

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Научный консультант:

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

Официальные оппоненты:

Калюжин Олег Витальевич – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Кадагидзе Заира Григорьевна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Сапожников Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита состоится «__»_____2024 г., в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/dissertatsii-postupivshie-na-rassmotrenie/>

Автореферат разослан «__»_____2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

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 (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, 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 ($\sim 1,3 \cdot 10^{-11}$ г/л), что обусловлено его высокой гидрофобностью и 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 водного раствора фуллерена C60 (ВРФ) 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 исследования

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`

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.

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.

Научная новизна исследования

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

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, а неизученность данных вопросов являлось 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 (AUR), 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.

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.

Внедрение результатов исследования в практику

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.

Федеральным медико-биологическим агентством одобрено выполнение прикладной научно-исследовательской работы по теме: «Доклинические исследования противоаллергического лекарственного средства на основе водного раствора фуллерена C₆₀» (шифр: «ДКИ Фуллерен-24»), начало которой запланировано на 2024 год.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 45 печатных работ, в том числе 24 работы в рецензируемых периодических научных изданиях, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций («Иммунология», «Вопросы вирусологии», «Медицина экстремальных ситуаций», «Российский аллергологический журнал», «Российский иммунологический журнал», «Nanomedicine», «Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures», «Journal of Nanobiotechnology», «PLoS ONE»); 16 публикаций в материалах научных конгрессов и конференций; 5 патентов.

Апробация диссертации

Основные результаты диссертации доложены и обсуждены: на Ежегодных конгрессах Европейской академии алергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ) (2012 г., Женева, Швейцария; 2013 г., Милан, Италия; 2014 г., Копенгаген, Дания; 2015 г., Барселона, Испания; 2016 г., Вена, Австрия; 2017 г., Хельсинки, Финляндия; 2018 г., Мюнхен, Германия; 2019 г., Лиссабон, Португалия; 2021 г., Краков, Польша; 2022 г., Прага, Чехия); на 14-ой Международной конференции «Современные углеродные наноструктуры» (ACNS-2019) (1-5 июля 2019, Санкт-Петербург, Россия); на XXXI Симпозиуме «Современная химическая физика». (16-25 сентября 2019 г., Туапсе, Россия); на Второй Московской конференции по молекулярной алергологии (ММАМ - 2019) (19 ноября 2019 г., Москва, Россия); на Первом конгрессе по молекулярной алергологии (МАС – 2020) (1- 2 декабря 2020 г., Москва, Россия); на Ежегодных Международных конгрессах по молекулярной иммунологии и алергологии (ИМАС) (2- 3 декабря 2021 г., Москва, Россия; 1-2 декабря 2022 г., Москва, Россия).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 432 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, раздела материалов и методов, собственных результатов и обсуждения полученных данных, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 396 источников, в том числе 62 отечественных и 334 зарубежных. Работа содержит 42 таблицы, иллюстрирована 172 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России (директор – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор Хаитов М.Р.) с 2010 г. по 2023 г. на базе отдела молекулярной иммунологии (научный руководитель – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор Хаитов М.Р.). Все протоколы исследования одобрены этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА России.

Для моделирования патологических состояний *in vivo* 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».

Водный раствор фуллерена C_{60} , получали по уникальной запатентованной технологии: 1000 мг чистого порошка фуллерена C_{60} (продукт NeoТес, Россия 99,95 %) растворяли (~3 ч) в 1600 мл N-метил-1-пирролидон (NMP, Sigma-Aldrich, 99,5 %). К полученному 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 (Millipor/Мерк). Замещающей средой являлся 0,01% раствор Pluronic F-127. Полученный раствор фуллерена C_{60} (1 мг/мл) подвергали стерилизации и хранили при +10°C в защищенном от света месте [Andreev et al., 2015].

При моделировании атопического дерматита (АД) аллергеном для сенсibilизации мышей с интактной барьерной функцией кожи являлся овальбумин (OVA) (Sigma). На выбритую спину животным делали аппликации со стерильной марлей размером 1×1 см, пропитанной 0,1% раствором OVA, закрепляя ее специальным материалом (Bioclusive, Johnson and Johnson Medical Limited), который предохраняет от высыхания, контрольной группе наносили фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (100 мкл). Через 7 дней повязки снимали. Аппликации повторяли еще 2 раза с 2х недельным интервалом. Между аппликациями с овальбумином осуществляли накожное (н/к) и подкожное (п/к) введение ВРФ 1 раз в неделю в дозах 20 и 2 мкг, соответственно. После третьего этапа сенсibilизации проводили забор крови, селезенки и образцов кожи для анализа.

