} , может говорить о способности фуллерена активировать процессы ангиогенеза.

Gurtner с соавторами показали, что $TGF\beta 1$, который является антагонистом EGF, подавляет повторную эпителизацию кожи [Gurtner et al., 2008], однако, другими исследователями было продемонстрировано стимулирующее действие этого гена на процесс заживления кожи [Fan et al., 2015; Godwin et al., 2015; Nafiu et al., 2015]. В данной работе мы не выявили достоверного изменения уровня экспрессии *TGF $\beta 1$* при наличии явного визуального эффекта стимуляции регенерации кожного покрова.

Что касается такого фактора как $TNF\alpha$, то согласно данным Ashcroft с соавторами отсутствие данного белка в области раневого воспаления значительно ускорила процесс заживления. Кроме того, известно, что снижение скорости заживления ран у человека связано с увеличением уровня $TNF\alpha$ [Ashcroft et al., 2012]. Таким образом, нанесение фуллерена C_{60} на раневую поверхность кожи, которое приводит к снижению уровня экспрессии $TNF\alpha$, может стимулировать регенеративные процессы.

Несколькими независимыми исследователями было показано, что $IL1\alpha$, $IL1\beta$ и $IL6$ являются факторами, ответственными за поддержание воспалительной фазы заживления. Согласно результатам, полученным в данной работе, фуллерен C_{60} ингибируя экспрессию данных генов, подавляя процесс воспаления.

Таким образом, по совокупности полученных результатов, можно сделать вывод о том, что фуллерен C_{60} обладает способностью

стимулировать регенеративные процессы в коже, а также проявляет противовоспалительную активность. Это делает его перспективным в области разработки новых терапевтических средств для терапии кожных поражений различной этиологии.

4.3. Фолликулостимулирующая активность фуллерена C60

В литературе описаны данные, свидетельствующие о наличии у фуллерена C60 биологической активности, в частности, показано, что молекулы C60 стимулируют рост волосяных фолликул [Zhou et al., 2009]. Как уже было описано, из лекарственных препаратов для терапии алопеции на сегодняшний день только два клинически доказали свою эффективность и безопасность. Таким образом, изучение влияния фуллерена на рост и развитие волосяных фолликул является, в настоящее время, перспективным направлением для исследования.

Путем визуальной оценки было выявлено, что в опытных группах, где животные получали фуллерен C60, интенсивность роста волос была заметно выше по сравнению с контрольными группами, которым вводили PBS. Следует отметить, что наиболее интенсивный рост волос отмечался у мышей, которым фуллерен C60 вводили подкожно. Результаты гистологического анализа подтверждают данные визуальной оценки и свидетельствуют о наличии у фуллерена C60 способности стимулировать не только рост волос из уже имеющихся ВФ, но и появление новых ВФ.

Оценка экспрессии генов, вовлеченных в морфогенез ВФ, показала, что подкожный способ введения фуллерена эффективнее накожного. Такой вывод можно сделать на основании увеличения экспрессии таких генов как: *Wnt10b*, *DKK1*, *Srd5a2*, *VEGF-A*, *EGF* и *FGFb*. Кроме того, при подкожном введении фуллерена наблюдалось подавление *TNFα*. Важно отметить, что активность *Wnt10b* регулируется геном *DKK1* [Mao et al., 2002], который, в свою очередь, стимулирует экспрессию гена *Srd5a2* [Kwack et al., 2008]. Таким образом, повышение экспрессии всех этих трех

генов согласуется между собой и является свидетельством активации Wnt-сигнального пути [Lei et al., 2014; Oujj et al., 2006].

Согласно данным литературы, такие факторы как VEGF-A, EGF и FGFb, участвуют в образовании новой кровеносной сети вокруг вновь образующихся ВФ (стадия анаген) [Lin et al., 2015; Mak et al., 2003; Yano et al., 2001]. Таким образом, повышение экспрессии данных маркеров у мышей обеих линий, получавших фуллерен C60, говорит о способности фуллерена активировать процессы ангиогенеза.

Foitzik с соавторами показали, что TGFβ1, который является антагонистом EGF, индуцирует выпадение волос [Foitzik et al., 2000], однако, в другой работе показано стимулирующее действие этого гена на рост ВФ [Liu et al., 2013]. В данной работе мы не выявили достоверного изменения уровня экспрессии TGFβ1 при наличии явного визуального эффекта стимуляции роста волос.

Что касается гена *TNFα*, то согласно данным Ruckert с соавторами он участвует в апоптозе ВФ, предположительно при очаговой алопеции [Ruckert et al., 2000]. Также стало известно, что применение анти-TNFα препаратов замедляет выпадение волос у пациентов с воспалительными заболеваниями [Shah et al., 2015]. Таким образом, введение фуллерена C60, приводящее к снижению уровня экспрессии *TNFα*, оказывает положительный эффект на рост и развитие ВФ. Кроме того, полученные результаты согласуются с приведенными литературными данными.

Относительно гена Foxp3 известно, что его экспрессия понижена у пациентов с очаговой алопецией [Riddle et al., 1993], согласно этим данным можно сделать предположение о том, что повышение уровня экспрессии Foxp3 может оказывать положительное влияние на рост и развитие ВФ. Однако, по результатам проведенных исследований мы можем сделать вывод о том, что повышение экспрессии Foxp3 является, по-видимому, не специфической реакцией на возникновение воспаления после удаления

фиксирующих повязок. Следует отметить, что при подкожном введении фуллерена уровень экспрессии *Foxp3* не менялся.

По результатам проведенного исследования, можно высказать предположение о том, что способность фуллерена активировать Wnt-сигнальный путь является одним из возможных механизмов действия фуллерена C60. Кроме того, снижение экспрессии *TNFα* при введении фуллерена, возможно, позволяет нивелировать негативное воздействие указанного гена на ВФ.

Известно, что подавление *TNFα* может происходить путем активации аденозином аденозинового рецептора A2AAR [Сивак и др. 2016]. Ранее показано, что при активации этого рецептора воспаление уменьшается, а применение синтетических аналогов аденозина повышает выживаемость при сепсисе [Ohta et al., 2001]. Рецепторы A2A и A2B сопряжены с G α s и опосредуют активацию аденилатциклазы, которая катализирует превращение АТФ в 3', 5' циклическую форму АМФ с образованием пироглютамата. Внеклеточная концентрация аденозина вблизи нормальных клеток составляет примерно 300 нМ. Однако, в ответ на повреждение клетки (например, в воспаленных или ишемичных тканях) концентрация аденозина быстро возрастает до 600—1200 нМ. Таким образом, в ответ на стресс или ранение аденозин проявляет в основном цитопротекторное действие, защищая ткани от повреждения в случаях гипоксии, ишемии или судорог, способствуя продукции фактора роста эндотелия сосудов мононуклеарными фагоцитами [Haskó et al., 2012]. Активация рецепторов типа A2A вызывает широкий спектр ответов, которые можно классифицировать как противовоспалительные [Haskó et al., 2004].

Что касается изучения влияния фуллерена C60 на экспрессию аденозинового рецептора, то в литературе описано только то, что производное фуллерена C60 было способно стимулировать экспрессию данного рецептора в клеточной линии нейроэпителиомы человека [Giust et al., 2011]. На основании полученных данных авторы указывают на

нейропротективный эффект соединения. Показанное в текущей работе увеличение экспрессии аденозинового рецептора в присутствии фуллерена C₆₀ обуславливает подавление выработки TNF α , который крайне негативно влияет на рост и развитие волосяного фолликула, а также увеличение продукции фактора роста эндотелия сосудов и снижение выработки провоспалительных цитокинов.

Таким образом, по совокупности полученных результатов, можно сделать вывод о том, что фуллерен C₆₀ обладает способностью стимулировать рост волос и может являться перспективным терапевтическим препаратом для лечения алопеций.

В рамках дальнейших исследований был изучен вопрос относительно сохранения стимулирующего эффекта. Известно, что эффект применения препаратов, стимулирующих рост волос зачастую прекращается при отмене терапии. Так, например, препарат «Меноксидил», известный уже более 40 лет и механизм действия которого основан на сосудорасширяющем эффекте, в настоящее время является основным средством, часто назначаемым при алопеции [Zappacosta et al., 1980; Weiss et al., 1981; Modha et al., 2022]. Однако, к сожалению, при отмене данной терапии эффект не сохраняется [Koperski et al., 1987]. Таким образом, важным результатом вышеизложенных исследований является получение достаточно стойкого эффекта стимуляции роста волос в области введения ВРФ, который сохранялся и после прекращения введения препарата. Вероятно, фуллерен C₆₀ является весьма перспективным соединением для терапии алопеции и может составить конкуренцию имеющимся средствам для роста волос, заняв определенную нишу на рынке соответствующей продукции.

4.4. Противовирусная активность фуллерена C₆₀

В настоящей работе впервые изучена противовирусная активность водной дисперсии фуллерена C₆₀ (ВРФ) и проведено сравнительное

изучение ВРФ и трех аминокислотных аддуктов фуллерена C_{60} в отношении ВПГ1-инфекции *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время получено много производных фуллерена C_{60} и C_{70} , для некоторых из них показана антиоксидантная активность [Andreev et al., 2008; Lao et al., 2009; Shoji et al., 2013; Prylutsky et al., 2014]. Ряд производных фуллерена обладают заметной противовирусной активностью [Chen et al., 2011; Goodarzi et al., 2017]. Установлено, что некоторые производные C_{60} , содержащие amino- и карбоксильные группы, благодаря которым соединения способны растворяться в водных средах, проявляют противовирусную активность до заражения вирусами *in vitro* как при ВПГ-, так и ЦМВ-инфекциях в клеточных культурах [Chen et al., 2011]. Однако сведений о способности фуллеренов предотвращать развитие вирусных инфекций *in vivo* чрезвычайно мало, и имеющиеся результаты пока не показали высокой эффективности [Piotrovsky, et al., 2006].

Для выяснения клеточных механизмов действия фуллерен добавляли в клеточную культуру на разных стадиях жизненного цикла вируса. В настоящей работе использованы 3 варианта внесения тестируемых соединений. Это позволило моделировать разные формы действия фуллеренов: профилактическое действие (при внесении за 1 ч до заражения), терапевтическую активность (при внесении через 1 ч после заражения) и вирулицидные свойства изученных соединений. Поскольку противовирусное соединение должно сочетать высокую противовирусную активность с низкой цитотоксичностью, для определения потенциальной возможности применения соединений в качестве противовирусных агентов была проведена оценка ХТИ (SI).

Результаты, полученные в настоящей работе, показали, что все изученные соединения статистически значимо снижают количество инфицированных клеток (бляшек) в культуре клеток при использовании за 1 ч до заражения; ВРФ и C_{60} -Pip проявляют активность также и при внесении через 1 ч после инфицирования, ХТИ (SI) >100 (рис.2 и табл.1).

Важно отметить, что водная форма ВРФ обладает высокой вирулицидной (вируснейтрализующей) активностью (ХТИ=1771). Данные показатели свидетельствуют о высоком противовирусном эффекте.

Полученные результаты указывают на то, что ВРФ и C₆₀-Pir могут взаимодействовать с разными мишенями: с вирусными – нейтрализуя способность вирионов проникать в клетки (вирулицидная активность); с молекулами на поверхности клеток – маскируя или модифицируя гликопротеины, необходимые для адсорбции, препятствуя взаимодействию с рецепторами и проникновению вируса (профилактическая активность); с внутриклеточными молекулами – ингибируя развитие инфекционного процесса (терапевтическая активность). Молекулярные и клеточные механизмы действия изученных соединений предстоит раскрыть в дальнейших исследованиях.

Кожа и эпителий слизистой оболочки – первичные места проникновения ВПГ1 и ВПГ2 в организм и также места реактивации инфекции. Известно, что у людей, а также у мышей, при кожной ВПГ1-инфекции инокулированный вирус реплицируется в эпителии кожи и слизистых, затем мигрирует в сенсорные ганглии, где может длительно, иногда пожизненно, оставаться в латентной форме. При реактивации вирус транспортируется к участкам первичной инфекции, что приводит к появлению в этих местах высыпаний и эрозий, распространяющихся в окружающие ткани [Nosik et al., 2009; Shershakova et al., 2016]. Согласно имеющимся данным [Mchedlov-Petrosyan et al., 2013], кожная ВПГ1-инфекция вначале (2-4 сут после инфицирования) ограничена сайтом скарификации; затем, начиная с 5-ых сут после инфицирования, распространяется на весь иннервированный дерматом (участок кожи, иннервируемый определенным спинальным ганглием). В ходе настоящей работы у naïve животных контрольной группы были выявлены максимальные поражения кожи на 3 и 6 дни после инфекции, которые, по-видимому, соответствуют двум фазам репликации ВПГ1 в коже (см. рис.

5). У животных, обработанных ВРФ, как и АЦВ, инфекция протекала с менее выраженными клиническими проявлениями, со 2-х сут наблюдалось статистически значимое снижение герпетического поражения кожи по сравнению с контролем, и полное выздоровление наступало на 8-9 сут соответственно (рис. 4). Следует отметить, что лечебные свойства ВРФ были выявлены при использовании его в концентрации 500 раз меньшей по сравнению с АЦВ и раньше на 1 сут.

Терапевтический эффект дисперсной формы фуллерена ВРФ при кожной ВПГ1-инфекции мышей может объясняться тем, что в первой фазе кожной инфекции ВРФ инактивирует вирус и ингибирует распространение вирусной инфекции на соседние клетки и ткани. Кроме того, выздоровлению от кожного герпеса, по-видимому, способствует, воздействие ВРФ на иммунную систему, прежде всего на реакции врожденного иммунитета, о чем свидетельствуют данные о снижении воспалительных клеточных реакций организма, активации Т-клеточного иммунного ответа и восстановлении барьерной функции кожного покрова при эпидермальном нанесении ВРФ, показанные участниками нашей группы ранее. Положительному терапевтическому эффекту ВРФ против ВПГ-инфекции могут способствовать также антиоксидантные свойства фуллеренов, благодаря которым нейтрализуются супероксидные радикалы [Shoji et al., 2013] и предотвращается окислительное повреждение клеток [25]. В подтверждение этого предположения можно привести данные о том, что водная дисперсия C_{60} , приготовленная без использования полярных органических растворителей, не только не проявляет острой токсичности у грызунов, но и защищает их печень от повреждения свободными радикалами [Bakry et al., 2007].

В связи с имеющимися данными о том, что барьерная функция кожи защищает от заражения ВПГ даже после механического повреждения кожи, что приводит лишь к небольшому количеству инфицированных клеток и не вызывает антивирусное состояние [Castro et al., 2017], мы

изучили антитела (АТ) к ВПГ1 в сыворотках крови обследованных мышей как показатель вирус-специфичного иммунного ответа. Было установлено, что у большинства зараженных ВПГ1 животных контрольной группы происходила индукция вирусспецифических АТ, тогда как у погибших животных АТ к вирусу определить не удалось. Эти данные подтвердили специфичность герпес-вирусной этиологии клинических проявлений у зараженных животных, а также защитные свойства вирус-индуцированных анти-ВПГ1. В то же время полученные результаты подтвердили представление о том, что даже высокая активность только противовирусных антител не всегда способна предотвратить развитие герпес-вирусных инфекций и защитить от летального заражения герпес-вирусами [Klimova et al., 2017]. В наших опытах высокие титры АТ защитили зараженных животных от гибели, однако не привели к полному выздоровлению. Так, на 10 день наблюдения у выживших мышей контрольной группы (титр АТ к ВПГ1 составил 1:1600) оставались единичные эрозии, тогда как в группах мышей, получавших ВРФ и АЦВ (титры 1:800 и 1:400 соответственно), все животные выжили и у них наблюдали полное исчезновение герпетического поражения кожи. Таким образом, результаты настоящей работы указывают на вклад гуморального иммунитета в защиту животных от кожной ГВИ и показывают, что для полного выздоровления животных необходимо включение дополнительно других механизмов врожденного и адаптивного иммунитета.

Суммируя полученные данные, можно сделать выводы, что водная дисперсия фуллерена ВРФ:

а) предотвращает ВПГ1 инфекцию клеток культуры; б) обладает способностью нейтрализовать инфекционную активность герпес-вируса; в) проявляет терапевтические противовирусные свойства в отношении кожной ВПГ1-инфекции у мышей.

Перечисленные свойства дисперсного фуллерена позволяют заключить, что ВРФ является перспективным соединением для создания

нового противовирусного препарата, способного подавлять герпес-вирусную инфекцию, воздействуя как на вирус, так и на инфицированный организм.

4.5. О механизме биологической активности фуллерена C₆₀: анализ предложенных гипотез

4.5.1. Оценка способности фуллерена C₆₀ взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором

Известно, что АУР является не только рецептором, который активируется множеством экзогенных и эндогенных лигандов, но и сенсором ксенобиотиков, которые в основном представлены ароматическими углеводородами. Ингибирование данного рецептора ведет к подавлению окислительного стресса за счет активации транскрипционных факторов антиоксидантной системы клетки. Кроме того, АУР влияет на интенсивность работы ферментов метаболизма ксенобиотиков, обеспечивая утилизацию данных веществ. Следует отметить, что устойчивая активация АУР или потеря его функции одинаково не желательны для жизнедеятельности организма и оптимальным является, вероятно, минимальная активность данного рецептора [Kohle et al., 2007; Larigot et al., 2018].

Поскольку фуллерен C₆₀ имеет псевдоароматическую структуру и проявляет антиоксидантную активность, было выдвинуто предположение, что АУР может является мишенью для фуллерена C₆₀, взаимодействие с которой может обуславливать ряд биологических эффектов данного соединения. Теоретическая возможность взаимодействия молекулы фуллерена C₆₀ с АУР была показана в представленных исследованиях *in silico* методом компьютерного моделирования (молекулярный докинг).

Известно, что экспрессия АУР значительно повышается при развитии вирусных заболеваний [Giovannoni et al., 2021]. Этот факт представляется очень важным в рамках изучения показанной ранее

противовирусной активности водного раствора фуллерена C_{60} [Kasermann et al., 1998]. Было интересно оценить способность фуллерена C_{60} влиять на экспрессию АУР и ассоциированных с ним генов в клетках легких, поскольку именно данная ткань довольно часто поражается широко распространенными респираторными вирусами, в том числе вирусом SARS-CoV-2, которыми ежегодно поражается большой процент популяции. Для данного этапа исследований в качестве модельной клеточной культуры была выбрана линия клеток аденокарциномы легкого человека (A549). В качестве дополнительного контроля, наряду с известными лигандами АУР (FICZ, ресвератрол), было введено такое соединение, как интерферон-гамма (IFN- γ), поскольку обычно он входит в противовирусную терапию, являясь важным элементом, который участвует в подавлении синтеза вирусной РНК и белков оболочки вируса [Kuesk et al., 2018].

Имеются данные, что АУР играет важную роль в регуляции экспрессии генов белков, отвечающих за нормальное функционирование эпителиального барьера легких, и увеличение его экспрессии может способствовать развитию инфекции, вызванных, например, SARS-CoV-1, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Было показано, что при попадании в организм вирус SARS-CoV-2 инициирует передачу сигналов посредством АУР в эпителиальных клетках легких, что приводит к сверхэкспрессии муцинов — основных макромолекулярных компонентов слизи. Накопление муцинов приводит в дальнейшем к утолщению гемато-воздушного барьера и затруднению диффузии O_2 , что усугубляет течение заболевания [Giovannoni et al., 2021]. Ряд исследований указывает также на связь уровня экспрессии АНР с вирусной нагрузкой. Показано, что фармакологическое ингибирование АУР его антагонистами, приводит к подавлению репликации некоторых вирусов (ВИЧ-1, ВПГ-1) [Kohle et al., 2007].

Принимая во внимание данные литературы и структурное сходство антагонистов АУР и фуллерена C_{60} , можно предположить, что данное

соединение также может влиять на степень вирусной нагрузки, в том числе посредством внутриклеточного ингибирования синтетических процессов цикла репликации вируса и нарушения этапов сборки вирионов. Таким образом, полученные данные, вероятно, указывают на то, что фуллерен C₆₀, обладая способностью ингибировать экспрессию АУР, может стать основой эффективных противовирусных препаратов.

Полученные результаты по экспрессии генов AHR и NRF2 согласуются с данными литературы, где описано, что NRF2 запускается посредством передачи сигналов через АУР. И система АУР, и система NRF2 функционируют как сенсорно–эффекторные механизмы, соединяющие внешние сигналы с внутренними клеточными реакциями. Работа обеих систем направлена на борьбу с экологическими стрессами в различных тканях, включая кожу и слизистые оболочки [Shin et al., 2007].

Известно, что повышение экспрессия *NRF2* может приводить к запуску сигнального пути NRF2 / HO–1, что, в свою очередь, будет увеличивать антиоксидантную активность клеток. В отличие от провоспалительных последствий после индукции AHR–CYP1A1–ROS, ось AHR–NRF2, вероятно, обладает противовоспалительным действием и снижает выработку провоспалительных цитокинов (IL–1, IL–6 и IL–8) [Kohle et al., 2007; Qiang et al., 2013]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что противовоспалительная активность фуллерена C₆₀ может быть отчасти опосредована взаимодействием с АУР и активацией сигнального пути NRF2 / HO–1 за счет увеличения выработки NRF2.