Аллергеном для сенсibilизации мышей при моделировании пищевой

аллергии также являлся овальбумин (Sigma). Мыши случайным образом были разделены на 6 групп. Первая группа являлась моделью пищевой аллергии, группы со второй по четвертую получали ВРФ, пятая и шестая являлись контрольными. Подкожно в область спины животным делали введение аллергена: пяти группам мышей вводили 0,2 мл физиологического раствора с адьювантом (1 мг $\text{Al}(\text{OH})_3$) и 10 мкг OVA, через две недели введение повторяли. Между первичной сенсибилизацией и разрешающими введениями аллергена мышам второй, третьей и четвертой групп осуществляли интрагастральное (и/г) введение ВРФ. Доза при введении составляла 2 мкг фуллерена C₆₀ на мышь. Вторая группа получала ВРФ и/г один раз в неделю, третья группа - два раза в неделю и четвертая - ежедневно. Через 7 дней, после повторной сенсибилизации, мышам 1-4-ой групп аллерген вводили и/г в дозе 15мг OVA в 150 мкл ФСБ в течение 7 дней. Пятой группе в качестве контроля вводили 150 мкл ФСБ. После окончания разрешающих введений аллергена у животных проводили забор крови, селезенки и образцов тощей кишки тонкого отдела кишечника для анализа. Симптомы пищевой аллергии оценивались по степени проявления аллергической диареи и изменению веса тела животных. Аллергическая диарея была очевидна через 20-30 минут после и/г введения аллергена. Диарею оценивали визуально по баллам в зависимости 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 и через 30-40 минут после введения OVA.

Для моделирования анафилактического шока мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили 20 мкг овальбумина с 2 мг гидроксида алюминия ($\text{Al}(\text{OH})_3$) в 500 мкл ФСБ двукратно с интервалом 7 дней, после чего на 28 день эксперимента проводили разрешающее внутривенное (в/в) введение аллергена в дозе 500 мкг («Модель»). Для оценки противоаллергической активности фуллерена C₆₀ ВРФ вводили на 4 и 11 дни опыта (группы «2C₆₀ 4/28» и «20C₆₀ 4/28») или на 11 и 25 дни (группы «2C₆₀ 11/28», «20C₆₀ 11/28») в/в в дозе 2 мкг и 20 мкг, соответственно. Симптомы анафилактической реакции у мышей оценивали с помощью шкалы оценок Rupa и Mine. 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, а в 3 балла - одышка, проблемы с дыханием, цианоз. Мыши, принимавшие боковое положение и страдающие тремором и конвульсиями оценивали в 4 балла. Летальный исход оценивался в 5 баллов.

Для достижения поставленных задач по оценке способности фуллерена влиять на регенерацию кожного покрова, был проведен ряд *in vivo* экспериментов на мышах линии Balb/c. Перед началом проведения экспериментов у мышей всех групп был полностью удален шерстяной покров в области спины путем выбривания. Раневое поражение моделировали путем иссечения кожи спины. 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 ФСБ (группа «самозаживление»). В качестве препарата сравнения использовали крем «Бепантен плюс» (группа «Бепантен плюс»). Отрицательным контролем являлась группа мышей без поражений кожного покрова (группа «интактные»). На 12 день производили забор образцов кожи для ПЦР. Моделирование ожогового поражения проводили путем аппликации 12,5 н. NaOH в течение 60 секунд. Терапию кожных поражений ВРФ (группа «фуллерен C60») проводили в течение 10 дней. Контрольным препаратом являлся Декспантенол (группа «Д-пантенол»). На 11 день производили забор материала для анализа. Измерение раневой поверхности проводили продольно и поперечно (в мм) в начале и в конце эксперимента. Площадь поражения рассчитывали 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].

Для достижения поставленных задач по оценке способности ВРФ на функционирование волосяных фолликул (ВФ), было проведено несколько

экспериментов на мышах *in vivo*. Для проведения первичных экспериментов были использованы мыши инбредной линии Balb/c. Перед началом эксперимента у мышей всех групп был полностью удален шерстяной покров в области спины путем выбривания. Затем животным вводили ВРФ п/к в дозе 2 мкг или н/к (в виде мази) в дозе 20 мкг. Контрольные животные получали ФСБ в том же объеме. 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. Далее, в качестве модельных животных были использованы мыши линии Nu/nu. Фенотип мышей данной линии характеризуется отсутствием шерсти. Опытная группа мышей получала ВРФ п/к (в дозе 3 мкг). Контрольные животные получали ФСБ 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. При анализе эффекта стимуляции роста при длительном введении ВРФ мыши получали раствор п/к (в дозе 3 мкг), а контрольной группе животных вводили ФСБ в том же объеме. Подкожные введения осуществляли через день на протяжении 33 дней и на 51-й день. Завершен эксперимент был на 79-й день. На протяжении всего эксперимента (на 22-й, 37-й, 40-й и 79-й дни) проводилось фотографирование животных.

Противовирусную активность ВРФ изучали в отношении ВПГ1, референс-штамм F, полученного из государственной коллекции вирусов при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Исследование проводилось на базе Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи. Вирус размножали в 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). Были изучены ВРФ и 3 катионных производных С60, конъюгированного с аргинином (С60-Arg), лизином (С60-Lys) и пиперазином (С60-Pip). В качестве положительного контроля в опытах *in vitro* использовали вирус-специфический лицензированный препарат ацикловир (АЦВ, Зовиракс®, «ГлаксоСмитКляйн Вэллком», Великобритания), в опытах *in vivo* – 5%-ную мазь для наружного применения Ацикловир-Акрихин (АЦВ-А, ОАО

«Акрихин», Московская область, Россия). Оценка способности ВРФ влиять на заражаемость клеток вирусом проводилась *in vitro* путем предварительной обработки клеток исследуемыми соединениями. Анализ противовирусной активности соединений оценивали путем внесения их после заражения клеток вирусом. При анализе вируцидности исследуемые соединения в различных концентрациях инкубировали совместно с ВПГ1 в течение 1 ч при 37°C.

Терапевтическое действие ВРФ и производного фуллерена C60-Pip изучали на модели кожной герпетической инфекции мышей. 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].

Изучение способности ВРФ влиять на уровень экспрессии арил-углеводородного рецептора АУР и ассоциированных с ним генов проводили *in vitro* на клеточных линиях меланомы кожи человека (mel IS и mel Cher) и аденокарциномы легкого человека (A549). Препаратами сравнения являлись FICZ (Merck, США), ресвератрол (Alfasigma, Италия), мелатонин (НАО «Северная звезда», Россия). Через 24 часа после инкубации осуществляли сбор материала для анализа.

Для разработки гипотезы о взаимодействии ВРФ с макрофагами проводили ряд экспериментов *in vitro* с использованием моноклеарных клеток периферической крови (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Для получения макрофагов M0 PBMC инкубировали с добавлением M-CSF (10 мкг) (SCI-STORE, Россия). Инкубацию клеток вели в течение 5 суток при 37°C и 5% CO₂. Далее, в лунки вносили ВРФ (10 мкг/мл) (группа «С60») или ВРФ (10 мкг/мл) с лецитином яичным (100 мкг/мл) (Serva, Германия) (группа «С60+лецитин»). Через 24 часа среду удаляли и добавляли ЛПС (Lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae* Inaba 569B, LPS, Sigma) (10 нг/мл) и IFN-γ (ABclonal) (50 нг/мл) или ИЛ-4 (10 нг/мл) и ИЛ-13 (20 нг/мл) (ABclonal). Через 48 часов клетки собирали для последующего анализа. Анализ фенотипа макрофагов проводили визуально под микроскопом, а также методом проточной цитометрии по стандартному протоколу. Для анализа использовали антитела к CD206, CCR7 и к CD14.

При проведении экспериментов по анализу способности ВРФ влиять на хемотаксис макрофагов использовали перитонеальные макрофаги мыши, полученные путем промывания брюшной полости ФСБ. Клетки высевали в 6-луночный планшет (100-150тыс. кл/лун.), куда предварительно был внесен ВРФ. Через 5 дней проводили учет результатов.