Еще одним фактором антиоксидантной защиты является антиоксидантный фермент НАДФН–хинондегидрогеназа 1 (NQO1) – это фермент второй фазы детоксикации ксенобиотиков и конечный восстановитель для окисленных форм других антиоксидантов. Этот FAD–связывающий белок образует гомодимеры и восстанавливает потенциально токсичные хиноны до стабильных гидрохинонов. Изменение

экспрессии данного гена наблюдается во многих опухолевых клетках, а также связана с патологиями, развитие которых обусловлено накоплением АФК [Yeager et al., 2009].

В рамках проведения исследования было показано увеличение экспрессии *NQO1* для ВРФ и для всех групп положительного контроля в экспериментах на линии клеток *mel Cher*, на клетках линии *mel Is* - в присутствии ресвератрола и мелатонина, который представляет собой производное триптофана, являясь прямым поглотителем радикалов и непрямым антиоксидантом, стабилизирующим клеточные мембраны [Marseglia et al., 2014]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что фуллерен C_{60} наряду с известными лигандами АУР способен усиливать экспрессию ассоциированного с данным рецептором фактора *NQO1*, который, как и *NRF2* активируется через сигнальный путь *Nrf2/ARE*. Индукция данных антиоксидантных ферментов фазы II препятствует развитию окислительного стресса и опосредованной им гибели клеток.

На следующем этапе работ был проведен анализ экспрессии основных АУР-зависимых цитохромов в условиях обработки клеток ВРФ. По литературным данным, существует АУР-зависимая индукция цитохрома *CYP1A1*, участвующего в детоксикации ксенобиотиков до метаболитов, которые затем выводятся с кровью, мочой и фекалиями. Петля обратной связи способствует быстрой деградации активированного АУР протеасомой, предотвращая устойчивую активацию рецептора. Известно, что клетки кожи (кератиноциты) в норме активно экспрессируют *CYP1A1* и в меньшей степени *CYP1B1*. Следует отметить, что экспрессия мРНК и выработка белка *CYP1A1* быстро индуцируется, но носит кратковременный характер. Так, периоды полужизни мРНК и белка *CYP1A1* составляют менее 10 и 5 часов, соответственно [Shepelev et al., 2019; Tanimura et al., 2011].

Важно учитывать, что АУР обладает широким спектром биологических эффектов, которые запускаются при его индукции/ингибировании различными лигандами, что часто приводит к противоречивым последствиям для организма. Например, антагонист АУР ресвератрол способствует снижению экспрессии цитохромов, которые в норме играют важную роль в стереогенезе в головном мозге. Их недостаток, например, может привести к репродуктивной токсичности в связи с изменением уровня стероидов в плазме [Aluru et al., 2008; Aluru et al., 2009].

Группой исследователей было показано, что лиганд FICZ в наномолярных концентрациях (30 и 3 нМ) связываясь с АУР оказывал супрессирующее воздействие на развитие рака кожи. Полученные в текущей работе данные согласуются с заключением авторов, показывая, что действительно экспрессия АУР клетками обеих линий меланом подавляется в присутствии указанного лиганда. Кроме того, принимая во внимание описанную в литературе противоопухолевую активность фуллерена C₆₀ [Орлова, 2013; Zhai et al., 2014], можно предположить, что данный эффект также может быть опосредован АУР.

Полученные результаты по подавлению экспрессии цитохромов в присутствии ВРФ выглядят логично относительно данных по ингибированию экспрессии АНР как в присутствии его известных лигандов, так и под действием фуллерена C₆₀. Так, например, имеющий высокое сродство к АУР FICZ в сочетании с тем, что он является подходящим субстратом для CYP1A1, создает петлю отрицательной обратной связи (FICZ/АНР/CYP1A1), которая препятствует накоплению лиганда в клетке и делает его идеальным регулятором динамических клеточных процессов.

Известно, что механизм биологической активности фуллерена C₆₀ все еще не до конца изучен. В данном исследовании была показана способность фуллерена C₆₀ ингибировать экспрессию АУР и цитохромов

наряду с повышением продукции факторов антиоксидантной защиты. Опираясь на полученные данные, можно сказать, что вероятной мишенью при взаимодействии молекулы фуллерена C60 с клеткой является АУР, посредством которого могут проявляться показанные ранее эффекты данного соединения, в том числе противовоспалительный, противовирусный и даже противоопухолевый.

4.5.2. Оценка способности фуллерена C60 влиять на хемотаксис, активность и профиль экспрессии генов макрофагов

Анализируя источники литературы, можно столкнуться с весьма ограниченным количеством данных относительно иммуномодулирующей активности фуллерена C60, которые носят зачастую противоречивый характер [Fujita et al., 2009; Pei et al., 2019]. Так, Liu с соавторами показали, что фуллерен C60 и его производные проявляют мощную иммуномодулирующую провоспалительную активность, стимулируя выработку TNF α , усиливая клеточный иммунный ответ и не оказывая неблагоприятного воздействия на жизнеспособность иммунных клеток [Liu et al., 2009]. Yilun Pei с соавторами проводили исследование, целью которого являлась оценка противовоспалительной активности фуллерола (водорастворимое производное фуллерена) на *in vitro* и *in vivo* моделях остеоартрита. Установлено, что фуллерол в исследуемых дозах (0, 0,1, 0,3, 1, 3 мкМ) способен снижать экспрессию TNF α , IL-1 β , IL-6 и iNOS, а также продукцию нитритов в первичных перитонеальных макрофагах мыши [Pei et al., 2019]. В представленных в текущей работе экспериментах по изучению способности фуллерена C60 взаимодействовать с макрофагами в условиях *in vitro*, было показано, что данное соединение лишь немного увеличивало экспрессию TNF α дифференцированными макрофагами M0.

Shershakova N.N. с соавторами в своей работе оценивали противоаллергические свойства водорастворимой формы фуллерена C60 при моделировании атопического дерматита *in vivo* на мышях линии BALB/c. Для характеристики изменения иммунного ответа при введении

ВРФ были проанализированы такие показатели цитокинового профиля аллергического иммунного ответа, как IL-4, IL-5, IL-12, IL-10, IL-13, IL-17, ИФН- γ , Foxp3. Было показано увеличение продукции Th1- цитокинов IL-12, ИФН- γ , IL-10, Foxp3 и снижение выработки Th2- цитокинов IL-4 и IL-5 [Shershakova et al., 2016]. Таким образом, было сделано заключение о противоаллергической активности ВРФ. Кроме того, известно, что провоспалительные цитокины — TNF α , IL-1 и IL-12 оказывают противовирусный эффект как *in vivo*, так и *in vitro* [Титов и др., 2007]. Рядом исследователей была показана противовирусная активность фуллерена и его производных, в том числе, относительно вирусов гриппа А, цитомегаловируса и вируса простого герпеса [Klimova et al., 2020; Shoji et al., 2013].

Следует отметить, что в присутствии фуллерена C60 несколько повышалась экспрессия такого гена, как IL-10, который обладает множественными плеiotропными воздействиями на иммунорегуляцию и воспаление, а экспрессия IL-6, который играет ведущую роль при травматическом поражении ткани, ожогах и других повреждениях, ведущих к воспалению, не менялась. Известно, что IL-10 снижает экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и ко-стимулирующих молекул на макрофагах, ингибируя индукцию секреции воспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-12 и ИФН- γ , опосредованную липополисахаридом и другими бактериальными продуктами через активацию Толл-подобных рецепторов [Mattana et al., 2016]. Однако, продукция IL-6 обычно стимулируется данными медиаторами острой фазы воспалительного ответа.

В рамках наших исследований на дифференцированных макрофагах было продемонстрировано, что водный раствор фуллерена C60 стимулировал экспрессию таких генов, как *CCL2*, *IL-12*, *IL-1 β* , *IL-1 α* , *VEGF-A*, которые принимают участие в воспалительных процессах, в том числе оказывая противоаллергический и противовирусный эффект. Так,

ген *CCL2* является фактором хемотаксиса макрофагов/моноцитов, отвечая за миграцию клеток в очаг воспаления, гены *IL-12*, *IL-1 β* и *IL-1 α* являются Th1-цитокинами, которые играют важную роль в регуляции клеточного иммунного ответа и способны как подавлять аллергическое воспаление, так и оказывать противовирусный эффект, а *VEGF-A* участвует в регуляции проницаемости сосудистой стенки и обладает ангиопротективным эффектом. Полученные данные могут говорить о том, что противоаллергический эффект фуллерена C60, показанный ранее, может быть опосредован его способностью взаимодействовать с макрофагами. Кроме того, текущее исследование может указывать на то, что водный раствор фуллерена C60 способен активировать противовирусный иммунный ответ. Следует особо отметить, что, учитывая стимуляцию экспрессии гена фактора хемотаксиса моноцитов/макрофагов *CCL2*, фуллерен C60 может, например, способствовать привлечению в область воспаления указанных клеток, а дифференцировка макрофагов будет осуществляться уже согласно характеру микроокружения. Данное умозаключение может объяснить порой разнообразные эффекты фуллерена C60.

Для наглядности эффекта влияния ВРФ на хемотаксис макрофагов был проведен ряд отдельных экспериментов *in vitro*. Было показано, что при введении ВРФ в культуру перитонеальных макрофагов мыши был визуально замечен эффект перераспределения клеток, которые концентрировались в зоне нахождения частиц фуллерена C60. Важно отметить, что наряду с визуальным эффектом было показано увеличение экспрессии фактора хемотаксиса макрофагов *CCL2* в условиях инкубации клеток с ВРФ. Как было уже упомянуто ранее, Mizutani Y с соавторами показали, что данный фактор значительно ускоряет процесс заживления [Mizutani et al., 2020]. Кроме того, на модели регенерации лапки аксолотля показано критическое значение скорости прибытия макрофагов в рану для дальнейшего процесса регенерации конечности [Godwin et al., 2013]. Таким

образом, литературные данные указывают на прямую взаимосвязь скорости прибытия макрофагов в рану и эффективности регенерации. Важно также отметить, что образование рубца/шрама, тоже, вероятно, связано со скоростью прибытия в рану макрофагов. Так, ориентируясь на полученные данные, можно сказать, что фуллерен C60, по-видимому, может способствовать увеличению скорости прибытия макрофагов в зону поражения/повреждения ткани, что обуславливает ускорение процесса заживления, минимизируя риск образования рубца/шрама. Также, основываясь на представленных данных, мы можем предположить, что фуллерен C60 обладает иммуномодулирующим действием и способен регулировать иммунный ответ, оказывая соответствующее влияние на макрофаги.

4.5.3. Оценка вероятности фуллерена C60 взаимодействовать с фосфолипидами мембран клеток и влиять на высвобождение арахидоновой кислоты

Воспаление — это иммунный ответ, который защищает организм от различных токсичных или раздражающих состояний, таких как вирусная или бактериальная инфекция, вредные раздражители и повреждение клеток [Medzhitov et al., 2009; Aksentijevich et al., 2020]. Правильно контролируемая воспалительная реакция помогает поддерживать гомеостаз в организме, а ненормальное или чрезмерное воспаление вызывает гиперактивность организма и является вредным. Сообщается, что чрезмерные воспалительные реакции являются основной причиной различных заболеваний, включая нарушения работы иммунной системы и развитие онкологических патологий [Liu et al., 2018; Semb et al., 2020]. Среди клеток, участвующих в иммунной регуляции, важную роль в системе врожденной иммунной защиты играют макрофаги. Их аномальная активация часто встречается при большинстве воспалительных заболеваний [Soufli et al., 2016; Saha et al., 2020; Yao et al., 2019]. Чрезмерная активация макрофагов приводит к развитию воспалительной

реакции и окислительному стрессу. Под окислительным стрессом понимается дисбаланс окисления и антиоксидации в организме под воздействием вредных стимулирующих факторов [Cho et al., 2016]. С целью изучения влияния различных соединений на развитие воспаления широко используется эндотоксин или липополисахарид (ЛПС) - основной компонент клеточных стенок грамотрицательных бактерий, который является универсальным фактором патогенеза множества заболеваний [Tang et al., 2019]. В рамках клеточной реакции на стресс супероксид является одной из основных активных форм кислорода, индуцируемых ЛПС в различных типах клеток, которые экспрессируют TLR (toll-подобный рецептор) [Li et al., 2019]. За счет активации внутриклеточных сигнальных путей, опосредованных TLR, включая ядерный фактор-каппа В (NF- κ B), в ЛПС-стимулированных макрофагах увеличивается экспрессия эффекторных ферментов воспалительного каскада и цитокинов [Hernandez et al., 2019; Doyle et al., 2006]. Рецепторный комплекс CD14/TLR4/MD2, присутствующий на макрофагах и многих других клетках организма, связывает ЛПС, что способствует секреции не только провоспалительных цитокинов, но и оксида азота и эйкозаноидов [Abbas et al., 2006] (Рис. 164).

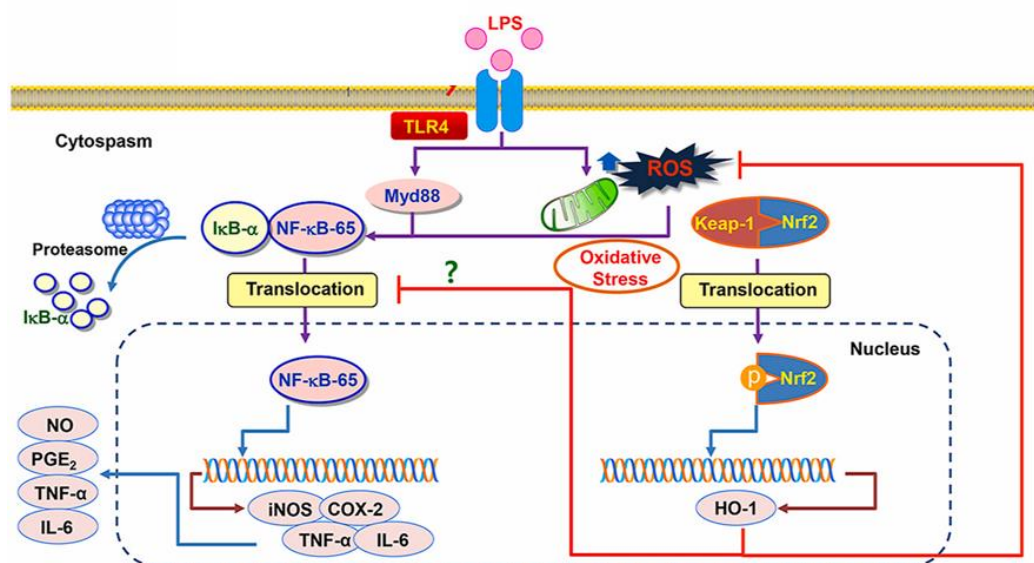


Рис. 164. ЛПС-индуцированный окислительный стресс [Park et al., 2021].

Оксид азота (NO) и простагландин E₂ (PGE₂) являются типичными медиаторами воспаления, а цитокины, такие как фактор некроза опухоли (TNF)- α , интерлейкин(IL)-1 β , IL-6 и IL-12 способствуют воспалению [Aleem, et al., 2018; Wyns et al., 2015]. Следует отметить, что была выявлена положительная корреляция экспрессии провоспалительных цитокинов с выработкой индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и циклооксигеназы-2 (COX-2), которые участвуют в производстве NO и PGE₂ наряду с полиненасыщенными жирными кислотами, в том числе арахидоновой [Soufli et al., 2012].

В целом ряде представленных в работе экспериментов показано, что фуллерен C₆₀ обладает противовоспалительной активностью. Однако, механизм достижения данного эффекта пока очень плохо изучен. В литературе данная активность объясняется лишь наличием у фуллеренов антиоксидантной активности. В текущей работе было выдвинуто предположение о том, что фуллерены, как гидрофобные молекулы, способны ингибировать процесс высвобождения арахидоновой кислоты (АК) и ПОЛ. Ингибирование данных процессов может происходить, вероятно, за счет связывания с фосфолипидами мембран клеток. Образование комплексных соединений фуллерена C₆₀ с фосфолипидами может экранировать фосфолипиды, препятствуя взаимодействию с ними фосфолипазы A₂, а также воздействию на них свободных радикалов. Если следовать данному предположению, то результатом возможного взаимодействия фуллерена C₆₀ с мембранными фосфолипидами может стать блокирование процесса высвобождения из них арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, которые участвуют в образовании эйкозаноидов и развитии воспалительной реакции. Таким образом, показав взаимодействие фуллерена C₆₀ с фосфолипидами, появляется возможность объяснить механизм противовоспалительной активности фуллерена C₆₀, определив мишень для взаимодействия. Для проведения необходимых экспериментов, которые бы помогли оценить

способность фуллерена C60 взаимодействовать с фосфолипидами, было решено использовать *in vitro* модель ЛПС-стимулированных макрофагов. Поскольку ключевую роль в развитии воспалительного процесса играют макрофаги, и от характера их поляризации зависит характер дальнейшего иммунного ответа, то для проведения исследований был выбран именно этот тип клеток. Кроме того, в исследовании использовалась методика конкурентного взаимодействия C60 с фосфолипидами мембраны. При этом в качестве конкурента мембранным фосфолипидам был взят лецитин, с которым фуллерен C60 инкубировали до добавления к клеткам. Функциональную активность фуллерена C60 и его смеси с лецитином определяли путем анализа экспрессии ряда генов, патогенетически значимых при развитии воспалительной реакции. Важно отметить, что для полноты исследования экспрессия генов изучалась на разных фенотипах клеток - были получены макрофаги фенотипов M0, M1 и M2 путем стимуляции ЛПС и IFN γ (для получения M1) и ИЛ-4+ИЛ-13 (для получения M2).

Так, анализ экспрессии генов ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов (COX-1, COX-2, ALOX5, ALOX12) (Рис. 165), продемонстрировал снижение уровня их экспрессии клетками в присутствии фуллерена C60.

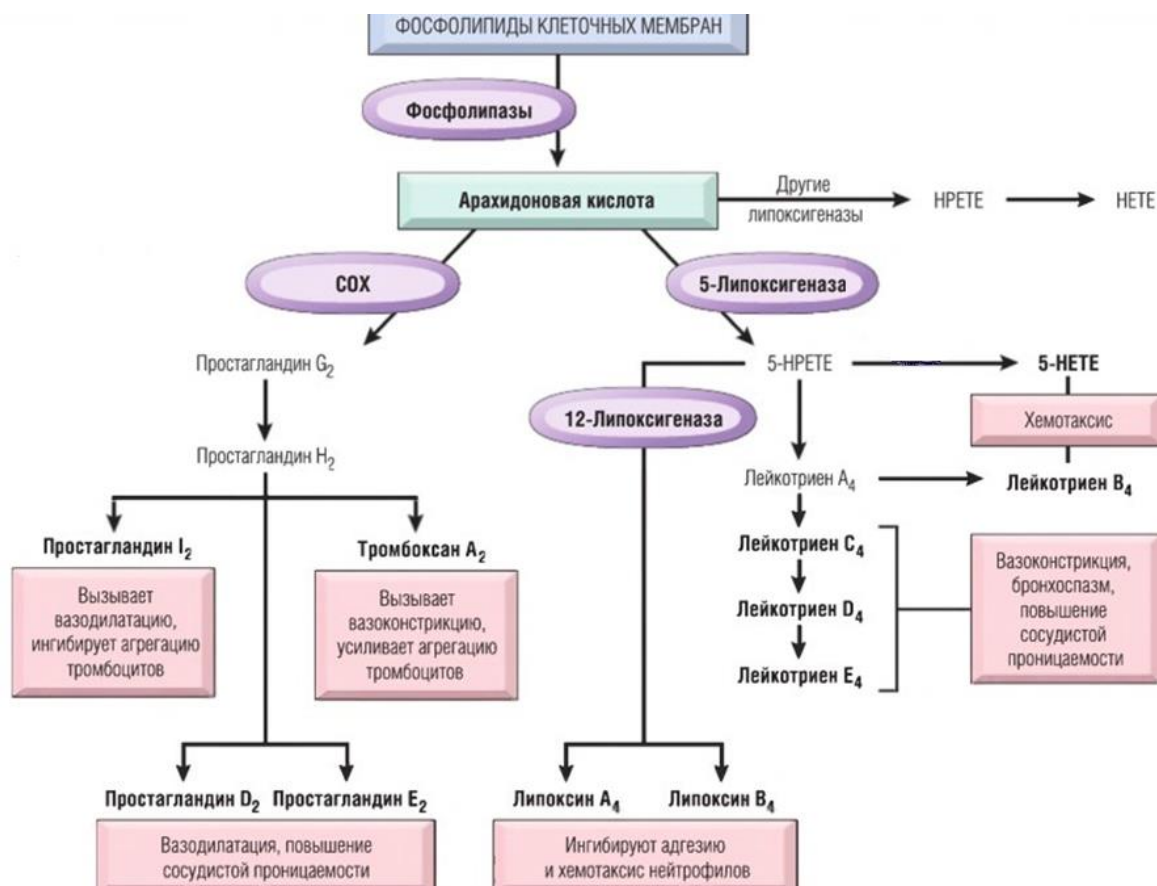


Рис. 165. Образование метаболитов арахидоновой кислоты.