Анализ безопасности ВРФ проводили *in vivo*. Для исследования 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 в/в (в дозах 2, 8, 40, 200 мкг), в/б (в дозах 40, 80, 160, 200, 320, 500, 1000, 2700 мкг) и и/г (в дозе 3 мг). Контрольным животным вводили ФСБ (в/в и в/б) или воду (и/г) в том же объеме. Наблюдение за животными, которое включало в себя клинический осмотр и измерение массы тела проводили ежедневно в течение 7 суток после введения ВРФ. Хроническая токсичность ВРФ была изучена при в/б введении (в дозе 400 мкг). Введение ВРФ осуществляли ежедневно в течение 31 дня. Наблюдение за поведением животных и оценку их веса также проводили ежедневно. После окончания экспериментов производился забор материала для гистологического анализа.

Исследование биораспределения фуллерена ВРФ было проведено на мышцах линии Balb/c (массой 20 ± 2 г), которым однократно наносили ВРФ н/к в форме мази (80 мкг C_{60} /1г мази или 20мкг/мышь), вводили в виде раствора и/г (150 мкг/мышь) или в/в (10 мкг/мышь) (табл. 1).

Табл. 1. Схема эксперимента по изучению фармакокинетики фуллерена C_{60} на мышцах при различных способах введения

Способ введения	Доза, мкг/мышь	Время выдержки, ч	Количество мышей в группе
н/к	20	0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8	3
и/г	150	0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8	3
в/в	10	0; 0,03; 0,08; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 24; 32; 48	3
н/к, и/г, в/в	0	0	3

Исследуемым материалом являлись печень, почки, легкие, мозг, селезенка, кожа и сыворотка крови. Образцы тканей гомогенизировали для

последующей экстракции фуллерена C₆₀. Контролями для калибровки являлись: исходный ВРФ (10 мкг/мл) и ФСБ. Для оценки выведения фуллерена C₆₀ из организма была проанализирована динамика изменения его количества в моче и кале через 8, 24, 36, 48 и 72 часа после в/в введения ВРФ в дозе 10 мкг. Концентрацию фуллерена в биологических образцах определяли с помощью метода LC-MS на хроматографе Agilent 1200 с масс-селективным детектором [Смирнов и др., 2016].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Водный раствор фуллерена C₆₀ получали простым смешиванием раствора C₆₀ в N-метилпирролидоне (МП) с деионизованной водой и 0,01% раствором Pluronic F-127 в качестве стабилизирующего агента. Далее проводили исчерпывающий диализ против дистиллированной воды со стабилизатором. В процессе диализа все низкомолекулярные вещества удалялись через поры, а кластеры фуллерена оставались в растворе [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].

Изучение способности водного раствора фуллерена C₆₀ проявлять противоаллергическую активность проводилось *in vivo* на моделях atopического дерматита, пищевой аллергии и анафилактического шока. Так, при накожном и подкожном способах введения ВРФ у мышей с экспериментальным atopическим дерматитом было показано, что при накожных аппликациях ВРФ наблюдалось снижение уровня специфических IgE, а также уменьшение соотношения IgG1/IgG2a (рис.1).

Независимо от способа введения ВРФ уровень ИЛ-4 и ИЛ-5 также снижался. При накожных аппликациях ВРФ наблюдалось повышение выработки ИЛ-12 и *Ifng*, что свидетельствовало о существенном сдвиге иммунного ответа в сторону Th1. При накожном нанесении ВРФ было показано увеличение экспрессии гена важнейшего белка кожного барьера филагтрина. Патоморфологический анализ образцов сенсibilизированных участков кожи

показал, что в присутствии ВРФ гистологическая картина аллергического воспаления улучшается.

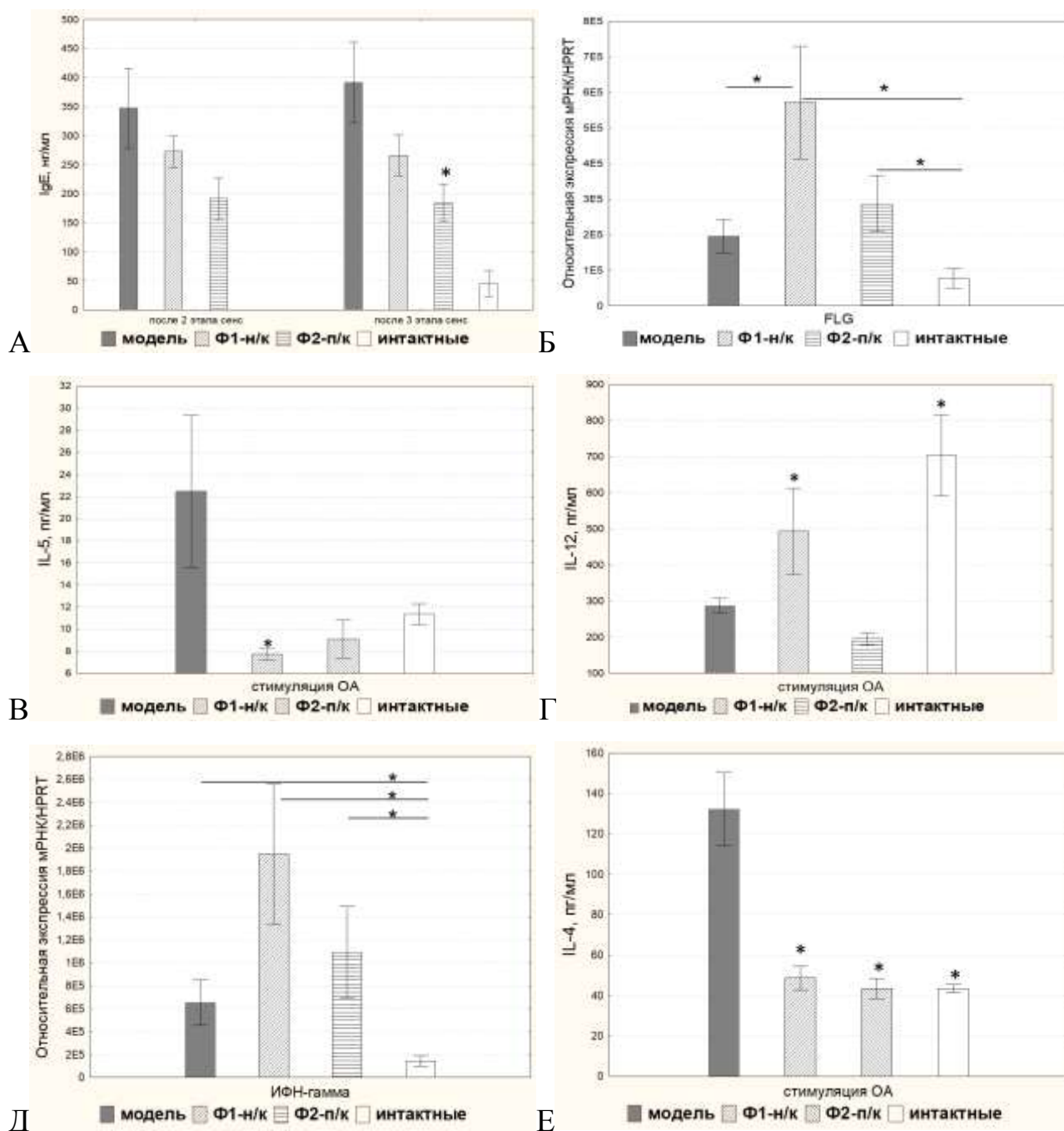


Рис. 1. Изменение уровня выработки специфического IgE (А), ИЛ-5 (В), ИЛ-12 (Г), ИЛ-4 (Е), экспрессии *Flg* (Б) и *Ifng* (Д). «модель» - группа животных с экспериментальным АД; «Ф1-н/к» - группа животных с экспериментальным АД, которые получали ВРФ наочно; «Ф2-п/к» - группа животных с экспериментальным АД, которые получали ВРФ подкожно; «интактные» - группа животных, в которой моделирования АД не происходило.*-достоверное различие от группы «модель» ($p < 0,05$).

При изучении противоаллергической активности ВРФ на модели экспериментальной пищевой аллергии (ПА) было выявлено, что в группах, где мыши получали ВРФ, интенсивность аллергической диареи была ниже по сравнению с группой «Модель ПА». Ярко выраженный терапевтический эффект наблюдался в группе «С60», где раствор фуллерена С60 животные получали ежедневно (рис 2). В этой группе также был зафиксирован прирост веса, что может говорить о нормальном функционировании кишечника.