Однако, при добавлении смеси ВРФ со свободным лецитином, наблюдалось заметное уменьшение данного эффекта, что, вероятно, свидетельствует о негативном влиянии свободного лецитина на взаимодействие фуллерена С60 с клетками.

Кроме того, выработка провоспалительных факторов и цитокинов (TNF α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, NF- κ B), снижаясь под действием фуллерена С60, снова увеличивалась при добавлении лецитина. Таким образом, исходя из полученных данных о влиянии лецитина на активность фуллерена С60, можно сказать, что одной из мишеней для фуллерена С60 в организме могут являться фосфолипиды мембраны клеток. Способность фуллерена С60 связываться с мембранными фосфолипидами может объяснять противовоспалительный эффект ВРФ. Данное взаимодействие может блокировать высвобождение арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот, препятствуя образованию эйкозаноидов, а также запуску

ПОЛ и развитию воспаления. Кроме того, поскольку в присутствии фуллерена C60 наблюдается значительное снижение ферментов, участвующих в метаболизме арахидоновой кислоты, то можно сделать предположение, что фуллерен C60, связываясь с фосфолипидами мембраны, экранирует их еще и от воздействия фосфолипаз.

Таким образом, резюмируя вышепредставленные результаты относительно разработки гипотез механизма действия фуллерена C60, была составлена схема (Рис. 166).

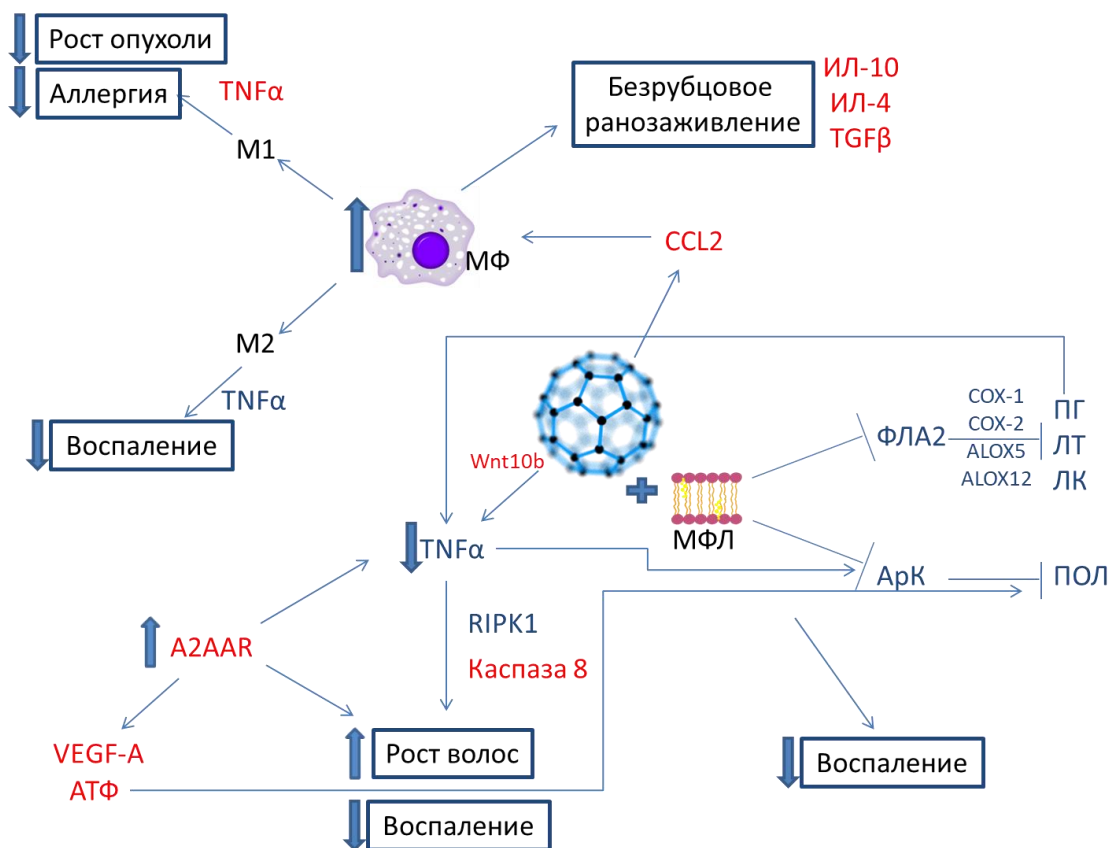


Рис. 166. Возможный механизм биологической активности фуллерена C60.

Надписи синим – снижение показателя, надписи красным – увеличение показателя.

МФЛ - мембранные фосфолипиды; ПГ - простагландины; ЛТ - лейкотриены; ЛК - липоксины; АрК – арахидоновая кислота; ПОЛ – перекисное окисление липидов; МФ – макрофаги; M1 – макрофаги фенотипа M1; M2 – макрофаги фенотипа M2; TNFα - Tumour Necrosis Factor (фактор некроза опухоли); COX-1 - циклооксигеназа 1; COX-2 -

циклооксигеназа 2; ALOX5 - Arachidonate 5-lipoxygenase (Арахидонат-5-липоксигеназа); ALOX12 - Arachidonate 12-lipoxygenase (Арахидонат-12-липоксигеназа); CCL2 - C-C motif ligand 2 или MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), фактор хемотаксиса моноцитов; RIPK1 - Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (серин/треонин-протеинкиназа 1, взаимодействующая с рецептором); VEGF-A - Vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов альфа); АТФ – аденозинтрифосфат; TGF β - трансформирующий фактор роста бета; ИЛ-10 – интерлейкин-10; ИЛ-4 – интерлейкин-4.

Представленная схема разработана для наглядного представления возможного механизма биологической активности фуллерена C60. В частности, схема описывает механизм противовоспалительной активности ВРФ через взаимодействие фуллерена C60 с мембранными фосфолипидами клеток, результатом чего является блокирование процесса высвобождения арахидоновой кислоты и других ПНЖК, что в итоге приводит к остановке ПОЛ и образованию эйкозаноидов. Далее, противовоспалительная активность фуллерена C60 может быть связана с показанной в текущей работе его способностью влиять на поляризацию макрофагов в сторону фенотипа M2. Важно отметить, что макрофаги M2 обладая противовоспалительной активностью играют также важную роль в процессе ранозаживления. Ранозаживляющий эффект ВРФ также был продемонстрирован в текущей работе. На схеме показана его связь со способностью фуллерена C60 привлекать в зону поражения большого количества макрофагов, поскольку было показано увеличение экспрессии фактора хемотаксиса CCL2, а также наглядно продемонстрирован процесс перемещения макрофагов в зону локализации фуллерена C60. Следуя данному предположению в присутствии фуллерена C60 происходит увеличение числа макрофагов и их дифференцировка до фенотипа M2, что приводит к увеличению скорости заживления поражений причем без

образования рубца. Противоаллергический эффект фуллерена C60, по-видимому, обусловлен соответствующей поляризацией макрофагов, прибывших в зону поражения, и развитием Th1 иммунного ответа, поскольку в проведенных экспериментах мы наблюдали снижение цитокинов Th-2 и увеличение ИЛ-12 и IFN γ , а также снижение специфического IgE. Кроме того, была показана способность фуллерена C60 препятствовать дифференцировке макрофагов в присутствии IFN γ +ЛПС в M1, а в присутствии IL-4+IL-13 в M2, соответственно.

Показанное увеличение экспрессии аденозинового рецептора может обуславливать не только противовоспалительную активность фуллерена C60, но и фолликулостимулирующую, учитывая подавление TNF α и стимуляцию экспрессии фактора ангиогенеза *VEGF-A*.

Таким образом, представленная схема иллюстрирует возможные механизмы биологической активности фуллерена C60 и может быть основой для дальнейших исследований в данной области.

4.6. Оценка общетоксических свойств водного раствора фуллерена C60

Стремительное развитие технологии наноструктурированных материалов и масштабирование их производства приводит к тому, что человек, животные и другие биологические объекты оказываются с ними в тесном контакте. Поэтому очень важна оценка потенциальных рисков при проникновении данных веществ в организм. По классификации наноматериалов к основным их типам относят углеродные структуры: фуллерены, нанотрубки, графен, наноалмазы и др. Их в настоящее время активно используют в научных и технологических целях. Открытие в 1990 г. простого эффективного способа препаративного синтеза фуллерена C60 [Kratschmer et al., 1990] послужило толчком к лавинообразному росту исследований его биологической активности и синтеза многочисленных производных, многие из которых показывали антивирусную,

антибактериальную, нейропротекторную, противовоспалительную и противоопухолевую активность. Сам по себе фуллерен нерастворим в водных средах, и основные пути повышения его гидрофильности связаны с его функционализацией путем присоединения гидрофильных аддендов или формированием коллоидных растворов. В водных средах всегда происходит агрегация (кластерообразование) гидрофобных фуллереновых молекул, а стабилизация формируемых кластеров осуществляется за счет приобретения поверхностного отрицательного заряда. Ковалентно модифицированный фуллерен, по сути, уже не остается собственно фуллереном, и данные по токсичности его производных некорректно применять к немодифицированному фуллерену. Последнее замечание связано с тем, что в литературе часто обобщают понятия «фуллерен» и «функционализированный фуллерен», хотя это разные вещества. Более того, введение функциональных групп может нивелировать специфическую электроноакцепторную активность фуллерена и таким образом резко изменить его характерные свойства и взаимодействие с биологической системой. Несмотря на то, что фуллерен C₆₀ используют уже более 20 лет, ни в одной из стран мира он не был изучен на безопасность в полном объеме. В то же время имеется масса публикаций, связанных с анализом отдельных биологических эффектов фуллерена и его производных в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, из большинства которых следует, что серьезных токсических эффектов у немодифицированного фуллерена C₆₀ обнаружено не было. Первые работы по исследованию токсичности фуллерена появились уже в 1995—1996 гг. [Moussa et al., 1995; Moussa et al., 1996]. Было показано, что при введении мышам фуллерена в дозе 2,5 г/кг он не вызывал гибели мышей и побочных эффектов у животных при наблюдении в течение 8 нед. Отмечали, что при внесении фуллерена в среду с культурой человеческих кератиноцитов или фибробластов наблюдают его довольно быстрое поглощение при отсутствии влияния на пролиферацию. В то же время имеется достаточно

много противоречивых данных по токсикологии, которые сложно унифицировать из-за разнообразия использованных препаратов C60 и примененных методов анализа. В 2004 г. неожиданно обнаружили токсическое воздействие водных наносuspензий фуллерена C60 на дафний и на мальков большеротого окуня, которое проявлялось в форме окислительного стресса [Oberdörster et al., 2006]. Однако позже выяснилось, что саму суспензию готовили с применением органического растворителя тетрагидрофурана (ТГФ), который захватывал фуллерен, и токсичность препарата была связана именно с ТГФ [Oberdörster et al., 2007; Jones et al., 2008; Gharbi et al., 2005]. Введение внутрибрюшинно мышам суспензии фуллерена в дозе 100 мг/кг не влияло на их поведенческие реакции (тест Irwin) по сравнению с контролем [Satoh et al., 2006]. При изучении острой пероральной токсичности на крысах для смеси фуллеренов C60 и C70 (фуллерит) в дозе 2000 мг/кг за весь период наблюдения также не выявлено никаких отрицательных эффектов [Mori et al., 2006]. Воздействие фуллерена на кожу изучали на мышах, вводя образец внутрикожно в дозе 200 мг/кг. Через 72 ч не было выявлено никакого влияния ни на синтез ДНК, ни на индукцию орнитиндекарбоксилазы в эпидермисе. После подкожного введения образца фуллерена в дозе 100 мг/кг в течение 24 нед развитие опухолей (в отличие от группы мышей, которым вводили тетрадеканоилфорболацетат) не наблюдалось. Цель данной работы — изучение острой токсичности водного раствора (дисперсии) фуллерена C60 (ВРФ), изготовленного недавно разработанным диализным методом, позволяющим получать с высоким выходом водные растворы фуллерена в очень мягких условиях, без использования токсичных ароматических растворителей и ультразвука [Andreev et al., 2014]

Основная цель настоящего исследования — интегральная оценка возможного токсического эффекта водной дисперсии фуллерена C60, полученной новым диализным методом [Andreev et al., 2014; Andreev et al.,

2015]. Тонкая структура наночастиц в такой дисперсии, по-видимому, отличается от дисперсий C60, получаемых наиболее распространенным методом, включающим ультразвуковую обработку и применение толуола [Mchedlov-Petrosyan et al., 2013]. Ранее мы показали, что ВРФ обладает противоаллергической активностью, а также способен снижать воспалительную реакцию в модели ГЗТ [Bashkatova et al., 2012]. Анализ острой токсичности ВРФ — один из этапов оценки его биологической безопасности и перспективности применения как действующего начала терапевтического средства. В настоящей работе мы установили, что независимо от способа введения токсическим эффектом ВРФ не обладает. Более того, при введении его небольших доз у мышей наблюдали более активный набор массы тела 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 массы тела 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 [Hendrickson et al., 2012] установлено, что водная дисперсия C60, стабилизированная крахмалом, не проявляла хронической токсичности при и/г введении крысам, гематологические и биохимические показатели не отличались от контроля (нормы). Таким образом, все больше данных свидетельствует о биологической безопасности немодифицированной формы фуллерена.

4.7. Оценка фармакокинетики и кинетики выведения фуллерена C60 из организма

Известно, что фуллерен C60 характеризуется высокой липофильностью, сильным сродством к электронам и способностью к формированию кластеров в растворах, что обуславливает его многие биологические эффекты [Пиотровский и др., 2006]. Фуллерен как в свободном виде, так и в форме функциональных производных в настоящее время интенсивно используют в электронике, оптике, косметике в качестве добавок к конструкционным материалам. Однако наибольшие его перспективы связаны с дизайном лекарственных средств [и др., 2006; Shershakova et al., 2016]. Представленные в работе исследования показывают оправданность возможности использования его в качестве биологически активного препарата. В этой связи очень важна задача разработки чувствительных и специфичных методов анализа фуллерена в различных средах, например для изучения фармакокинетических параметров фуллеренсодержащих препаратов. Фуллерен C60 хорошо растворим только в ароматических растворителях (толуол, хлорбензолы, нафталины) и некоторых маслах, и он практически нерастворим в воде ($<0,1$ нг/мл) [Cataldo, 2008]. Но даже в растворенном состоянии молекулы фуллерена имеют высокую склонность к агрегации с формированием кластеров [Vizhak et al., 2001]. Поэтому количественное определение фуллерена, особенно в биологических системах, — довольно трудная задача, причем не только из-за склонности к кластерообразованию, но и из-за его взаимодействия с окружающими молекулами белков, липидов, а также воды. В настоящее время широко развиты методы получения водных растворов (дисперсий) фуллерена, где молекулы C60 организованы в наноразмерные кластеры (50—100 нм), окруженные плотной оболочкой из молекул воды [Mchedlov-Petrosyan et al., 2013]. Дисперсии ВРФ могут рассматриваться как потенциальная основа иммуноактивных препаратов [Shershakova et al., 2016]. Важная задача при проведении биологических

испытаний наноматериалов, в том числе при фармакокинетических исследованиях, — обеспечить стандартизацию, контроль качества препарата и количественный анализ ВРФ в биологических пробах. В случае ВРФ это осложняется тем, что его в биологической среде невозможно спектрофотометрировать прямым путем, особенно в низких концентрациях. Его максимум поглощения лежит в области 330 нм, а флуоресценция настолько слабая, что собственная флуоресценция биомолекул заглушает свечение ВРФ. Поэтому из доступного аналитического арсенала остается только метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с чувствительными и селективными детекторами. Ранее для анализа C60 уже применяли ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометром (МС) [Руске et al., 2011]. Преимущество такого подхода в том, что он позволяет легко дифференцировать продукты модификации фуллерена, который в водной среде может подвергаться окислению и гидроксигированию. Современные методы ВЭЖХ в сочетании с МС-детекцией в зависимости от модификации позволяют обеспечить чувствительность от 1 пг до 10 нг/мл. Используя некоторые приемы, можно анализировать содержание фуллерена в различных средах, обеспечивая одновременно анализ подлинности, чистоты и количественного содержания. В основу предлагаемого метода пробоподготовки был положен процесс перераспределения концентрации экстрагируемого вещества между двумя взаимно несмешивающимися жидкостями. В качестве экстрагентов были выбраны полярные и неполярные растворители: ацетонитрил, толуол, диэтиловый эфир, этилацетат, хлороформ.

В настоящее время существует весьма ограниченное число исследований относительно кинетики распределения фуллерена C60 в форме производных (модифицированного функциональными группами). Основные из них представлены в Главе 1 «Обзор литературы» (п.1.8) текущей работы. Фармакокинетика немодифицированного же фуллерена C60

при накожном и ином введении ранее в научной литературе описана не была.

Из проведенного в текущей работе анализа фармакокинетики фуллерена C60 можно сделать заключение о том, что способ введения сильно влияет на распределение фуллерена C60 в организме. Следует отметить, что пероральное (интрагастральное) и внутривенное введение характеризуются относительно высоким распределением по органам и тканям. Особенно следует выделить тот факт, что фуллерен C60 способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Накожное же введение ВРФ не приводит к активному всасыванию фуллерена C60, однако он обнаруживается в коже, что может свидетельствовать о местной активности фуллерена и отсутствии системного действия его при накожном введении.

Важнейшим аспектом работы является то, что кроме изучения биораспределения свободного фуллерена C60, впервые было показано, что фуллерен C60 может активно выводиться из организма. Во-первых, через почки, и, во вторых, через желчные протоки. Причем исследование было количественным. Наличие фуллерена C60 в моче и кале фиксировалось в течение 72 часов. Степень выведения фуллерена C60 в неизмененном виде составляла, по крайней мере, около 70%. Часть фуллерена C60, вероятно, может метаболизироваться путем окисления в печени и выводится уже в форме метаболитов.

4.8. Прикладной аспект представленных разработок

4.8.1. Патентование биологической активности водного раствора фуллерена C60

1. Патент 2641041, RUS Композиция для терапии атопического дерматита на основе фуллерена.— № 2016149440; заявл. 15.12.2016; опубл. 2018.

2. Патент 2641091, RUS Применение водно-солевого раствора фуллерена C₆₀ в качестве терапевтического средства при заболеваниях атопическим дерматитом.— № 2016149439; заявл. 15.12.2016; опубл. 2018.

3. Патент 2694754, RUS Противовирусная активность водного раствора фуллерена — № 2018136488, заявл. 16.10.2018, опубл. 2019.

4.8.2. Масштабирование технологии получения водного раствора фуллерена C₆₀

Фуллерен является аллотропной разновидностью углерода наряду с известными его формами – графитом, алмазом, карбином, графеном и углеродными нанотрубками. Его открытие состоялось в 1985 г., микроскопические количества фуллерена были получены исследователями путем лазерного испарения графита в пульсирующей струе гелия, масс-спектрометрия показывала, что большинство молекул в парах графита состоят из 60 атомов углерода (C₆₀). Свое название фуллерены получили благодаря американскому инженеру и дизайнеру Р. Бакминстеру Фуллеру, в чьих конструкциях используется замкнутая форма, состоящая из правильных пятиугольников и шестиугольников. За открытие фуллеренов в 1996 г. Г. Крото (Англия), Р. Смолли и Р. Керлу (США) была вручена Нобелевская премия по химии. В 1990 г. В. Кретчмером и Д. Хаффманом был разработан препаративный способ получения фуллерена, что послужило толчком к масштабным исследованиям свойств нового материала и возможностей его применения в различных областях науки и техники. К уникальным параметрам фуллерена и некоторых его производных можно отнести мощную электронно-акцепторную активность, высокую поляризуемость молекулы, наличие большого числа эквивалентных реакционных центров и гидрофобность. Последнее свойство, по-видимому, имеет отношение к их способности проникать через биологические мембраны. Фуллерен и его производные обладают широким спектром биологической активности: антивирусной,

антимикробной, антиоксидантной, нейропротективной, фотодинамической, мембранотропной; кроме того, существует перспектива использования их в качестве ингибиторов ферментов, блокаторов апоптоза и радиопротекторов. Все это говорит о том, что фуллерен как основа является перспективным материалом для создания новых высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов.

Известно, что фуллерен не растворим в воде, и поэтому его перевод в водную среду обычно осуществляется с использованием токсичных органических растворителей. По такой процедуре получения водного раствора фуллерена, выход его очень невелик, в среде остаются токсичные примеси и стоимость такого раствора весьма высока. Эти обстоятельства сильно ограничивают широкое использование фуллерена в медицине.

В 2015 году была запатентована разработанная в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России уникальная технология получения водного раствора фуллерена C₆₀ без применения токсичных растворителей, ультразвуковой обработки и нагревания, что делает его пригодным для использования в медицине (патент RU 2548971, приоритет от 2013) (Рис. 167).



Рис. 167. Патент 2548971, RUS, C01B31/02, B82Y5/00, B82B3/00 Способ получения водных нанодисперсий фуллерена.— № 2013118427; заявл. 22.04.2013; опубл. 2015.