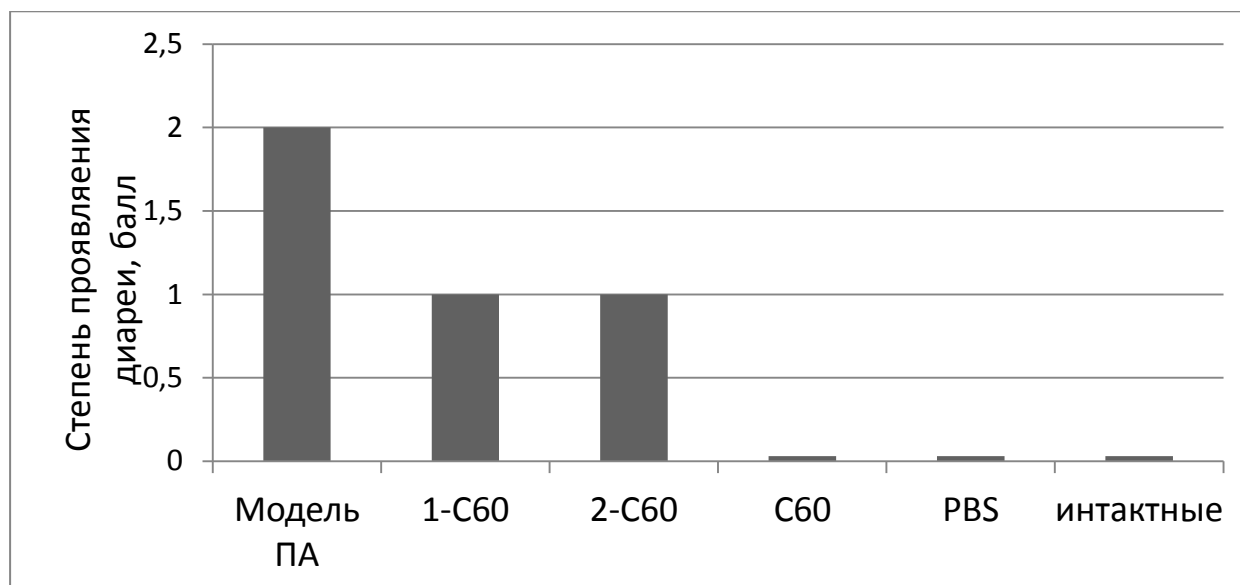


Рис. 2. Степень проявления аллергической диареи после разрешающего введения аллергена.

«Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация овальбумином (OVA), разрешение OVA); «1-С60» – сенсibilизация OVA при введении ВРФ один раз в неделю; «2-С60» – сенсibilизация OVA при введении ВРФ два раза в неделю; «С60» – сенсibilизация OVA при введении ВРФ ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, разрешение ФСБ; «интактные» – не сенсibilизированные животные. Оценка степени проявления диареи производилась через 20-30 минут после разрешающего введения аллергена и выражалась в баллах. 0 баллов - твердый стул, 1 балл - влажный несформированный стул, 2 – жидкий стул и 3 – водянистый стул.

Оценка уровня специфических IgE показала, что при ежедневном введении ВРФ уровень IgE заметно снижался, чего не наблюдалось в группе, где животные получали ВРФ один раз в неделю (рис. 3).