В рамках работ по минигранту от фонда «Сколково» «Разработка технологии получения водорастворимого фуллерена C₆₀, обладающего противоаллергенной активностью» (Соглашение о предоставлении минигранта № МГ6/17 от 22.02.2017), была проведена работа по оптимизации и стандартизации технологии получения водной дисперсии фуллерена C₆₀. В 2019 году была запатентована технология получения уже высококонцентрированного водного раствора фуллерена C₆₀ (Рис.168).



Рис. 168. Патент 2679257, RUS Способ получения высококонцентрированного водного раствора фуллерена — № 2018101687/05(002206), заявл. 17.01.2018, опубл. 2019.

Концентрация получаемого по данной технологии водного раствора фуллерена C₆₀ составляет 1 мг/мл, что, по крайней мере, на порядок выше имеющихся аналогов дисперсий свободного фуллерена. Разработанная технология позволяет получать не токсичный продукт, который может широко использоваться в медицинских целях, в том числе, в качестве основы как для косметических средств, так и для лекарственных препаратов.

В 2019 году на водный раствор фуллерена C₆₀ был получен первый сертификат соответствия о том, что он разрешен для применения в косметологии (РОСС RU.HB25.H01264 от 20.12.2019, срок действия до 19.12.2022). Действующим является сертификат соответствия РОСС RU.32001.04ИБФ1.ОСП18.27421 от 20.12.2022.

4.8.3. Восстанавливающий крем

В 2019 году качестве инновационного продукта был зарегистрирован крем на основе водного раствора фуллерена C60 (свидетельство о государственной регистрации № KG.11.01.09.001.R.004928.11.19 от 18.11.2019). Действующая декларация о соответствии ЕАЭС N RU Д- RU.PA05.B.31256/22 от 03.09.2022.

Фуллерен C60, входящий в состав крема нейтрализует свободные радикалы, интенсивно ухаживает за кожей и способствует ее глубокому восстановлению. Подходит для чувствительной и проблемной кожи. В креме отсутствуют искусственные красители и отдушки, что особенно важно для людей, склонных к аллергическим реакциям.

Многие экспериментальные факты говорят о том, что фуллерен C60 и его производные проявляют разнообразные биологические эффекты, включая противовоспалительные, противовирусные, антибактериальные, радиопротекторные и ряд других, представляя перспективную основу для дизайна терапевтических препаратов. В собственных экспериментах на модели атопического дерматита, пищевой аллергии и анафилактического шока продемонстрирована выраженная противовоспалительная и противоаллергическая активность ВРФ. Также, на модели ожогового и раневого воспаления был показан регенеративный эффект ВРФ.

При подтверждении показанных эффектов у пациентов с соответствующими патологиями лекарственное средство на основе фуллерена C60 может занять определенную нишу на рынке и быть полезно для применения в клинической практике.

Так, например, результатом применения крема на основе фуллерена C60 в составе комплексной терапии на ранних стадиях атопического дерматита может стать снижение частоты проявления АД и, как следствие, уменьшение количества случаев перехода легкой формы заболевания в тяжелую. Использование крема может также снизить потребление топических глюкокортикостероидов, которые имеют ряд нежелательных

побочных эффектов. Применение крема для заживления может способствовать нормальному процессу ренерации ткани, снижая риск образования рубцов/шрамов. Применение ВРФ у животных при моделировании герпес-вирусной инфекции показало статистически значимое снижение ее клинических проявлений. При этом лечебный эффект наступал на сутки раньше по сравнению с ЛС «Ацикловир», который использовался в качестве референс-препарата в форме мази. По результатам исследования, был обозначен ряд свойств ВРФ:

- высокая терапевтическая активность против ВПГ1 *in vitro* и *in vivo*;
- высокий индекс селективности (от 100 до 1000);
- противовоспалительная активность.

Далее, был проведен анализ противогерпетической активности крема в условиях терапевтического применения. Для этого была сформирована группа пациентов N 28 (Табл.39).

Табл. 39. Характеристика групп пациентов.

Пол	Мужчины	Женщины
	12	16
Возраст	От 19 до 59 лет	
Локализация	Лабиальная форма	Генитальная форма
	15	13

Результаты терапии представлены в табл. 40.

Табл. 40. Результаты терапии.

Продолжительность местных симптомов, дни	Покраснение и отек (28 чел.)	Везикулы (8 чел.)	Эрозии (4 чел.)
Зуд	1	2	2
Жжение	1	2	2
Боль	1	2	2-3
Продолжительность фазы отека, гиперемии	2	3-4	2-3
Скорость начала реэпителизации	1	2-3	3-4
Период полной реэпителизации	2	4	5

Из представленной таблицы видно, что применение крема на основе фуллерена C60 в течение 1-2 дней подавляет развитие инфекции при применении на ранней стадии клинических проявлений. Далее, была проведена оценка качества применяемого препарата (Табл. 42).

Табл. 42. Оценка качеств препарата (по 5 бальной шкале).

№.№	Свойства препарата	Баллы
1	Консистенция/текстура	4
2	Цвет	5
3	Запах	5
4	Впитываемость	4
5	Субъективные ощущения на коже	4
6	Легкость применения	5
7	Непереносимость	5

По результатам оценки пациентами качества препарата видно, что средний балл по семи показателям был достаточно высоким и составлял 4,57 балла из 5. Как показал опрос пациентов, снижение балла в основном происходило по причине не обычного коричневатого цвета крема, который придает само действующее вещество фуллерен C60. Некоторые клинические случаи терапии герпес-вирусной инфекции представлены на рисунках 169, 170.

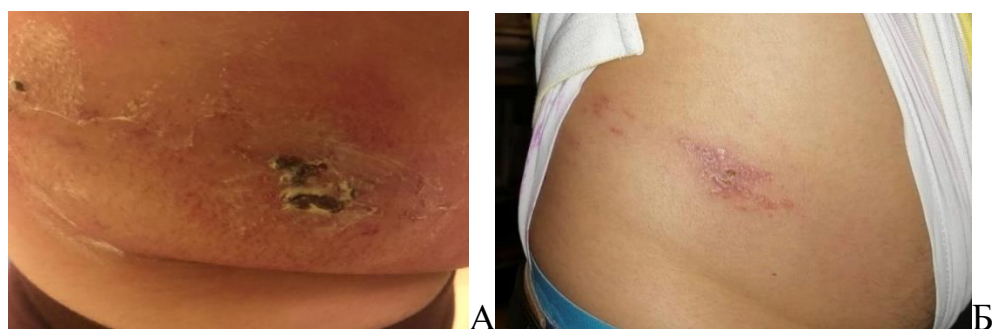


Рис. 169. Опоясывающий лишай. Клинический случай. До использования крема (А); после 5 дней применения крема (Б).



Рис. 170. Герпес. Клинические случаи. До использования крема (А); после 3 дня применения крема (Б).

4.8.4. Спрей для роста волос

Принимая во внимание показанную в представленной работе фолликулостимулирующую активность фуллерена C60, был разработан и задекларирован спрей для роста волос на основе ВРФ (регистрационный номер декларации о соответствии ЕАЭС N RU Д-RU.PA02.B.79800/21 от 22.11.2021).

Данный спрей стимулирует рост волос. В экспериментах *in vivo* на мышах линии Nu/nu было показано, что фуллерен C60 способен стимулировать рост новых волос, о чем свидетельствовала активация Wnt-сигнального пути. Гистологический анализ участков кожи мышей Nu/nu показал, что животные, получавшие ВРФ, имели значительно больше волосяных фолликулов по сравнению с мышами, получавшими буферный раствор (Глава 3, пп.3.4). Спрей для роста волос останавливает процесс выпадения волос, укрепляет структуру волоса и стимулирует рост новых волос. Преимуществом спрея является то, что ВРФ, входящий в состав

спрея, не только стимулирует процессы регенерации, но и обладает противовоспалительным действием. Спрей может использоваться при всех видах выпадения волос, в том числе после перенесенного COVID-19. Подходит для чувствительной и проблемной кожи. Не требует смывания. В спрее отсутствуют искусственные красители и отдушки, что важно для людей, склонных к аллергическим реакциям.

На рисунке 171 показан эффект спрея для роста волос на основе водного раствора фуллерена C60.

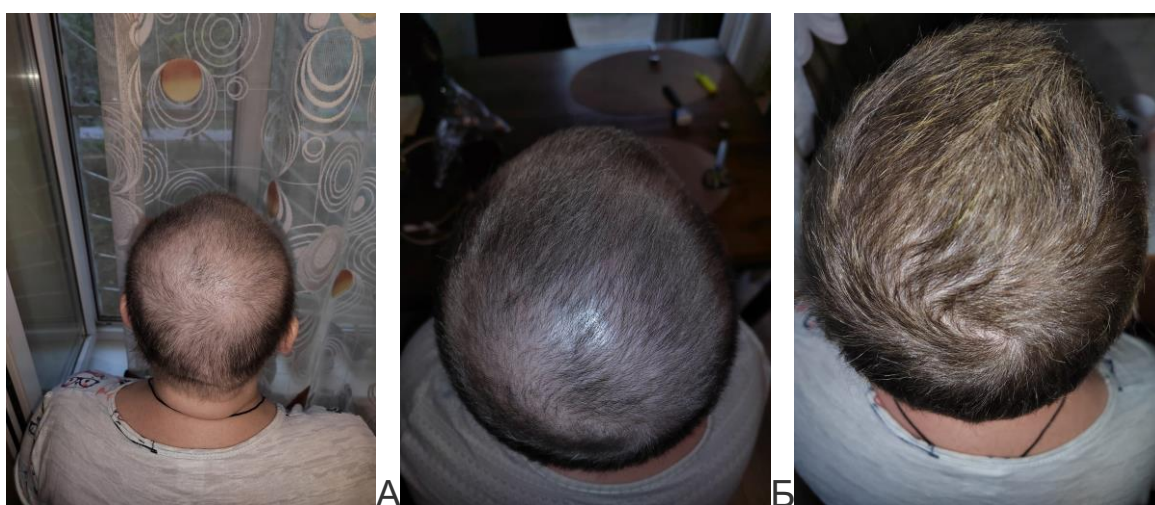


Рис. 171. Фотографии волосистой части головы пациента после применения спрея для роста волос в составе монотерапии. До использования спрея (А); после 11 дней терапии (Б); после 2 месяцев терапии (В).

Представленный клинический случай описывает эффект применения спрея у пациента после курса химиотерапии. Видно, что идет постепенное восстановление роста волос, причем волос не является пушковым.

4.8.5. Разработка новых средств на основе ВРФ, а также перспектива применения ВРФ в области медицины и сельского хозяйства

Наряду с описанными эффектами средств на основе ВРФ, в настоящее время получены новые данные относительно способности

фуллерена C60 укреплять ресницы и даже стимулировать их рост. Кроме того, показан эффект стимуляции роста ногтей и укрепления их структуры (Рис. 172).



Рис. 172. Эффект применения жидкости для ногтей на основе фуллерена C60. До начала использования (А); через неделю после применения жидкости (Б); через месяц после применения жидкости (В).

В анамнезе пациента было несколько курсов химиотерапии, на фоне которых наблюдалось ухудшение состояния ногтей. Специальной терапии для восстановления роста ногтей не проводилось. Представленный клинический случай иллюстрирует, по-видимому, ускорение роста ногтя и снятие воспаления, что приводит к устранению его пораженных участков. Таким образом, на основании полученных новых эффектов в рамках расширения линейки косметических средств на основе ВРФ планируется разработка и выпуск на рынок жидкости для ногтей и состава для укрепления ресниц. Кроме того, перспективными являются следующие косметические/терапевтические средства:

- Ранозаживляющие повязки
- Противовирусные препараты (против вируса гриппа, герпеса, коронавирусов)
- Солнцезащитный крем
- Ополаскиватель для полости рта с противовоспалительным действием

➤ Шампунь для стимуляции роста и укрепления волос.

Важным этапом разработки лекарственных средств является проведение цикла доклинических исследований. Так, на 2024 год запланировано начало проведения доклинических исследований (ДКИ) водного раствора фуллерена C₆₀ для терапии алопеции и пищевой аллергии. Кроме того, перспективной является разработка на основе ВРФ комплексных противовирусных препаратов, в частности для терапии герпеса (Глава 3, пп.3.5), гриппа (данные не представлены) и коронавируса (данные не представлены). Успешное завершение ДКИ позволит в дальнейшем провести клинические испытания для вывода лекарственных средств на рынок и внедрения их в клиническую практику.

Перспективы применения водного раствора фуллерена C₆₀ имеются не только в области косметологии и медицины, но и также в сельском хозяйстве. Потребность в безопасных стимуляторах, оказывающих положительное действие на сельскохозяйственные растения, делает актуальным поиск новых соединений, обладающих свойствами адаптогенов и протекторов. Перспективными соединениями могут служить водорастворимые наноуглеродные материалы, включая водные фуллереновые дисперсии и аддукты фуллеренов, например, фуллеренолы и аминокислотные производные. Гидрофобные свойства ядра фуллерена обеспечивают их повышенную транспортную трансмембранную активность, и в сочетании с антиоксидантными свойствами они могут применяться для ускорения прорастания семян и роста растений, а также для повышения устойчивости растений к возбудителям заболеваний. Ожидается положительное влияние на развитие корневой системы, высоту стебля, а также глубину залегания узла кущения пшеницы. Кроме того, раствор можно использовать на овощных культурах, при производстве грибов, в гидропонике, а также для борьбы с болезнями и вредителями в дендрологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенных исследований было представлено изучение биологической активности водной дисперсии немодифицированного фуллерена C₆₀, ее безопасности, биораспределения, а также осуществлен поиск возможных клеточных мишеней для фуллерена C₆₀ в организме.

В результате изучения влияния водного раствора фуллерена C₆₀ (ВРФ) при накожном и подкожном способах введения на характер иммунного ответа у мышей с экспериментальным атопическим дерматитом (АД) было показано, что при накожных аппликациях C₆₀ наблюдалось снижение уровня специфических IgE, а также уменьшение соотношения IgG1/IgG2a. Кроме того, не зависимо от способа введения раствора фуллерена уровень экспрессии *IL-4* и *IL-5* снижался. При накожном введении раствора фуллерена C₆₀ наблюдалось также повышение экспрессии *IL-12* и *IFN γ* , что свидетельствовало, по-видимому, о сдвиге иммунного ответа в сторону Th1. Важным результатом исследования стало выявление увеличения экспрессии гена белка филагтрина, который является центральным компонентом эпидермального барьера. По результатам гистологического анализа кожи было установлено, что не зависимо от способа введения раствора фуллерена патоморфологические изменения кожи в условиях моделирования АД были выражены слабо. Максимальный терапевтический эффект от применения ВРФ достигался при накожном нанесении.

При моделировании пищевой аллергии анализ клинических, иммунологических и гистологических параметров оценки показал, что введение ВРФ подавлял Th2-иммунный ответ, снижая эозинофилию в тощей кишке тонкого отдела кишечника, а также уменьшая степень проявления аллергической диареи.

В результате оценки способности ВРФ влиять на развитие состояния анафилактического шока, при моделировании данного состояния на

мышьях, было показано, что введение ВРФ на разных этапах сенсibilизации снижало процент смертности животных. Наилучший результат был получен при введении ВРФ (20мкг/мышь) на ранних этапах сенсibilизации. Процент смертности при этом снизился на 50%. В ходе экспериментов между экспериментальными группами было выявлено наличие явной корреляции уровня специфического IgE с клиническими проявлениями реакции анафилактического шока и процентом смертности животных.

При моделировании раневого и ожогового поражения кожи у мышей, было показано, что ВРФ способен стимулировать заживление кожного покрова. Патоморфологический анализ гистологических срезов кожи показал, что нанесение фуллерена C60 улучшает гистологическую картину пораженного участка. Анализ изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в процессы регенерации, ангиогенеза и воспаления кожного покрова у мышей при нанесении фуллерена C60 показал увеличение экспрессии генов *HMGB1* и *VEGF-A*, и подавление экспрессии генов *TNF α* , *IL1 α* , *IL1 β* , *IL6*.

Исследования влияния ВРФ на рост волос при моделировании алопеции показал наличие способности фуллерена C60 стимулировать активность волосяных фолликулов (ВФ) у мышей линии Balb/c и Nu/nu. Визуальная оценка результатов исследования выявила, что при подкожном введении ВРФ эффект стимуляции был сильнее, чем при накожном. Анализ гистологических срезов кожи мышей линии Nu/nu показал, что количество ВФ у животных, получавших ВРФ, было достоверно больше по сравнению с группой, не получавшей терапию. Анализ изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в зарождение, развитие и функционирование волосяных фолликулов, показал, что при подкожном введении ВРФ наблюдалось увеличение экспрессии *Wnt10b*, *DKK1*, *Srd5a2*, *VEGF-A*, *EGF* и *FGFb* генов и пониженная экспрессия гена *TNF α* .

В рамках изучения противовирусной активности ВРФ проведено исследование на модели герпес-вирусной инфекции (ВПГ1) *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что ВРФ предотвращает ВПГ1 инфекцию культуры клеток, обладает способностью нейтрализовать инфекционную активность герпес-вируса, проявляет терапевтические противовирусные свойства в отношении кожной ВПГ1-инфекции у мышей.

В процессе поиска клеточных мишеней для взаимодействия фуллерена C60, была представлена схема, которая иллюстрирует возможный механизм биологической активности фуллерена C60 и может стать основой для дальнейших исследований в данной области. Так, эффекты ВРФ, вероятно, могут быть опосредованы взаимодействием с макрофагами и привлечением их в зону поражения, что играет важную роль в развитии воспаления и процессах заживления. Также было выдвинуто предположение о взаимодействии ВРФ с арил-углеводородным рецептором, с которым тоже могут быть связаны эффекты ВРФ. Была показана способность фуллерена C60 ингибировать экспрессию АУР и цитохромов *CYP1A1* и *CYP1B1* наряду с повышением продукции фактора антиоксидантной защиты *NRF2*.

Изучение острой и хронической токсичности ВРФ при разных способах введения (накожном, подкожном, внутрибрюшинном, интрагастральном и внутривенном) показало отсутствие токсических эффектов. Гибели животных не зафиксировано, снижения веса не происходило. Патологических изменений по показателям периферической крови и гистологическим показателям не выявлено. Однако, в высоких дозах фуллерен C60, будучи инородным, вызывает выраженную макрофагальную реакцию с накоплением в брюшной полости и формированием гранулёмоподобного, но не воспалительного процесса.

Что касается изучения распределения и выведения фуллерена C60, то в рамках исследований было показано, что фуллерен C60 может активно выводиться из организма. Во-первых, через почки, попадая в мочу, и, во

вторых, очевидно, через желчные протоки, попадая затем в фекалии. Наличие его в моче и кале фиксировалось в течение 72 часов. По истечении этого времени даже следовых количеств фуллерена C₆₀ не обнаруживалось. Важно отметить, что степень выведения фуллерена C₆₀ в неизменном виде составляла, по крайней мере, около 70%. Но не исключено, что часть его выводится также в форме метаболитов путем окисления в печени.

В рамках оценки прикладного аспекта представленных исследований, основным является то, что на основе ВРФ в качестве косметических средств были зарегистрированы крем и спрей для роста волос. На данный момент, на ограниченном количестве добровольцев был показан противогерпетический эффект и эффект стимуляции роста волос.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что фуллерен C60 связывается с арил-углеводородным рецептором и влияет на экспрессию АУР-ассоциированных генов, в том числе цитохромов *CYP1A1*, *CYP1B1* и факторов антиоксидантной защиты.
2. Установлено, что водный раствор фуллерена C60 способен влиять на хемотаксис макрофагов, стимулируя экспрессию *CCL2*; выявлено влияние ВРФ на экспрессию провоспалительных генов макрофагов.
3. Водный раствор фуллерена C60 обладает противоаллергической активностью, что показано на моделях атопического дерматита, анафилактического шока и пищевой аллергии *in vivo*.
4. Водный раствор фуллерена C60 обладает регенеративной активностью, что показано на моделях раневого и ожогового воспалений *in vivo*.
5. Водный раствор фуллерена C60 обладает противовирусной активностью, что показано на модели герпес-вирусной инфекции *in vitro* и *in vivo*.
6. Анализ острой и хронической токсичности позволяет отнести водный раствор фуллерена C60 к классу малотоксичных соединений.
7. Анализ фармакокинетики фуллерена C60 показал, что при интрагастральном и внутривенном введениях он обнаруживается в селезенке, печени, легких, почках и мозге. При накожном нанесении фуллерен C60 обнаруживается только в коже. Фуллерен C60 выводится из организма через почки и ЖКТ в течение 72 часов.
8. Водный раствор фуллерена C60 обладает способностью стимулировать рост волос, что показано на модели алопеции *in vivo*. После отмены введения раствора эффект сохраняется.
9. Перспективным направлением исследований является создание лекарственных средств на основе ВРФ для терапии воспалительных и вирусных заболеваний, а также ран и ожогов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ажикова А.К. Исследование гематологических показателей крыс в норме и в условиях термического воздействия / А.К. Ажикова, Г.Ф. Журавлева // Современные проблемы науки и образования
2. Андреев И.М. Аминокислотные производные фуллерена C₆₀ ведут себя как липофильные ионы, проникающие через биологические мембраны / И.М. Андреев, В.С. Романова, А.О. Петрухина и др. // Физика твердого тела. – 2002. – Т. 44. – С. 658-660.
3. Андреев С.М и др. Эффективный способ получения водных нанодисперсий фуллерена C₆₀ // Российские нанотехнологии. – 2014. – Т. 9. – № 7-8. – С. 24-30.
4. Андреев С.М. Иммуногенные и аллергенные свойства конъюгатов фуллерена с аминокислотами и белком / С.М. Андреев, А.А. Бабахин, А.О. Петрухина и др. // Доклады Академии наук. – 2000. – Т. 370. – № 2.
5. Андреев С.М. Способ получения водных нанодисперсий фуллерена / С.М. Андреев, Е.Н. Башкатова, Д.Д. Пургина и др. // Патент №2548971.
6. Андреев С.М. Фуллерены: биомедицинский аспект / С.М. Андреев, Е.Н. Башкатова, Д.Д. Пургина и др. // Иммунология. – 2015. – Т. 36. – С. 57–61.
7. Андреев С.М. Эффективный способ получения водных нанодисперсий фуллерена C₆₀ / С.М. Андреев, Д.Д. Пургина, Е.Н. Башкатова и др. // Российские нанотехнологии. – 2014. – №7-8. – С. 24-30.
8. Андреев С.М. Эффективный способ получения водных нанодисперсий фуллерена C₆₀ / С.М. Андреев, Д.Д. Пургина, Е.Н. Башкатова и др. // Российские нанотехнологии. – 2014. – Т. 9. – № 7-8. – С. 24-30.

9. Андриевский Г.В. Токсичны ли молекулы фуллерена C60? / Г.В. Андриевский, В.К. Ключков, Л. Деревянченко // Фуллерены, нанотрубки, углеродные наноструктуры. – 2005. – №13. – С. 363-376.
10. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А., Котовский Е.Ф. и др. Гистология, эмбриология, цитология: учебник. 6-е изд., перераб. и доп. – 2012. – 800 с.
11. Барабошкина Е.Н. Получение и экспериментальное исследование водорастворимого фуллерена и его производных, подавляющих аллергическое воспаление: дис. – М, 2016.
12. Баранов А.А. Аллергология и иммунология: Клинические рекомендации для педиатров / А.А. Баранов, Р.М. Хаитов // М.: Союз педиатров России. – 2008. – 245 с.
13. Башкатова Е.Н. Изучение модулирующей активности производных фуллерена C60 на реакцию гиперчувствительности замедленного типа / Е.Н. Башкатова, С.М. Андреев, Н.Н. Шершакова и др. // Физиология и патология иммунной системы. – 2012. – №2. – С.17-27.
14. Богданова Ю.Г. Влияние липофильности производных фуллерена C60 на их способность ингибировать пероксидное окисление липидов в водной среде / Ю.Г. Богданова, А.А. Тепанов, В.А. Иоутси и др. // Вестник МГУ. Серия "Химия". – 2012. – Т. 53. – № 4. – С. 241-245.
15. Венгерович Н.Г. Биологическая активность нанобиокмполитов фуллерена C60 / Н.Г. Венгерович, М.А. Тюнин, Е.В. Антоненкова и др. // Иммунология. – 2012. – №12. – С. 161–177.
16. Горожанская Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях // Клин. лаб. диагн. – 2010. – № 6. – С. 28-44.
17. Гуцин И.С. Иммуноглобулин E-мишень противоаллергического действия // Российский аллергологический журнал. – 2004. – №1. – С. 5-9.

- 18.Ершов Ф.И. Интерфероны и их индукторы / Ф.И. Ершов, О.И. Киселев. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2005. – 368 с.
- 19.Зорин В.П. Влияние C60 и углеродных кластеров на функциональные характеристики гранулоцитов / В.П. Зорин, И.Е. Кравченко, В.П. Савицкий и др. // Фуллерены и фуллереноподобные структуры. – 2000. – С. 132–139.
- 20.Иванов О.Л., Молочков В.А., Бутов Ю.С., Кряжева С.С. Кожные и венерические болезни: учебник. – М.: Шико, 2006. – 480 с.
- 21.Каратеев АЕ, Алейникова ТЛ. Эйкозаноиды и воспаление. Современная ревматология. 2016;10(4):73–86
- 22.Лусс Л.В. Пищевая аллергия и пищевая непереносимость // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 3. – С. 107–114.
- 23.Меджидова М.Г. Противовирусная активность аминокислотных производных фуллерена при цитомегаловирусной инфекции *in vitro* / М.Г. Меджидова, М.В. Абдуллаева, Н.Е. Федорова и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49. – № 8-9. – С. 13-20.
- 24.Миронова А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К., 2012. – 944 с.
- 25.Михеев И.В. Анализ водных дисперсий немодифицированных фуллеренов: дис. – М, 2018.
- 26.Мунблит Д.Б. Определение специфических IgG-антител к пищевым продуктам в диагностике пищевой аллергии: миф или реальность? / Д.Б. Мунблит, И.А. Корсунский // РМЖ. – 2016. – № 18. – С. 1206–1209.
- 27.Hu Z., Guan W., Wang W. et al. Protective effect of a novel cystine C60derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells //Chemico-biological interactions. – 2007. – Т. 167. – №. 2. – С. 135-144.

- 28.Нажмутдинова Д. К. Алопеция: диагностика и лечение / Д.К. Нажмутдинова, Т.В. Таха // Медицинский совет. – 2010. – № 5-6. – С. 87-91.
- 29.Нефедова Н.А. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе / Н.А. Нефедова, С.Ю. Давыдова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 1-14.
- 30.Никулицкий С.И. Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека: дис. – М, 2018. – С. 11-29.
- 31.Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д., Уразова О.И. Патифизиология: учебник. 4-е изд., перераб. и доп. – ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т.1. – 848 с.
- 32.Овчаренко Ю.С. Болезни волос: клинические аспекты // Международный медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С. 111-115.
- 33.Орлова М.А. Производные фуллерена как модуляторы процессов клеточной пролиферации и апоптоза / М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, А.П. Орлов и др. // Новые направления медицинской науки. Онкогематология. – 2012. – №4. – С. 7-10.
- 34.Орлова М.А. Противоопухолевая активность производных фуллерена и возможности их использования для адресной доставки лекарств / М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, А.П. Орлов и др. // Онкогематология. – 2013.
- 35.Осава Э. Суперароматичность // Кагаку. – 1970. – Т. 25. – С. 854–863.
- 36.Основные механизмы повреждения клеток: учебное пособие для самостоятельной работы студентов медицинских вузов. ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва. – 2016. – 55 с.

- 37.Патент 2548971, RUS, C01B31/02, B82Y5/00, B82B3/00 Способ получения водных нанодисперсий фуллерена.— № 2013118427; заявл. 22.04.2013; опубл. 2015
- 38.Патент 2679257, RUS Способ получения высококонцентрированного водного раствора фуллерена — № 2018101687/05(002206), заявл. 17.01.2018, опубл. 2019
- 39.Паттерсон Р. Аллергические болезни. Диагностика и лечение / Р. Паттерсон, Л.К. Греммер. – М.: ГОЭТАР, 2000. – 733 с.
- 40.Пиотровский Л.Б. Фуллерены в биологии / Л.Б. Пиотровский, О.И. Киселев. – СПб.: ООО «Издательство Росток», 2006. – 336 с.
- 41.Пиотровский Л.Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ // Российские нанотехнологии. – 2007. – Т. 2. – №. 7-8. – С. 6-18.
- 42.Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. – СПб.: Росток. – 2006. – 336 с.
- 43.Ревакина В.А. Атопический дерматит: роль цитокинов в механизмах развития / В.А. Ревакина, Д.С. Коростовцев // Аллергология. – 2000. – №1. – С. 41-47.
- 44.Рёкен М. и др. Наглядная аллергология // Бином. Лаборатория знаний. – 2008.
- 45.Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ). Федеральные клинические рекомендации по диагностике и терапии анафилаксии // Москва. – 2018.
- 46.Самцов А.В. Дерматовенерология: учебник для медицинских вузов / А.В. Самцов, В.В. Барбинов. – СПб.: СпецЛит, 2008. – 352 с.
- 47.Сивак К.В. Аденозиновый рецептор А 2А как лекарственная мишень для терапии сепсиса / К.В. Сивак, А.В. Васин, В.В. Егоров и др. // Molecular Biology. – 2016. – №50. – С. 231-245.
- 48.Сидоров Л.Н. Химия фуллеренов / Л.Н. Сидоров, Ю.А. Макеев // Соросовский Образовательный Журнал. – 2000. – № 5. – С. 21-25.

- 49.Смирнов В.В. Количественное определение фуллерена C₆₀ в водных средах / В.В. Смирнов, А.Е. Петухов, С.М. Андреев и др. // Иммунология. – 2016. – Т. 37. – С. 343-347.
- 50.Солошенко Э.Н. Клинические разновидности алопций: патогенез, дифференциальная диагностика, терапия // Международный медицинский журнал. – 2009. – № 1. – С.102-109.
- 51.Сравнительное изучение биологической активности биогликанов из дальневосточной мидии *Crenomytilus Grayanus* / В.И. Молчанова [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – №1. – С.47-5
- 52.Сыренский А.В. Предпосылки к изучению сердечно-сосудистых эффектов производных фуллерена (обзор литературы) / А.В. Сыренский, М.М. Галагудза, Е.И. Егорова // Артериальная гипертензия. – 2004. – Т. 10. – №. 3.
- 53.Титов Л.П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология / Л.П. Титов, И.А. Карпов // Медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 4–14.
- 54.Узбеков М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях // Социальная и клиническая психиатрия. – 2015. – Т. 25. – № 4. – С. 92–101.
- 55.Уразов С.П. Фосфолипаза А₂: биомаркер воспаления аутоиммунных, бактериальных и вирусных заболеваний / С.П. Уразов, А.Н. Чернов, А.В. Черкас и др. // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24. – № 4. – С. 705-728.
- 56.Харкевич Д.А. Фармакология: учебник для вузов. 10-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 908 с.
- 57.Чурина Е.Г. Макрофаги при бактериальных болезнях легких: фенотип и функции (обзор) / Е.Г. Чурина, А.В. Ситникова, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – 18. – С. 142–154.

- 58.Шершакова Н.Н. и др. Развитие модели атопического дерматита в естественных условиях // Физиология патологий иммунной системы. –2011. – 5. – С. 3-10.
- 59.Шершакова Н.Н. Противоаллергические свойства водорастворимой формы фуллерена C60 / Н.Н. Шершакова, С.М. Андреев, Е.Н. Барабошкина и др. // Иммунология. – 2016.
- 60.Шипелин В.А и др. Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллерена C60 при его введении в желудочно-кишечный тракт крыс // Гигиена и санитария. – 2012. – № 2. – С. 90–94.
- 61.Шубина В.С. Влияние липосомных препаратов на основе комплексов таксифолина с металлами переменной валентности на регенерацию кожи при химическом ожоге / В.С. Шубина, Ю.В. Шаталин // Цитология. – 2012. – №3. – С. 251-260.
- 62.Ярилин А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2010. – 752с.
- 63.Abbas A. Basic Immunology functions and disorders of the immune system // Elsevier. – 2006.
- 64.Aksentijevich M., Lateef S.S., Anzenberg P., Dey A.K., Mehta N.N., Chronic inflammation, cardiometabolic diseases and effects of treatment: psoriasis as a human model //Trends Cardiovasc. Med. – 2020. – Vol. 30. – P.472–478.
- 65.Alam R. et al. Use of IABP in contrast media-induced anaphylactic shock: the ultimate lifesaver // Case Reports. – 2013.
- 66.Albina J.E. et al. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha // Am J Physiol Cell Physiol. – 2001. – Vol. 281. – P. 1971–1977.
- 67.Aleem D., H. Tohid, Pro-inflammatory cytokines, biomarkers, genetics and the immune system: a mechanistic approach of depression and psoriasis, Rev. Colomb. Psiquiatr. 47 (2018) 177–186. H. Wyns, E. Plessers, P. De Backer, E. Meyer, S. Croubels, In vivo porcine

- lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 166 (2015) 58–69.
68. Al-Salam S. et al. Cellular and Immunohistochemical Changes in Anaphylactic Shock Induced in the Ovalbumin-Sensitized Wistar Rat Model // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9(3). – P. 101.
 69. Aluru N. Brain transcriptomics in response to betanaphthoflavone treatment in rainbow trout: the role of aryl hydrocarbon receptor signaling / N. Aluru, M.M. Vijayan // *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* – 2008. – №87. – PP. 1-12.
 70. Aluru N. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling // *Gen Comp Endocrinol.* – 2009. – №164. – P. 142-50.
 71. Andreev I. et al. Penetration of Fullerene C60 Derivatives through Biological Membranes. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* – 2008. – 16. – P. 89–102.
 72. Andreev I. Penetration of fullerene C60 derivatives through biological membranes / Andreev I., Petrukhina A., Garmanova A., Andreev S., Romanova V., Troshin P., Troshina O., DuBuske L. // *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures*. – 2008. – № 16. – PP. 89–102,
 73. Andreev I. Penetration of fullerene C60 derivatives through biological membranes / Andreev I., Petrukhina A., Garmanova A., Andreev S., Romanova V., Troshin P., Troshina O., DuBuske L. // *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures*. – 2008. – № 16. – PP. 89–102
 74. Andreev S. et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution // *Fullerenes, Nanotub Carbon Nanostruct.* – 2015. – Vol. 23. – P. 792-800
 75. Andreev S. et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution // *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*. — 2015. — V. 23. — № 9. — P. 792-800

- 76.Andreev S.M. et al. Facile preparation of aqueous fullerene C60 nanodispersions // Nanotechnologies in Russia. – 2014. – P. 369—79.
- 77.Andrievsky G. et al. Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures // Journal of Analytical Chemistry. – 2005. – Vol. 13. – P. 363-376.
- 78.Arai K.Y. et al. Stimulatory effect of fibroblast-derived prostaglandin E₂ on keratinocyte stratification in the skinequivalent / Arai K.Y., Fujioka A., Okamura R., Nishiyama T. // Wound Repair Regen. – 2014. – Vol. 22. – N6. – P. 701-711.
- 79.Araújo F.T.M. et al. Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at centro de pesquisas rené rachou // Resbcal. – 2015. – Vol. 3. – N2. – P. 95-102.
- 80.Arck P.C. et al. Topical minoxidil counteracts stress-induced hair growth inhibition in mice // Exp. ermatol. – 2003. – Vol. 12. – P. 580–590.
- 81.Arkwright P. et al. Management of Difficult-to-Treat Atopic Dermatitis // Ibid. – 2013. – P. 142–151.
82. Aschberger K. et al. Review of fullerene toxicity and exposure–appraisal of a human health risk assessment, based on open literature // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2010. – Vol. 58. – №. 3. – P. 455-473.
- 83.Ashcroft G.S. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing // Wound Rep Reg. – 2012. – Vol. 20. – P. 38–49.
- 84.Baati T. et al. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene // Biomaterials. – 2012. – T. 33. –№. 19. – P. 4936-4946.
- 85.Babakhin A. et al. Inhibition of Systemic and Passive Cutaneous Anaphylaxis by Water-Soluble Fullerene C60 // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2009. – №123(2). – P. 118.

86. Baker G.L. et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles // *Toxicological sciences*. – 2008. – T. 101. – №. 1. – P. 122-131.
87. Bakry R. et al. Medicinal Applications of Fullerenes // *Int. J. Nanomed.* – 2007. – Vol. 2. – P. 639–649.
88. Bălan H. et al. Anaphylactic shock: are we doing enough and with the right timing and order? // *Romanian Journal of Internal Medicine*. – 2015. – Vol. 53(3). – P. 191–198.
89. Bao P. et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing // *J Surg Res*. – 2009. – Vol. 153. – N2. – P. 347–358.
90. Barland C.O. Imiquimod-induced interleukin-1 alpha stimulation improves barrier homeostasis in aged murine epidermis // *J. Invest. Dermatol.* – 2004. – Vol. 122. – N2. – P. 330-336.
91. Bashkatova E.N., Andreev S.M., Shershakova N.N., Babakhin A.A., Shilovsky I.P., Khaitov M.R. Study of modulating the activity of C60 fullerene derivatives on delayed type hypersensitivity reaction. *Physiol. Pathol. immune system*. 2012; 2: 17—27. (in Russian)
92. Belgorodsky B. et al. Formation of a soluble stable complex between pristine C60-fullerene and a native blood protein // *Chembiochem*. – 2006. – 7. – P. 1783-1789
93. Bessede A. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway // *Nature*. – 2014. – №511. – P. 184–190.
94. Bilic J. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation // *Science*. – 2007. – Vol. 316. – N5831. – P. 1619–1622.
95. Bisaglia M. et al. C3-fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis // *Journal of neurochemistry*. – 2000. – T. 74. – №. 3. – P. 1197-1204.
96. Blázquez A. et al. Microbiome and food allergy // *Transl Res*. – 2017. – P. 199

97. Bochvar D. A. and E. G. Gal'pern, "On hypothetical systems: carbododecahedron, s-icosahedron, and carbo-s-icosahedron", Dokl. Acad. Nauk SSSR, 1973, 209:3, 610–612
98. Bosi S. et al. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications // Eur. J. Med. Chem. –2003. – P.913–923.
99. Bosi S. et al. Synthesis and Anti-HIV properties of new water-soluble bis-functionalized[60]fullerene derivatives // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, – 2003. – Vol.13(24). – P. 4437–4440.
100. Bouffi C. et al. IL-33 Markedly Activates Murine Eosinophils by an NF-kappa B-Dependent Mechanism Differentially Dependent upon an IL-4-Driven Autoinflammatory Loop // J Immunol. –2013. – Vol. 191. – P. 4317–4325
101. Calvani M. et al. Hypoxic induction of an HIF-1 α dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells / Calvani M., Rapisarda A., Uranchimeg B. // Blood. – 2006. – Vol. 107. – P. 2705–2712.
102. Cao R et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2 / Cao R., Brakenhielm E., Pawliuk R., Wariaro D., Post M.J., Wahlberg E., Leboulch P., Cao Y. // Nat. Med. 2003. – Vol. 9. – N5. – P. 604-613.
103. Cao R. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2 / Cao R., Brakenhielm E., Pawliuk R., Wariaro D., Post M.J., Wahlberg E., Leboulch P., Cao Y. // Nat. Med. 2003. Vol. 9. – N5. – P. 604-613.
104. Carnicero E. Differential roles of fibroblast growth factor-2 during development and maintenance of auditory sensory epithelia / Carnicero E., Zelarayan L.C., Rüttiger L., Knipper M., Alvarez Y., Alonso M.T., Schimmang T. // J. Neurosci. Res. 2004. Vol. 77. – N6. – P.787-797.

105. Castro, E.; Hernandez, G; Zavala, G; Echegoyen, L. Fullerenes in Biology and Medicine. *J. Mater. Chem. B* 2017, 5, 6523–6535. DOI: 10.1039/c7tb00855d.
106. Cataldo F. Solubility of fullerenes in fatty acids esters: a new way to deliver in vivo fullerenes. Theoretical calculations and experimental results. *Carbon Mater. Chem. Physics*. 2008; 1: 317—35
107. Caubet J.-Ch., Boguniewicz M., Eigenmann Ph. Evaluation of food Allergy in patients with atopic dermatitis // *J Allergy Clin Immunology: In Practice*. 2013; 1: 22–28.
108. Chang, X. L., Ruan, L., Yang, S. T., Sun, B., Guo, C., Zhou, L., ... & Yang, M. (2014). Quantification of carbon nanomaterials in vivo: direct stable isotope labeling on the skeleton of fullerene C60. *Environ. Sci.: Nano*, 1, 64-70. DOI: 10.1039/C3EN00046J
109. Chang, X. L., Ruan, L., Yang, S. T., Sun, B., Guo, C., Zhou, L., ... & Yang, M. (2014). Quantification of carbon nanomaterials in vivo: direct stable isotope labeling on the skeleton of fullerene C60. *Environ. Sci.: Nano*, 1, 64-70. DOI: 10.1039/C3EN00046J
110. Chatila T.A. Role of regulatory T cells in human diseases / T.A. Chatila // *J. Allergy. Clin. Immunol.* - 2005. - Vol. 116. - P. 949-959.
111. Chatila T.A. Role of regulatory T cells in human diseases // *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2005,116. - P. 949-959
112. Chen J, Liang J, Xu H, Liu W, Liu S, Duan L, Li F, Wang Z, Liu Y, McSharry B, Feng CG, Zhang G. Targeting Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Enhances Type I Interferon-Independent Resistance to Herpes Simplex Virus. *Microbiol Spectr.* 2021 Oct 31;9(2):e0047321. doi: 10.1128/Spectrum.00473-21
113. Chen L. et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice / Chen L., Xu Y., Zhao J., Zhang Z., Yang R., Xie J., Liu X., Qi S. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – N4.

114. Chen L. et al. Differential expression of HIF-1 α in skin and mucosal wounds / Chen L., Gajendrareddy P.K., DiPietro L.A. // *J Dent Res.* – 2012. – Vol. 91. – N9. – P. 871-876.
115. Chen X. et al. The effect of porcine ADM to improve the burn wound healing / Chen X., Shi Y., Shu B., Xie X., Yang R., Zhang L., Ruan S., Lin Y., Lin Z., Shen R., Zhang F., Feng X., Xie J. // *Int J Clin Exp Pathol.* 2013. – Vol. 6. – N11. – P. 2280–2291.
116. Chen Y. W. et al. 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. – P. 21-26.
117. Chen, T.; Li, Y. Y.; Zhang, J. L.; Xu, B.; Lin, Y.; Wang, C. X.; Guan, W. C.; Wang, Y. J.; Xu, S. Q. Protective Effect of C(60)-Methionine Derivate on Lead-Exposed Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *J. Appl. Toxicol.* 2011, 31, 255–261. DOI:10.1002/jat.1588.
118. Cho Y.-H., Kim N.-H., Khan I., et al. Anti-inflammatory potential of quercetin-3-O- β -D-(“2”-galloyl)-glucopyranoside and quercetin isolated from *Diospyros kakicalyx* via suppression of MAP signaling molecules in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Food Science.* 2016;81(10):C2447–C2456. doi: 10.1111/1750-3841.13497
119. Choudhry Z. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network / Choudhry Z., Rikani A.A., Choudhry A.M., Tariq S., Zakaria F., Asghar M.W., Sarfraz M.K., Haider K., Shafiq A.A., Mobassarrah N.J. // *Ann. Neurosci.* 2014. Vol. 21. – N1. – P. 28-31.
120. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease – *Cell.* 2006. Vol. 127. – N3. – P. 469–480.
121. Climaco-Arvizu S, Domínguez-Acosta O, Cabañas-Cortés MA, Rodríguez-Sosa M, Gonzalez FJ, Vega L, Elizondo G. Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2

- macrophage polarization. *Life Sci.* 2016 Jun 15;155:76-84. doi: 10.1016/j.lfs.2016.05.001
122. Coca A.F. On classification of the phenomena of hypersensitiveness / A.F. Coca, R.A. Cooke // *J. Immunol.* - 1923. - Vol. 10. - P. 445-447.
 123. Costa C.L.A., Chaves I.S., Ventura-Lima J. et al. In vitro evaluation of coexposure 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.
 124. Creuzet S. et al. Negative Effect of Hox Gene Expression on the Development of the Neural / Creuzet S., Couly G., Vincent C., Douarin N.M. // *Development.* 2002. Vol. 129. – N18. – P.4301-4313.
 125. Creuzet S. Negative Effect of Hox Gene Expression on the Development of the Neural / Creuzet S., Couly G., Vincent C., Douarin N.M. // *Development.* 2002. Vol. 129. – N18. – P.4301-4313.
 126. Dardenne A.D. et al. The alarmin HMGB-1 influences healing outcomes in fetal skin wounds / Dardenne A.D., Wulff B.C., Wilgus T.A. // *Wound Repair Regen.* – 2013. – Vol. 21. – N2. – P. 282-291.
 127. Dassule H.R. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth / Dassule H.R., Lewis P., Bei M., Maas R., McMahon A.P. // *Development.* 2000. Vol.127. – N22. – P. 4775–4785.
 128. de Luca D., Capoluongo E., Rigo V., the Study group on Secretory Phospholipase in Paediatrics (SSPP). Secretory phospholipase A2 pathway in various types of lung injury in neonates and infants: a multicentre translational study. *BMC Pediatr.*, 2011, Vol. 11, 101. doi: 10.1186/1471-2431-11-101; Deng M., Yin Y., Zhang Q., Zhou X., Yang T., Hou G., Wang C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts exercise tolerance in COPD patients. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 670971. doi: 10.3389/fimmu.2021.670971
 129. de Matos O.G., Amaral S.S., Pereira da Silva P.E., Perez D.A., Alvarenga D.M., Ferreira A.V., Alvarez-Leite J., Menezes G.B., Cara

- D.C. Dietary supplementation with omega-3-PUFA-rich fish oil reduces signs of food allergy in ovalbumin-sensitized mice // Clin Dev Immunol. 2012; 2012:236-564. doi: 10.1155/2012/236564. Epub 2011 Nov 17.
130. Deguchi. Sh. and Mukai, S.A. Top-down Preparation of Dispersions of C60 Nanoparticles in Organic Solvents. Chem. Lett. 2006, 35(4), 396–397
 131. Del Carpio-Orantes L. et al. Anaphylactic shock associated with ceftriaxone, case report and literature review / Del Carpio-Orantes L, Azuara-Trujillo HA. // Rev Med Inst Mex Seguro Soc - 2015 - Vol.53(6) - P.736-41.
 132. Dellinger A., Zhou Z., Lenk R., MacFarland D., Conrad D., Kepley C.L. (2009). Fullerene nanomaterials inhibit phorbol myristate acetate-induced inflammation. Exp. Derm., 2009,18(12):1079-1081.
 133. Dellinger AL. et al. Inhibition of Inflammatory Arthritis Using Fullerene Nanomaterials / Dellinger AL, Cunin P, Lee D, Kung AL, Brooks DB, Zhou Z, Nigrovic PA, Kepley CL. // PLoS One - 2015 Vol.10(4).
 134. Dellinger, A.; Zhou, Z.; Connor, J.; Madhankumar, A.B.; Pamujula, S.; Sayes, C.M.; Kepley, C.L. Application of Fullerenes in Nanomedicine: an Update. Nanomedicine. (Lond). 2013, 8, 1191-208.
 135. Deppe J. et al. Impairment of hypoxia-induced HIF-1 α signaling in keratinocytes and fibroblasts by sulfur mustard is counteracted by a selective PHD-2 inhibitor / Deppe J., Popp T., Egea V., Steinritz D., Schmidt A., Thiermann H., Weber C., Ries C. // Arch Toxicol. – 2016. – Vol. 90. – N5. – P. 1141-1150.
 136. Deshmane S.L. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. // J. Interferon Cytokine Res. - 2009. №29(6). -PP. 26-31.
 137. DeSouza R.M. Pediatric medulloblastoma – update on molecular classification driving targeted therapies/ DeSouza R.M.; Jones B.R.,

- Lowis S.P.; Kurian K.M. // *Frontiers in Oncology*. 2014. Vol. 22. – N4. – P. 1-8.
138. Dinarello C.A. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. // *Mol Med*. - 2014. №20. - PP. 43-58.
 139. Dunn L. et al. Murine Model of Wound Healing / Dunn L., Prosser H.C.G, Tan J.T.M., Vanags L.Z., Ng M.K.C., Bursill C.A. // *Journal of Visualized Experiments*. – 2013. – Vol. 75. – P. 1-6.
 140. Duscher D. et al. Fibroblast-Specific Deletion of Hypoxia Inducible Factor-1 Critically Impairs Murine Cutaneous Neovascularization and Wound Healing / Duscher D., Maan Z.N., Whittam A.J., Sorkin M., Hu M.S., Walmsley G.G., Baker H., Fischer L.H., Januszyk M., Wong V.W., Gurtner G.C. // *Plast Reconstr Surg*. – 2015. – Vol. 136. – N5. – P. 1004-1013.
 141. Edamitsu T. AHR and NRF2 in Skin Homeostasis and Atopic Dermatitis / Edamitsu T., Taguchi K., Okuyama R., Yamamoto M. // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – №11(2). – P. 227.
 142. Esser C, Bargon I, Weighardt H, Haarmann-Stemmann T, Krutmann J. Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin Immunopathol*. 2013, 35(6):677–691
 143. Expert Reviews in Molecular Medicine (2003). The phases of cutaneous wound healing. 5:1. Cambridge University Press.
 144. Fan Z-W. et al. Blumea balsamifera Oil for the Acceleration of Healing of Burn Injuries / Fan Z.-W., Pang Y.-X., Wang K., Yu L., Wang D., Yang Q., Ma Q.-S., Li X.-T., Zou J., Zhang W.-Q., Wu L.-F. // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – N9. – P. 17166-17179.
 145. Foitzik K. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF- β 1 in vivo / Foitzik K., Lindner G., Mueller-Roever S., Maurer M., Botchkareva N., Botchkarev V., Handjiski B., Metz M., Hibino T., Soma T., Dotto G. P., Paus R. // *FASEB J*. 2000. Vol. 14. – N5. – P.752-760.

146. Forbes E.E., Groschwitz K., Abonia J.P., Brandt E.B., Cohen E., Blanchard C., Ahrens R., Seidu L., McKenzie A., Strait R., Finkelman F.D., Foster P.S., Matthaei K.I., Rothenberg M.E., Hogan S.P. IL-9- and mast cell-mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity // *The Journal of experimental medicine*. 2008; 205:897–913. [PubMed: 18378796]
147. Francisco N.M. TNF-dependent regulation and activation of innate immune cells are essential for host protection against cerebral tuberculosis. / Francisco N.M. [et al.] // *J. Neuroinflammation*. - 2015. №12. - PP. 125-126.
148. Friedline R.H. Nguyen H. CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance / R.H. Friedline, D.S. Brown // *J. Exp. Med*. - 2009. - Vol. 206. - N. 2. - P. 421- 434.
149. Fu Cao, Xiaolin Li, et.al. *Env Toxicol Pharmacol* 2013 36(2):626-635
150. Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 338, 311–317
151. Fujimoto T, Ito S, Ito M, Kanazawa H, Yamaguchi S. Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene. *Lasers Surg Med*. 2012 Oct;44(8):685-94. doi: 10.1002/lsm.22065. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22899448
152. Fujita K. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C60 fullerene particles. / Fujita K. [et al.] / *Toxicology*. - 2009. №258(1). - PP. 47-55.
153. Furue M., Tsuji G., Mitoma Ch., Nakahara T., Chiba T., Morino-Koga S., Uchi H. Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor. *J. Dermatol. Sci.*, 2015, 80, 83–88
154. 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.
155. Ghadami M. Genetic mapping of the Camurati-Engelmann disease locus to chromosome / Ghadami M., Makita Y., Yoshida K., Nishimura G., Fukushima Y., Wakui K. et al. // Am. J. Hum. Genet. 2000. Vol. 66. – N1. – P.143-147.
 156. 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.
 157. Gharbi N. et al. [60] Antibody production antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity / Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. // Nano Lett. - 2005 - Vol.5(12) - P.2578-2585.
 158. Gharbi N. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity / Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. // Nano Lett. – 2005. – № 5(12). – PP. 2578–2585.
 159. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson, S.R. and Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. Nano Lett. 2005; 5(12): 2578—85.
 160. 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, 5, 2578–2585. DOI: 10.1021/nl051866b.
 161. Giovannoni F AHR signaling is induced by infection with coronaviruses / Giovannoni F, Li Z, Remes-Lenicov F, Dávola M.E, Elizalde M, Paletta A, Ashkar A.A, Mossman K.L, Dugour A.V, Figueroa JM, Barquero A.A, Ceballos A, Garcia C.C, Quintana F.J. // Nat Commun. – 2021. – №12(1). – P. 5148.

162. Giust D, León D, Ballesteros-Yañez I, Da Ros T, Albasanz JL, Martín M. Modulation of adenosine receptors by [60]fullerene hydrosoluble derivative in SK-N-MC cells. *ACS Chem Neurosci*. 2011 Jul 20;2(7):363-9. doi: 10.1021/cn200016q
163. Godwin A. et al. Receptor-Interacting Protein Kinase 3 Deficiency Delays Cutaneous Wound Healing / Godwin A., Sharma A., Yang W.-L., Wang Z., Nicastro J., Coppa, G.F., Wang P. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – N10.
164. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 4;110(23):9415-20. doi: 10.1073/pnas.1300290110. Epub 2013 May 20. PMID: 23690624; PMCID: PMC3677454
165. Golias J., Schwarzer M., Wallner M., Kverka M., Kozakova H., Srutkova D., Klimesova K., Sotkovsky P., Palova-Jelinkova L., Ferreira F., Tuckova L. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. // *PLoS One*. 2012; 7 (5): e37156. doi: 10.1371/journal.pone.0037156
166. Goodarzi S., Da Ros T., Conde J., Sefat F., Mozafar M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Material Today*, 2017,
167. Goodarzi, S.; Da Ros, T.; Conde, J.; Sefat, F.; Mozafari, M. Fullerene: Biomedical Engineers Get to Revisit an Old Friend. *Mater. Today* 2017, 20, 460–480. DOI: 10.1016/j.mattod.2017. 03.017.
168. Gordon M.D. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors / Gordon M.D., Nusse R. // *J. Biol. Chem*. 2006. Vol. 281. – N32. – P. 22429–22433.
169. Goswami R., Kaplan M.H. A brief history of IL-9 // *J Immunol*. 2011; 186:3283–3288.
170. Gragnani A. et al. Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients / Gragnani A., Cezillo M.V., da Silva I.D., de Noronha S.M., Correa-

- Noronha S.A., Ferreira L.M. // *Burns*. – 2014. – Vol. 40. – N5. – P. 947-956.
171. Grellner W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds / Grellner W. // *Forensic Science International*. – 2002. – Vol. 130. – P. 90-96.
172. Gumral N Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods / Gumral N., Naziroglu M., Ongel K., Beydilli E.D., Ozguner F., Sutcu R., Caliskan S., Akkaya A. // *Cell Biochem. Funct.* – 2009. – №27. – PP. 276–283.
173. Gurtner G.C. et al. Wound repair and regeneration / Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. // *Nature*. – 2008– Vol. 453. – N15. – P. 314-321.
174. Haas K. Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity / Haas K, Weighardt H, Deenen R, Kohrer K, Clausen B, Zahner S, Boukamp P, Bloch W, Krutmann J, Esser C. // *J. Investig. Derm.* – 2016. – №136. – PP. 2260–2269.
175. Haskó G, Pacher P. Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Apr;32(4):865-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.226852. PMID: 22423038; PMCID: PMC3387535
176. Haskó, G (January 2004). “Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity”. *Trends in Immunology.* 25 (1): 33—39. DOI:10.1016/j.it.2003.11.003
177. 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.

178. Hendrickson O. D., Zherdev A. V., I. V. Gmoshinskii, 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.
179. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P., Dzantiev B. Production of monoclonal antibodies against fullerene C60 and development of a fullerene enzyme immunoassay. *Analyst*. 2012; 137(1): 98—105.
180. Hernandez A. et al. Immunobiology and application of toll-like receptor 4 agonists to augment host resistance to infection // *Pharmacol. Res.* – 2019.
181. Hirano A., Goto M., Mitsui T., Hashimoto-Hachiya A., Tsuji G., Furue M. Antioxidant *Artemisia princeps* extract enhances the expression of filaggrin and loricrin via the AHR/OVOL1 pathway. *Int. J. Mol Sci.*, 2017, 18(9). Epub 2017 Sep 11;
182. Hirano A., Goto M., Mitsui T., Hashimoto-Hachiya A., Tsuji G., Furue M. Antioxidant *Artemisia princeps* extract enhances the expression of filaggrin and loricrin via the AHR/OVOL1 pathway. *Int. J. Mol Sci.*, 2017, 18(9). Epub 2017 Sep 11
183. 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.
184. Hsu C.L., Neilsen C.V., Bryce P.J. IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation // *PloS one*. 2010; 5:e11944.
185. Hu Z., Guan W., Wang W. et al. Protective effect of a novel cystine C60derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells // *Chemico-biological interactions.* – 2007. – Vol. 167. – №. 2. – P. 135-144.
186. I. Soufli, R. Toumi, H. Rafa, C. Touil-Boukoffa, Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of

- inflammatory bowel diseases, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Therapeut* 7 (2016) 353–360. S. Saha, B. Buttari, E. Panieri, E. Profumo, L. Saso, An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation, *Molecules* 25 (2020) 5474. C. Yao, S. Narumiya, Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation, *Br. J. Pharmacol.* 176 (2019) 337–354
187. I. Soufli, R. Toumi, H. Rafa, C. Touil-Boukoffa, Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Therapeut* 7 (2016) 353–360. , U. Forstermann, “ W.C. Sessa, Nitric oxide synthases: regulation and function, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 829–837
 188. Inui S. Androgen actions on the human hair follicle: perspectives // Inui S., Itami S. / *Exp. Dermatol.* 2013. Vol. 22. – N3. – P. 168-171.
 189. Jia G. et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multiwall nanotube, and fullerene // *Environmental science & technology.* – 2005. – T. 39. – №. 5. – C. 1378-1383.
 190. Johnson K.E. et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair / Johnson K.E., Wilgus T.A. // *Adv Wound Care* (New Rochelle). – 2014. – Vol. 3. – N10. – P. 647–661.
 191. Johnston L. K., Chien K. B. and Bryce P. J. The Immunology of Food Allergy // *J Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – № 6. – P. 2529–2534.
 192. Joner E.J., Hartnik T., Amundsen C.E. Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. Norwegian Pollution Control Authority. 2008. Report no. TA 2304/2007.
 193. Junaid M., Almuqri E.A., Liu J., Zhang H. Analyses of the binding between water soluble C60 derivatives and potential drug targets through a molecular docking approach. *PLoS ONE*, 2016, 11(2): e0147761.

194. Jung H. Deacetylase activity-independent transcriptional activation by HDAC2 during TPA-induced HL-60 cell differentiation. / Jung H. [et al.] // PLoS One. - 2018. №13(8). - PP. 29-35.
195. Jung H., Wang C. U., Jang W. Nano-C60 and hydroxylated C60: Their impacts on the environment // Toxicology and Environmental Health Sciences. – 2009. – T. 1. – №. 2. – C. 132-139.
196. Juricek L AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation / L. Juricek, J. Carcaud, A. Pelhaitre, T.T. Riday, A. Chevallier, J. Lanzini, N. Auzeil, O. Lapr_evote, F. Dumont, S. Jacques, F. Letourneur, C. Massaad, C. Agulhon, R. Barouki, M. Beraneck, X. Coumoul // Sci. Rep. – 2017.
197. Kagoya Y. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. / Kagoya Y. [et al.] // J. Clin Invest. - 2014. №124(2). - PP. 28-42.
198. Kallioniemi P. Effect of Plasminogen on Wound Healing in Mice. Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology. 2010.
199. Kalucka J., Ettinger A., Franke K. et al. Loss of epithelial hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 accelerates skin wound healing in mice // Mol Cell Biol. – 2013. – Vol. 33. – № 17. – P. 3426-3438.
200. Kariyawasam H.H., Robinson D.S. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations // Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. – 2006. – Vol. 27. - № 2. – P. 117–127.
201. Khter N. et al. TLR4/MyD88-mediated CCL2 production by lipopolysaccharide (endotoxin): Implications for metabolic inflammation // J. Diabetes Metab Disord. – 2018. – №17. – P. 77-84.
202. Kim K.S., Liu W., Cunha G.R. et al. Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra // Cell Tissue Res. – 2002. – Vol. 307. – № 2. – P.145-153.

203. Kimber I., Dearman R.J. Factors affecting the development of food allergy // *Proc Nutr Soc.* – 2002. – Vol. 61. – № 4. – P. 435-439
204. Klimova R., Andreev S., Momotyuk E. et al. Aqueous fullerene C60 solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* – 2020. – Vol.28. – № 6. – PP. 487- 499.
205. Klimova, R. R.; Momotyuk, E. D.; Demidova, N. A. et al. Dimeric Bisbenzimidazoles Suppress Infections Caused by the Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus in Cell Cultures // *Vopr. Virusol.* – 2017. – Vol. 62. – P. 162-168.
206. Kohle C, Bock K.W. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2 // *Biochem. Pharm.* – 2007. – PP. 1853–1862.
207. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives // *Bio-Applications of Nanoparticles* // Springer New York. – 2007. – P. 168-180.
208. Koperski J. A., Orenberg E. K., Wilkinson D. I. Topical minoxidil therapy for androgenetic alopecia. A 30-month study // *Arch Dermatol.* – 1987. – Vol.123. – № 11. – P.1483-1487.
209. Krook A. IL-6 and metabolism-new evidence and new questions // *Diabetologia.* – 2008. – Vol. 51. – № 7. – P. 1097–1099.
210. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C. et al. C60: Buckminsterfullerene // *Nature.* – 1985. – Vol. 318. – P. 162-163
211. Kubota R., Tahara M., Shimizu K. et al. Time-dependent variation in the biodistribution of C₆₀ in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Toxicol Lett.* – 2011. – Vol. 206. – № 2. – P. 172-177.
212. Kueck T., Cassella E., Holler J. The aryl hydrocarbon receptor and interferon gamma generate antiviral states via transcriptional repression // *Elife.* – 2018. – Vol. 22. – № 7. – P. e38867.

213. Kumar V., Abbas A. K., Aster J. C. Robbins basic pathology– 9th ed. – 2012. – 924 p.
214. Kwack M. H., Kim M. K., Kim J. C. and Sung Y. K. Dickkopf 1 promotes regression of hair follicles // J. Invest. Dermatol. – 2012. – Vol. 132. – № 6. – P. 1554-1560.
215. Kwack M. H., Sung Y. K., Chung E. J. et al. Dihydrotestosterone-inducible dickkopf 1 from balding dermal papilla cells causes apoptosis in follicular keratinocytes // J. Invest. Dermatol. – 2008. – Vol. 128. – № 2. – P. 262-269.
216. Kyzyma, E. A., Tomchuk, A. A., Bulavin, L. A. et al. Structure and toxicity of aqueous fullerene C60 solutions //Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2015. – Vol. 9. – №. 1. – P. 1-5.
217. Labille, J., Masion, A., Ziarelli, F. et al. Hydration and Dispersion of C60 in Aqueous Systems: The Nature of Water-Fullerene Interactions // Langmuir. – 2009. – Vol. 25. – №. 19. – P. 11232–11235.
218. Lao, F., Li, W., Han, D. et al. Fullerene Derivatives Protect Endothelial Cells against NOInduced Damage // Nanotechnology. – 2009. – Vol. 20. – № 22. – P. 225103
219. Larigot L., Juricek L., Dairou J. and Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions // Biochim Open. – 2018. – Vol. 11. – № 7. – P. 1-9.
220. Leatherman B. D. Anaphylaxis in the allergy practice // International Forum of Allergy & Rhinology. – 2014. – Vol. 4. – P. 60–65.
221. Lee C. W., Su Y. H., Chiang Y. C. et al. Glycofullerenes Inhibit Particulate Matter Induced Inflammation and Loss of Barrier Proteins in HaCaT Human Keratinocytes // Biomolecules. – 2020. – Vol.10. – № 4. – P. 514.

222. Lei M., Guo H., Qiu W. et al. Modulating hair follicle size with Wnt10b/DKK1 during hair regeneration // *Exp. Dermatol.* – 2014. – Vol. 23. – № 6. – P. 407-413.
223. Leiros G.J., Attoresi A.I., Balana M.E. Hair follicle stem cell differentiation is inhibited through cross-talk between Wnt/beta-catenin and androgen signalling in dermal papilla cells from patients with androgenetic alopecia // *Br. J. Dermatol.* – 2012. – Vol. 166. – № 5. – P. 1035-1042.
224. Li M.-M., Wang Y.-B., Zhang Y. and Wang W. The nature of the noncovalent interactions between benzene and C60 fullerene // *J. Phys., Chem.* – 2016. – Vol. 120. – № 28. – P. 5766–5772
225. Li W., Li N., Sui B. and Yang D. Anti-aging effect of fullerenol on skin aging through derived stem cells in a mouse model // *Exp Ther Med.* – 2017. – Vol. 14. – № 5. – P. 5045-5050.
226. Li Y. H., Zhang K., Ye J. X. et al. Wnt10b promotes growth of hair follicles via a canonical Wnt signalling pathway // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2011. – Vol. 36. – № 5. – P. 534-540.
227. Li Y., Deng S.-L., Lian Z.-X. and Yu K. Roles of Toll-Like Receptors in Nitroxidative Stress in Mammals // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – № 6. – P.576.
228. Li Z., Liang Y., Tang H. et al. Effect of Anaphylactic Shock on Suppressors of Cytokine Signaling // *Immunological Investigations.* – 2010 – Vol. 39. – № 7. – P.740-753.
229. Lim Y.Y., Kim S.Y., Kim H.M., Li K.S., Kim M.N., Park K.C., Kim B.J. Potential relationship between the canonical Wnt signalling pathway and expression of the vitamin D receptor in alopecia // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2014. – Vol. 39. – N3. – P. 368-375.

230. Lin A. M., Fang S. F., Lin S. Z., Chou C. K., Luh T. Y., Ho L. T. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain // Neuroscience research. – 2002. – Vol. 43. – №. 4. – P. 317-321.
231. Lin W.H., Xiang L.J., Shi H.X., Zhang J., Jiang L.P., Cai P.T., Lin Z.L., Lin B.B., Huang Y., Zhang H.L., Fu X.B., Guo D.J., Li X.K., Wang X.J., Xiao J. Fibroblast Growth Factors Stimulate Hair Growth through β -Catenin and Shh Expression in C57BL/6 Mice // BioMed Res. Int. – 2015. – Vol. 2015. –P. 9
232. Lin Y. L., Lei H. Y., Luh T. Y., Chou C. K., Liu H. S. Light-independent inactivation of dengue-2 virus by carboxyfullerene C₆₀ isomer // Virology. – 2000. –Vol. 275. – № 2. – P. 258-262.
233. Liu X. miR-18b inhibits TGF- β 1-induced differentiation of hair follicle stem cells into smooth muscle cells by targeting SMAD2 / Liu X., Song L., Liu J., Wang S., Tan X., Bai X., Bai T., Wang Y., Li M., Song Y., Li Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2013. – Vol. 438. – N3. – P.551-556.
234. Liu Y., Jiao F., Qiu Y., Li W., Qu Y., Tian C., Li Y., Bai R., Lao F., Zhao Y., Chai Z., Chen C. Immunostimulatory properties and enhanced TNF- α mediated cellular immunity for tumor therapy by C60(OH)₂₀ nanoparticles. // Nanotechnology. – 2009. – Vol.20. – №41. - PP. 41-51.
235. Liu Z., Ren Z., Zhang J., Chuang C. C., Kandaswamy E., Zhou T., Zuo L. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases // Front. Physiol. – 2018. –Vol.9. – P. 477
236. Loh S.A., Chang E.I., Galvez M.G. et al. SDF-1 α expression during wound healing in the aged is HIF dependent // Plast Reconstr Surg. – 2009. – Vol. 123. – P. 655–755.
237. Lu D. A functional polymorphism in interleukin-1 α (IL1A) gene is associated with risk of alopecia areata in Chinese populations / Lu D., Chen L., Shi X., Zhang X., Ling X., Chen X., Xie L., Jiang L., Ding L., He Y., Zhang X. // Gene. – 2013. – Vol. 521. – N2. – P.282-286.

238. Lu, X., Feng, L., Akasaka, T., Nagase, S. Current Status and Future Developments of Endohedral Metallofullerenes // Chem Soc Rev. – 2012. – Vol. 41. – P. 7723-7760
239. Mace K.A. et al. Sustained expression of Hif-1a in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair / Mace K.A., Yu D.H., Paydar K.Z., Boudreau N., Young D.M. // Wound Rep Reg. – 2007. – Vol. 15. – P. 636–645.
240. Mak K.K., Chan S.Y. Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – N28. – P. 26120-26126.
241. Mao B. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signaling / Mao B., Wu W., Davidson G., Marhold J., Li M., Mechler B. M., Delius H., Hoppe D., Stannek P., Walter C., Glinka A., Niehrs C. // Nature. – 2002. – Vol. 417. – N6889. – P. 664–667.
242. Marco-Martín G. Differences in the Anaphylactic Response between C3H/HeOuJ and BALB/c Mice. / Marco-Martín G., La Rotta Hernández A., Vázquez de la Torre M., Higaki Y., Zubeldia J. M., Baeza M. L. // International Archives of Allergy and Immunology. – 2017. – Vol.173. – №4. – P.204-212.
243. Marseglia L. Melatonin and Atopy: Role in Atopic Dermatitis and Asthma / Marseglia, L., D'Angelo, G., Manti, S., Salpietro, C., Arrigo, T., Barberi, I., Reiter R., Gitto, E. // International Journal of Molecular Sciences. – 2014. – Vol.15. – №8. – PP. 482–493.
244. Martinez-Mir A. Genomewide scan for linkage reveals evidence of several susceptibility loci for alopecia areata / Martinez-Mir A., Zlotogorski A., Gordon D., Petukhova L., Mo J., Gilliam T.C., Londono D., Haynes C., Ott J., Hordinsky M., Nanova K., Norris D., Price V., Duvic M., Christiano A.M. // Am. J. Hum. Genet. – 2007. – Vol. 80. – N2. – P. 316-328.

245. Mashino T., Shimotohno K., Ikegami N., et al. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2005. – Vol.15. –P. 1107–1109.
246. Masters S. L. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease / Masters S.L., Simon A., Aksentijevich I., Kastner D.L. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – N27. – P.621-668.
247. Matsumura F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 77. – № 4. – P.608-626.
248. Mattana A. *Acanthamoeba castellanii* Genotype T4 Stimulates the Production of Interleukin-10 as Well as Proinflammatory Cytokines in THP-1 Cells, Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Human Monocyte-Derived Macrophages. / Mattana A., Sanna M., Cano A., Delogu G., Erre G., Roberts C. W., Henriquez F. L., Fiori P. L., Cappuccinelli P. // *Infect Immun.* - 2016. – Vol. 84. – №10. - PP. 53-62.
249. Mchedlov-Petrosyan N. O. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry // *Chem. Rev.* – 2013. – Vol.113. – №7. – P.5149–5193.
250. Mchedlov-Petrosyan N.O Fullerene C60 solutions: colloid aspect // *Chem Phys Technol Surf.* – 2010. – Vol. 1.– №1. – PP. 19–37
251. McLean I.W.H., Irvine A.D. Old King Coal — molecular mechanisms underlying an ancient treatment for atopic eczema // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123. – №2. – P.551-553
252. Medzhitov R., Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol.9. – P.692–703.

253. Mercandetti M., Cohen A.J. (2005). Wound Healing: Healing and Repair // Emedicine.com. Accessed December 27, 2006.
254. Messenger A.G., Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth // Br. J. Dermatol. – 2004. – Vol. 150. – N2. – P. 186-194.
255. Miao W., Hu L., Scrivens P.J., Batist G.J. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes // Biol. Chem. – 2005. – №280. – PP. 340–348.
256. Mikkola M. L. TNF superfamily in skin appendage development // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2008. – Vol. 19. – N3-4. – P.219–230.
257. Mitamura Y. The IL-13/periostin/IL-24 pathway causes epidermal barrier dysfunction in allergic skin inflammation / Mitamura Y., Nunomura S., Nanri Y., Ogawa M., Yoshihara T., Masuoka M., Tsuji G., Nakahara T., Hashimoto-Hachiya, A., Conway, S.J. [et al.] // Allergy. – 2018. – №73. – PP. 1881–1891.
258. Mizutani Y., Kanbe A., Ito H., Seishima M. Activation of STING signaling accelerates skin wound healing // J Dermatol Sci. – 2020. – Vol.97. – N1. – P.21-29.
259. Modha J. D., Pathania Y. S. Comprehensive review of oral minoxidil in alopecia // J Cosmet Dermatol. – 2022. – Vol. 21. – № 11. – P.5527-5531.
260. 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. – Vol. 277. – №. 3. – P. 711-717.
261. Mori T., Takada H., Ito S., Matsubayashi K., Miwa N., Sawaguchi T. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration

- and evaluation for no mutagenesis // Toxicology. – 2006. – Vol. 225. – P. 48-54.
262. Muku G. Ligand-mediated cytoplasmic retention of the ah receptor inhibits macrophage-mediated acute inflammatory responses / Muku G., Lahoti T., Murray I. [et al.] // Lab invest. – 2017. – №97. – PP.1471–1487.
 263. Nafiu A.B., Rahman M.T. Selenium added unripe carica papaya pulp extracts enhance wound repair through TGF- β 1 and VEGF-a signalling pathway // BMC Complement Altern Med. – 2015. – Vol. 15. – P. 369.
 264. Nakamizo S. et al. Topical treatment with basic fibroblast growth factor promotes wound healing and barrier recovery induced by skin abrasion / Nakamizo S., Egawa G., Doi H., Natsuaki Y., Miyachi Y., Kabashima K. // Skin Pharmacol Physiol. – 2013. – Vol. 26. – N1. – P. 22-29.
 265. Noakes R. The aryl hydrocarbon receptor: A review of its role in the physiology and pathology of the integument and its relationship to the tryptophan metabolism // Intern. J. Tryptophan Res. – 2015. – Vol. 8. – P.7-18
 266. Nosik, N. N.; Kondrashina, N. G.; Grigor'eva, Alu.; Lialina, I. K.; Rasnetsov, L. D. Fullevir: *In vitro* and *in vivo* Antiherpetic Activity // Vopr. Virusol. – 2009. – Vol. 54. – P. 15–18
 267. Oberdörster E., Stone S., Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective // Nanotoxicology. – 2007. – Vol. 1. – №1. – P.2-25.
 268. Oberdörster E., Zhu S., Blickley T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L. // Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms // Carbon. –2006. – Vol. 44. – P.1112-1120

269. Ogawa R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18. – N3. – P.606
270. Ohta A., Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage // *Nature.* – 2001.– Vol.414. – P.916–920
271. Osterfeld H., Ahrens R, Strait R., Finkelman F.D., Renauld J.C., Hogan S.P. Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis // *The Journal of allergy and clinical immunology.* – 2010. – Vol. 125. – P. 469–476
272. Ouji Y. Promotion of hair follicle development and trichogenesis by Wnt-10b in cultured embryonic skin and inreconstituted skin / Ouji Y., Yoshikawa M., Shiroi A., Ishizaka S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 345. – N2. – P. 581-587.
273. Ozawa M., Osawa E. Carbon blacks as the source materials for carbon nanotechnology // *Carbon Nanotechnology.* – 2006. – Vol. 6. – P. 127-151.
274. Pablos-Tanarro A. et al. Antibody Production, Anaphylactic Signs, and T-Cell Responses Induced by Oral Sensitization With Ovalbumin in BALB/c and C3H/HeOuJ Mice. / Pablos-Tanarro A., Lopez-Expósito I., Lozano-Ojalvo D., Lopez-Fandiño R., Molina E. // *Allergy, Asthma & Immunology Research.* – 2016. - Vol.8. – №3. – P.239.
275. Pan T. Shikonin blocks human lung adenocarcinoma cell migration and invasion in the inflammatory microenvironment via the IL-6/STAT3 signaling pathway. / Pan T., Zhang F., Li F., Gao X., Li Z., Li X., Ren X. // *Oncol Rep.* – 2020. – Vol.44. –№3. – PP.1049-1063.
276. Panagiotakopoulou V. Interferon- γ signaling synergizes with LRRK2 in neurons and microglia derived from human induced pluripotent stem cells. / Ivanyuk D., De Cicco S., Haq W., Arsić A., Yu C., Messelodi

- D., Oldrati M., Schöndorf D .C., Perez M. J., Cassatella R. P., Jakobi M., Schneiderhan-Marra N., Gasser T., Nikić-Spiegel I., Deleidi M. // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11. – №1. – PP. 51-63.
277. Park C., Cha H. J., Lee H., Kim G. Y., Choi Y. H. The regulation of the TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways is involved in the inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative reactions by morroniside in RAW 264.7 macrophages // *Arch Biochem Biophys.* – 2021. – Vol.706. – P. 108926
278. Park J. VEGF-A-Expressing Adipose Tissue Shows Rapid Beiging and Enhanced Survival After Transplantation and Confers IL-4-Independent Metabolic Improvements. / Park J., Kim M., Sun K., An Y. A., Gu X., Scherer P. E. // *Diabetes.* – 2017. – Vol.66. – №6. – PP. 1479-1490.
279. Park, E.-J. et al. Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice./ Park, E.-J., Kim, H., Kim, Y., Yi, J., Choi, K., Park, K. // *Toxicology and Applied Pharmacology* – 2010. – Vol.244. №2. – P.226-233.
280. Pei Y. Antioxidative nanofullerol inhibits macrophage activation and development of osteoarthritis in rats. / Pei Y., Cui F., Du X., Shang G., Xiao W., Yang X., Cui Q. // *Int J. Nanomedicine.* – 2019. – №14. – PP. 4145-4155.
281. Perrier C. et al. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. / Perrier C., Thierry A.-C., Mercenier A., Corthésy B. // *Clinical & Experimental Allergy.* – 2010. – Vol.40. – №1. – P.153-62.
282. Perrier S. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases / Perrier S., Darakhshan F., Hajduch E. // *Dr Jekyll or Mr Hyde FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580. - N27. – P.6289-6294.

283. Phadnis-Moghe A.S. Immunological characterization of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) knockout rat in the presence and absence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin (TCDD) / A.S. Phadnis-Moghe, W. Chen, J. Li, R.B. Crawford, A. Bach, S. D'Ingillo, N. Kovalova, J.E. Suarez-Martinez, B.L.F. Kaplan, J.A. Harrill, R. Budinsky, J.C. Rowlands, R.S. Thomas, N.E. Kaminski // Toxicology. – 2016. – Vol.368-369. – P.172-182.
284. Pinson K.I. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice / Pinson K.I., Brennan J., Monkley S., Avery B.J., Skarnes W.C. // Nature. – 2000. – Vol. 407. – N6803. – P. 535-538.
285. Price V.H. Changes in hair weight in men with androgenetic alopecia after treatment with finasteride (1 mg daily): three- and 4-year results / Price V.H., Menefee E., Sanchez M. [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 2006. – Vol. 55. – N1. – P.71-74.
286. Price V.H. Lack of efficacy of finasteride in postmenopausal women with androgenetic alopecia / Price V.H., Roberts J.L., Hordinsky M. [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 2000. – Vol. 43. – N3. – P.768-776.
287. Proksch E. et al. Topical use of dexpanthenol: a 70th anniversary article / Proksch E., de Bony R., Trapp S., Boudon S. // J Dermatolog Treat. – 2017. – Vol. 28. – №8. – P. 766-773
288. Prylutska S. V. et al. Using water-soluble C60 fullerenes in anticancer therapy. / Prylutska S. V., Burlaka A. P., Klymenko P. P., Grynyuk I. I., Prylutsky Y. I., Schütze, C. // Cancer Nanotechnology. – 2011. – Vol. 2 – P.105-110.
289. 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. – Vol. 27. – №. 5. –P C. 1121-1124.
290. Prylutsky Y. I., Petrenko V. I., Ivankov V. I. , Kyzyma O. A. , Bulavin L. A., Litsis O. O. , Evstigneev M. P. , Cherepanov V. V. ,

- Naumovets A. G. , Ritter U. On the Origin of C60 Fullerene Solubility in Aqueous Solution // *Langmuir*. – 2014. – Vol. 30. – P.3967–3970
291. Puga A., Ma C., Marlowe J. L. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – Vol.77. – №4. – P.713-722
292. Pycke B.F., Benn T.M., Herckes P. et al. Strategies for quantifying C(60) fullerenes in environmental and biological samples and implications for studies in environmental health and ecotoxicology // *Trends Analyt. Chem.* . – 2011. – Vol. 30. – №1. – P.44-57
293. Qiang Ma Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity // *Annual Reviews*. – 2013. – №53. – PP. 401–426.
294. Qingnuan L., Yan X., Xiaodong Z., Ruili L., Qieqie D., Xiaoguang S., Shaoliang C., Wenxin L. Preparation of (99m)Tc-C(60)(OH)(x) and its biodistribution studies. // *Nucl Med Biol.* – 2002. – Vol.29. – №6. – P.707-710
295. Quan J.H. Intracellular Networks of the PI3K/AKT and MAPK Pathways for Regulating Toxoplasma gondii-Induced IL-23 and IL-12 Production in Human THP-1 Cells. / Quan J.H. [et al.] // *PLoS One*. - 2015. – Vol.10. – №11. – P.e0141550
296. Quintana F.J., Basso A.S., Iglesias A.H., et al. Control of Treg and Th17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor // *Nature*. – 2008. – Vol. 453. – №7191. – P. 65–71
297. Ranzato E. et al. Hmgb1 promotes wound healing of 3T3 mouse fibroblasts via RAGE-dependent ERK1/2 activation / Ranzato E., Patrone M., Pedrazzi M., Burlando B. // *Cell Biochem Biophys*. – 2010. – Vol. 57. – N1. – P. 9-17.
298. Rash B.G. Shh and Gli3 regulate formation of the telencephalic-diencephalic junction and suppress an isthmus-like signaling source in the

- forebrain / Rash B.G., Grove E.A. // *Developmental Biology*. – 2011. – Vol. 359. – N2. – P. 242–250.
299. Rashid R.M. Androgenic pattern presentation of scarring and inflammatory alopecia / Rashid R.M., Thomas V. J. // *Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2010. – Vol. 24. – N8. – P. 979–980.
300. Rezvani H.R. et al. Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1 α accelerates epidermal aging and affects re-epithelialization in human and mouse / Rezvani H.R., Ali N., Serrano-Sanchez M., Dubus P., Varon C., Ged C., Pain C., Cario-Andre M., Seneschal J., Taïeb A., de Verneuil H., Mazurier F. // *J Cell Sci.* – 2011. – Vol. 124. – № 24. – P. 4172-4183.
301. Rider P. et al. IL-1a and IL-1b recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation / Rider P., Carmi Y., Guttman O., Braiman A., Cohen I., Voronov E., White M.R., Dinarello C.A., Apte R.N. // *J Immunol.* – 2011. – Vol. 187. – N9. – P. 4835-4843.
302. Rider P. Interleukin-1 α . / Rider P., Carmi Y., Voronov E., Apte R. N. // *Semin Immunol.* – 2013. – Vol.25. – №6. – PP. 430-8.
303. Rogers N. E. R. Medical treatments for male and female pattern hair loss / Rogers N. E., Avram M. R. // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2008. – Vol.59. – N4. – P. 547-566.
304. Rothenberg M.E. The eosinophils / M.E. Rothenberg, S.P. Hogan // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 51–58.
305. 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.
306. Ruckert R. High-dose proinflammatory cytokines induce apoptosis of hair bulb keratinocytes *in vivo*/ Ruckert R., Lindner G., Bulfone-Paus S., Paus R. // *Br J Dermatol.* – 2000. – Vol. 143. – N5. – P.1036-1039.
307. Ryan J.J. et al. Fullerene Nanomaterials Inhibit the Allergic Response / Ryan J.J., Bateman H.R., Stover A., Gomez G., Norton S.K.,

- Zhao W., Schwartz L.B., Lenk R., Kepley C.L. // J Immunol. – 2007. – Vol.179. – №1. – P.665-672.
308. Sabirov, D.Sh. Polarizability as a Landmark Property for Fullerene Chemistry and Materials Science // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4. – P.44996–45028.
309. Safari M. et al. Effects of epidermal growth factor, platelet derived growth factor and growth hormone on cultured rat keratinocytes cells in vitro / Safari M., Ghahari L., Zoroufchi M.D. // Pak J Biol Sci. □ 2014. – Vol. 17. – N7. – P. 931-936.
310. Saldanha J. C. S, Gargiulo D. L., Silva S. S. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2004. – Vol. 37. – №6. – P. 809–816.
311. Saleh N.A. The QSAR and docking calculations of fullerene derivatives as HIV-1 protease inhibitors // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2014. – Vol. 136 – P. 1523-1529
312. Salehi B. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits / Salehi B, Mishra P, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Martins N, Sharifi-Rad J. // Biomedicines. – 2018. – №6(3). – P. 91.
313. Satoh M., Takayanagi I. Pharmacological studies on fullerene (C60), a novel carbon allotrope, and its derivatives // J. Pharmacol. Sci. – 2006. – Vol.100. – № 5. – P. 513-8.
314. Savouret J.F., Antenos M., Quesne M., Xu J., Milgrom E., Casper R.F. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – №5. – P.3054–3059
315. 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. – Vol. 7. – №. 8. – P. 2399-2406.
316. Schmidt-Ullrich R. Schmidt-Ullrich R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis / Schmidt-Ullrich R., Paus R. // Bioessays. – 2005. – Vol. 27. – N3. – P. 247 – 61.
 317. Schneider M.R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan / Schneider M.R., Schmidt-Ullrich R., Paus R. // Current Biology. – 2009. – Vol. 19. – N3. – P. 132–142.
 318. Scholpp S. Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon / Scholpp S., Wolf O., Brand M., Lumsden A. // Development. – 2006. – Vol. 133. – N5. – P. 855–864.
 319. Schülke S., Scheurer S. Immunological background and pathomechanisms of food allergies // Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. – 2016. – Vol. 59. – № 6. – P. 23-31.
 320. Sedger L.M. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. / Sedger L.M. and McDermott M.F. // Cytokine Growth Factor Rev. – 2014. – Vol. 25. – №4. - PP. 45-72.
 321. Semb A.G., Ikdahl E., Wibetoe G., Crowson C., Rollefstad S. Atherosclerotic cardiovascular disease prevention in rheumatoid arthritis // Nat. Rev. Rheumatol. – 2020. – Vol.16. – P.361–379
 322. Shah R. Frequency and associated factors of hair loss among patients with inflammatory bowel disease / Shah R., Abraham B., Hou J., Sellin J. // World J. Gastroenterol. – 2015. – Vol. 21. – N1. – P. 229-232.
 323. Shen C. et al. Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing / Shen C., Sun L., Zhu N., Qi F. // Int J Mol Med. – 2017. – Vol. 39. – N4. – P. 949–959.

324. Shepelev M Xenobiotic Response Elements (XREs) from Human CYP1A1 Gene Enhance the hTERT Promoter Activity / Shepelev M., Kalinichenko S., Saakian E., Korobko I. // Dokl Biochem Biophys. – 2019. – Vol.485. – №1. – PP. 150-152.
325. Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., Nikonova A., Khaitov M. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis // J. Nanobiotechnology. – 2016. – Vol.14. – P.8
326. Shershakova N. N. et al. Fullerene C60 reduces the allergic inflammation in food allergy mouse model / Kuks E.N., Baraboshkina E.N., Turetskiy E.A., Kamyshnikov O.J., Andreev S.M., Khaitov M.R. //Allergy. –2018. – Vol.73. – P.787-787.
327. Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., Nikonova A., Khaitov M. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis // Journal of Nanobiotechnology. — 2016. — V. 14. — № 1. — P. 1483-1493
328. Shershakova N., Bashkatova E., Purgina D., Makarova E., Andreev S., Khaitov M. Wound healing and anti-inflammatory effects of aqueous fullerene C-60 dispersion. / Shershakova N., Bashkatova E., Purgina D., Makarova E., Andreev S., Khaitov M. // Allergy. – 2016. – №71. – PP. 315-315.
329. Shershakova N.N., Andreev S.M., Tomchuk A.A. et al. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by "green technology" // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2023. – Vol.47. – P.102619.
330. Shershakova, N.; Kuks, E.; Turetskiy, E.; Kamishnikov, O.; Andreev, S.; Khaitov, M. Fullerene C60 Reduces the Allergic Inflammation in Food Allergy Mouse Model //Allergy. – 2018. – Vol. 73. – P.787.

331. Shi J., Wang L., Gao J., Liu Y., Zhang J., Ma R., Liu R., Zhang Z.
A Fullerene-based Multi-functional Nanoplatfrom for Cancer Theranostic Applications // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35. – P.5771-5784.
332. Shin H.S., See H.J, Jung S.Y., Choi D.W., Kwon D.A., Bae M.J., Sung K.S., Shon D.H. Turmeric (*Curcuma longa*) attenuates food allergy symptoms by regulating type 1/type 2 helper T cells (Th1/Th2) balance in a mouse model of food allergy // *J Ethnopharmacol*. – 2015. – Vol.175.– P.21-9.
333. Shin S. NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: Influence on adipogenesis / Shin S., Wakabayashi N., Misra V., Biswal S., Lee G.H., Agoston E.S., Yamamoto M., Kensler T.W. // *Mol. Cell. Biol*. – 2007. – №27. – PP. 7188–7197.
334. Shoji M. Anti-influenza activity of c60 fullerene derivatives. Shoji M. et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – №6. – P.e66337
335. Sicherer S., Leung D. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2012 // *J Allergy Clin Immunol*. – 2013. – Vol.131. – P. 55–66.
336. Simonini A. et al. Anaphylactic Shock During Pediatric Anesthesia: An Unexpected Reaction to Sevoflurane. / Simonini A., Brogi E., Gily B., Tosca M., Barbieri C., Antonini F., Del Zotto, G. // *Frontiers in Pediatrics*. – 2018. - Vol. 6. - P.236.
337. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing / Singer A.J., Clark R.A. // *N Engl J Med*. – 1999. – Vol. 341. – N10. – P.738-746.
338. 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. – T. 311. – № 1152. – C. 633-645.
339. Stasheuski A. S., Galievsky V. A., Stupak A. P. et al. Photophysical Properties and Singlet Oxygen Generation Efficiencies of Water-Soluble

- Fullerene 131 Nanoparticles // Photochemistry and photobiology. – 2014. – T. 90. – №5. – C. 997-1003.
340. Stejskalova L., Dvorak Z., Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: Current state of art. *Current Drug Metabolism*, 2011, 12, 198-212
 341. Stingi G. IgE-mediated, FcεRI-dependent allergen presentation: A pathogenic factor in atopic dermatitis? / G. Stingi // *J. Am. Acad. Dermatol.* - 2001. - Vol. 45. - P.17–20.
 342. Straino S. et al. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing / Straino S., Di Carlo A., Mangoni A., De Mori R., Guerra L., Maurelli R., Panacchia L., Di Giacomo F., Palumbo R., Di Campli C., Uccioli L., Biglioli P., Bianchi M.E., Capogrossi M.C., Germani A. // *J Invest Dermatol.* – 2008. – Vol. 128. – №6. – P. 1545-1553.
 343. Sumner SC, Snyder RW, Wingard C, Mortensen NP, Holland NA, Shannahan JH, Dhungana S, Pathmasiri W, Han L, Lewin AH, Fennell TR. Distribution and biomarkers of carbon-14-labeled fullerene C60 ([¹⁴C(U)]C60) in female rats and mice for up to 30 days after intravenous exposure // *J Appl Toxicol.* – 2015. – Vol. 35. – №12. – P1452-64.
 344. Sun X. Attenuated TGFB signalling in macrophages decreases susceptibility to DMBA-induced mammary cancer in mice. / Sun X. [et al.] // *Breast Cancer Res.* - 2021. №23(1). - P. 39.
 345. Takamichi Ito, Gaku Tsuji, Fumitaka Ohno, Hiroshi Uchi, Takeshi Nakahara, Akiko Hashimoto-Hachiya, Yuichi Yoshida,x Osamu Yamamoto,x Yoshinao Oda,y and Masutaka Furue Activation of the OVOL1-OVOL2 Axis in the Hair Bulb and in Pilomatricoma // *The American Journal of Pathology.* – 2016. – Vol. 186.– N.4. – P. 1036-1043
 346. Takei K., Mitoma C., Hashimoto-Hachiya A., Uchi H., Takahara M., Tsuji G., Kido-Nakahara M., Nakahara T., Furue M. Antioxidant

- soybean tar Glyteer rescues T-helper-mediated downregulation of filaggrin expression via aryl hydrocarbon receptor // *J. Dermatol.* – 2015. – Vol.42. – № 2. – P.171-180
347. Tamai K. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction / Tamai K., Semenov M., Kato Y., Spokony R., Liu C., Katsuyama Y., Hess F., Saint-Jeannet J.P., He X. // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – N6803. – P. 530–535.
348. Tanabe K., Kitagawa E., Wada M., Haraguchi A., Orihara K., Tahara Y., Nakao A., Shibata S. Antigen exposure in the late light period induces severe symptoms of food allergy in an OVA-allergic mouse model // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P.14424.
349. Tang J, Diao P, Shu X, Li L, Xiong L. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In vitro Assessment and a Theoretical Model // *Biomed Res Int.* – 2019. – Vol. 2019. – P.7039802.
350. Tanimura N. Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner / N. Tanimura, N. Kusunose, N. Matsunaga, S. Koyanagi, S. Ohdo // *Toxicology.* – 2011. – Vol.290. – PP. 203-207.
351. Tazi-Ahnini R. Association analysis of IL1A and IL1B variants in alopecia areata / Tazi-Ahnini R., McDonagh A.J., Cox A., Messenger A.G., Britton J.E., Ward S.J, Bavik C.O., Duff G.W., Cork M.J. // *Heredity (Edinb.).* 2001. – Vol. 87. – N2. – P.215-219.
352. Tikhanovich I. Arginine methylation regulates c-Myc-dependent transcription by altering promoter recruitment of the acetyltransferase p300. / Tikhanovich I., Zhao J., Bridges B., Kumer S., Roberts B., Weinman S. A. // *J. Biol Chem.* – 2017. – Vol. 292. – №32. - PP. 13333-13344.
353. Trpkovic A., Todorovic-Markovic B., Kleut D. et al. Oxidative stress-mediated hemolytic activity of solvent exchange-prepared fullerene

- (C60) nanoparticles // Nanotechnology. – 2010. – Vol. 21. – № 37. – P. 375102.
354. 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. – Vol. 86. – №. 12. – P. 1809-1827.132
 355. Tsao N. In vitro action of carboxyfullerene / Tsao N., Luh T. Y., Chou C. K., Chang T. Y., Wu J. J., Liu C. C., Lei H. Y. // J. Antimicrobial Chemother. – 2002. – Vol. 49. - P. 641-649.
 356. 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. – Vol. 45. – № 6. – PP. 1788–1793
 357. Tsuji G. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway / Tsuji G., Takaharan M., Uchi H., Takeuchi S., Mitoma C., Moroi Y., Furue M. // J. Dermatol. Sci. – 2011. – №62. – PP. 42–49.
 358. Tsuji G., Takahara M., Uchi H., Matsuda T., Chiba T., Takeuchi S., Yasukawa F., Moroi Y., Furue M. Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect // J Invest Dermatol. – 2012. – Vol.132. – №1. – P.59-68.
 359. Tsuji G., Hashimoto-Hachiya A., Kiyomatsu-Oda M., Takemuram M., Ohno F., Ito T., Morino-Koga S., Mitoma Ch., Nakahara T., Uchi H., Furue M. Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis // Cell death and disease. – 2017. – Vol. 8. – P.e2931
 360. Van de Veen W., Stanic B., Wirz O.F., Jansen K., Globinska A., Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond // J Allergy Clin Immunol. – 2016. – Vol.138. – №3. – P.654-65.

361. Van den Bogaard E. H., Bergboer J. G., Vonk-Bergers M. et al. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis // J Clin Invest. – 2013. – Vol.123. – P.917-27
362. Van Neste D., Fuh V., Sanchez-Pedreno P. et al. Finasteride increases anagen hair in men with androgenetic alopecia // Br. J. Dermatol. – 2000. – Vol. 143. – N3. – P.804-810.
363. Van Voorhis M., Fechner J. H., Zhang X., Mezrich J. D. The Aryl hydrocarbon receptor: a novel target for immunomodulation in organ transplantation // Transplantation. – 2013. – Vol. 95. – №8. – P.983-990;
364. Vignali D.A. How regulatory T cells work / D.A. Vignali, L.W. Collison, C. J. Workman // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – Vol. 8. – N.7. – P. 523-525.
365. Vilenko B. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60 // Carbon. – 2004. – Vol. 42. – P. 1195-1198.
366. Vizhak M., Smith A.L., Korobov M.V. et al. Solubility of C60 Fullerene // J. Phys. Chem. – 2001. – Vol.105. – №13. – P. 2499-506
367. Vural E. Skin graft take rates, granulation, and epithelialization: dependence on myeloid cell hypoxia-inducible factor 1alpha / Vural E., Berbee M., Acott A., Blagg R., Fan C.Y., Hauer-Jensen M. // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2010. – Vol. 136. – N7. – P. 720-723.
368. Wakabayashi N. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation / Wakabayashi N., Itoh K., Wakabayashi J., Motohashi H., Noda S., Takahashi S., Imakado S., Kotsuji T., Otsuka F., Roop D.R. et al. // Nat. Genet. – 2003. – №35. – PP. 238–245.
369. Wang I.C. C60 and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radicalinitiated lipid peroxidation. / Wang I.C., Tai L.A., Lee D.D., Kanakamma P.P., Shen C.K., Luh T.Y., Cheng C.H., Hwang K.C. // J Med Chem. – 1999. – Vol.4. – P.4614-4620.

370. Wang Y.H. Developing food allergy: a potential immunologic pathway linking skin barrier to gut // *F1000Res.* – 2016. – Vol.5. –P. F1000
371. Wasserman D. Alopecia areata / Wasserman D., Guzman-Sanchez D.A., Scott K., McMichael A. // *Int. J. Dermatol.* – 2007. – Vol. 46. – N2. – P. 121-131.
372. Weeraratna A.T. A Wnt-er wonderland--the complexity of Wnt signaling in melanoma // *Cancer Metastasis Rev.* – 2005. – Vol. 24. – N2. – P. 237–250.
373. Weiss V. C., West D. P., Mueller C. E. Topical minoxidil in alopecia areata // *J Am Acad Dermatol.* – 1981. – Vol.5. –№2. – P.224-6
374. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines // *Physiological Reviews Published.* – 2003. – Vol. 83. – N3. – P. 835-870.
375. Witt P., Beuerle F., Hartnagel U. et al. Water Solubility, Antioxidant Activity and Cytochrome C Binding of Four Families of Exohedral Adducts of C60 and C70 // *Org. Biomol. Chem.* – 2007. – Vol. 5. – P. 3599–3613
376. Wood S., Jayaraman V., Huelsmann E. J., Bonish B., Burgad D., Sivaramakrishnan G., Qin S., DiPietro L. A., Zloza A., Zhang C. , Shafikhani S. H. Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response // *PLoS One.* – 2014. – Vol.9. – №3. – P.e91574
377. Wu J. et al. Heparin-Based Coacervate of FGF2 Improves Dermal Regeneration by Asserting a Synergistic Role with Cell Proliferation and Endogenous Facilitated VEGF for Cutaneous Wound Healing / Wu J., Ye J., Zhu J., Xiao Z., He C., Shi H., Wang Y., Lin C., Zhang H., Zhao Y., Fu X., Chen H., Li X., Li L., Zheng J., Xiao J. // *Biomacromolecules.* – 2016. – Vol. 17. – N6. – P. 2168-2177.

378. 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. – Vol. 16. – № 6. – P. 1590-1595.
379. 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. – Vol. 59. – № 7. – P. 351-358.
380. Xing D. et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor in the Burn Wound / Xing D., Liu L., Marti G.P., Zhang X., Reinblatt M., Milner S.M., Harmon J.W. // *Wound Repair Regen*. – 2011. – Vol. 19. – N2. – P. 205–213.
381. Xu J. Y., Han K., Li S. X., Cheng J. S., Xu G. T., Li W. X., Li Q. N. Pulmonary responses to polyhydroxylated fullerenols, C(60)(OH)(x) // *J Appl Toxicol*. – 2009. – Vol.29. – №7. – P.578-84.
382. Xu Y., Zhu J., Xiang K., Li Y., Sun R., Ma J., Sun H., Liu Y. Synthesis and immunomodulatory activity of [60]fullerene-tuftsin conjugates // *Biomaterials*. – 2011. – Vol.32. – №36. – P.9940-9.
383. Yang X. L. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid C60 fullerene derivatives and its mechanism / X. L. Yang, C. H. Fan, H. S. Zhu // *Toxicology in vitro*. – 2002. – Vol. 16. – P. 41-46
384. Yano K. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis / Yano K., Brown L.F., Detmar M. // *J. Clin. Invest*. – 2001. – Vol. 107. – N4. – P.409-417.
385. Ye X. Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. / Ye X., Zhou X. J., Zhang H. // *Front Immunol*. - 2018. – №9. - PP.23-34.

386. Yeager R.L. Introducing the TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery / Yeager R. L., Reisman S. A., Aleksunes L. M., Klaassen, C. D. // *Toxicol. Sci.* – 2009. – №111. – PP. 238–246.
387. Yudoh K., Karasawa R., Masuko K., Kato T. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis // *Int J Nanomedicine.* – 2009. – Vol.4. – P.217-25
388. Zappacosta AR. Reversal of baldness in patient receiving minoxidil for hypertension. *N Engl J Med.* 1980 Dec 18;303(25):1480-1. doi: 10.1056/nejm198012183032516. PMID: 7432414; Weiss VC, West DP, Mueller CE. Topical minoxidil in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol.* 1981 Aug;5(2):224-6. doi: 10.1016/s0190-9622(81)80077-1. PMID: 7263970; Modha JD, Pathania YS. Comprehensive review of oral minoxidil in alopecia. *J Cosmet Dermatol.* 2022 Nov;21(11):5527-5531. doi: 10.1111/jocd.15324. Epub 2022 Sep 20. PMID: 36065675
389. Zechel S. Expression and functions of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation / Zechel S., Werner S., Unsicker K., von Bohlen und Halbach O. // *Neuroscientist.* 2010. Vol. 16. – N4. – P.357-373.
390. Zhai H. Observation of an all-boron fullerene / Zhai H.-J. [et al.] // *Nat. Chem.* – 2014. – Vol. 6. PP. 727–731
391. Zhang L. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+) CD25(+) T cells: multiple pathways on the road / Zhang L, Zhao Y. // *J. Cell Physiol.* 2007. Vol. 211. – N3. – P.590-597.
392. Zhang Q. et al. Role of high mobility group box 1 (HMGB1) in wound healing / Zhang Q., O'Hearn S., Kavalukas S.L., Barbul A. // *J Surg Res.* – 2012. – Vol. 176. – N1. – P. 343-347.
393. Zhang Y. et al. Drug-induced regeneration in adult mice / Zhang Y., Strehin I., Bedelbaeva K., Gourevitch D., Clark L., Leferovich J., Messersmith P.B., Heber-Katz E. // *Science Translational Medicine.* – 2015. – Vol. 7. – P. 290-292.

394. Zhao B., Y.-Y. He, P. J. Bilski and C. F. Chignell Pristine (C60) and hydroxylated [C60(OH)24] fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: type I vs type II mechanisms //Chemical research in toxicology. – 2008. – T. 21. – №. 5. – C. 1056-1063.
395. Zhou Z. et al. A novel class of compounds with cutaneous wound healing properties / Zhou Z., Joslin S., Dellinger A., Ehrich M., Brooks B., Ren Q., Rodeck U., Lenk R., Kepley C.L. // J Biomed Nanotechnol. – 2010. – Vol. 6. – N5. – P. 605-611.
396. Zhou Z. Fullerene nanomaterials potentiate hair growth / Zhou Z., Lenk R., Dellinger A., MacFarland D., Kumar K., Wilson S.R., Kepley C.L. // Nanomedicine. 2009. – Vol. 5. – N2. – P. 202-207.