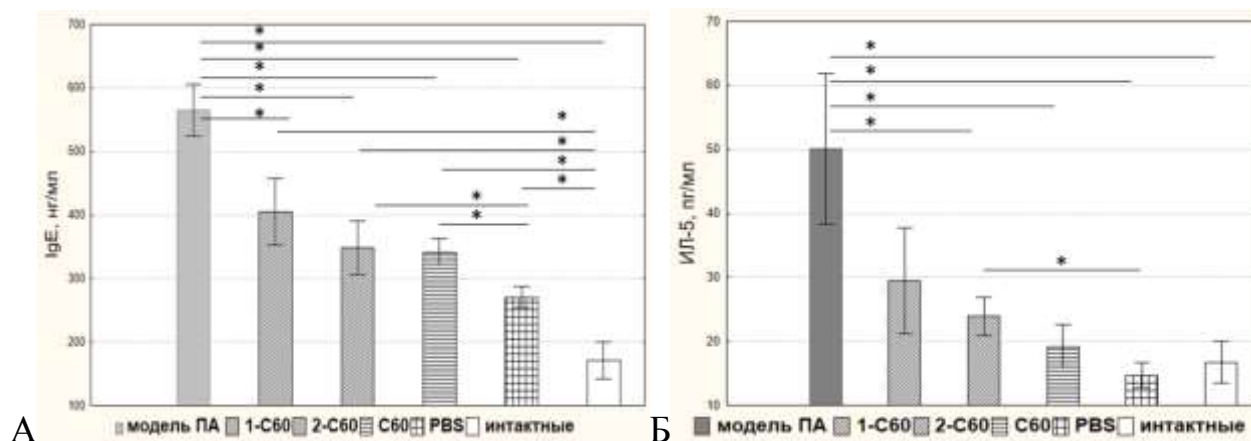


Рис. 3. Уровень специфического IgE и ИЛ-5 у мышей с экспериментальной ПА. «Модель ПА» - модель пищевой аллергии (сенсibilизация OVA, разрешение OVA); «1-C60» – сенсibilизация OVA при введении ВРФ один раз в неделю; «2-C60» – сенсibilизация OVA при введении ВРФ два раза в неделю; «C60» – сенсibilизация OVA при введении ВРФ ежедневно, «PBS» – сенсibilизация OVA, разрешение ФСБ; «интактные» – не сенсibilизированные животные. *-достоверное различие ($p < 0,05$).

Экспериментальные данные указывают на то, что при введении ВРФ наблюдалось снижение ИЛ-5, что в свою очередь обуславливало уменьшение степени проявления эозинофилии в кишечнике. Следует отметить, что противоаллергический эффект усиливался с увеличением кратности введения ВРФ. Так, в группе «Модель ПА» наблюдались умеренные признаки аллергического энтерита – еюнита с функциональным увеличением слизиобразования, а в группах, получавших ВРФ, 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. В группах, получавших ВРФ, было показано также увеличение продукции ИЛ-12 и ИФН- γ . Совокупность полученных данных может говорить о подавлении Th2-иммунного ответа и аллергического воспаления.

В ходе наблюдения за мышами при моделировании состояния АШ, после разрешающего введения, был отмечен 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

мышей, получавшие ВРФ («2С60 11/28» и «20 С60 4/28») показали наименьший процент гибели (50%). Степень корреляции процента гибели с уровнем IgE представлен в табл. 2.

Табл. 2. Анализ корреляции степени анафилактической реакции и уровня специфических IgE

Группа	Баллы	Падеж, %	Уровень IgE, нг/мл
«Модель»	5	100	774,9
«2С60 4/28»	4	87,5	742,1
«20С60 11/28»	3,5	87,5	754,7
«2С60 11/28»	3	50	611,6
«20С60 4/28»	3	50	482,6
«Интактные»	0	0	-

«Модель» - модель анафилактического шока (сенсibilизация OVA, разрешающая инъекция OVA); «2С60 4/28» – введение фуллерена С60 на 4 и 11 день дозе 2 мкг; «2С60 11/28» – введение фуллерена С60 на 11 и 25 день дозе 2 мкг; «20С60 4/28» – введение фуллерена С60 на 4 и 11 день дозе 20 мкг; «20С60 11/28» – введение фуллерена С60 на 11 и 25 день дозе 20 мкг; «Интактные» – не сенсibilизированные животные.

Показано, что 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 «2С60 4/28» и «20С60 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%. В группе «20С60 4/28» был самый низкий показатель уровня IgE, среди животных получавших аллерген, а средний балл степени анафилактической реакции составил 3 балла, что характерно для слабой степени проявления анафилактической реакции. Процент смертности в группе «20С60 4/28» составил 50%. Представленные данные свидетельствуют о наличии корреляции уровня специфического IgE с клиническими проявлениями реакции анафилактического шока и процентом смертности животных. При системной анафилаксии уровень ИЛ-4 и ИЛ-5 обычно значительно повышены [Li et al., 2010; Marco-Martín et al., 2017]. Результаты наших исследований показали, что

в группе «20 С60 4/28» уровень специфического IgE и Th2- цитокинов был снижен относительно модельной группы. По итогам проведенных исследований, на основе анализа клинических, иммунологических и гистологических параметров оценки, можно сделать вывод о том, что ВРФ, подавляя аллергическое воспаление и снижая эозинофилию в тканях, может являться перспективным соединением для терапии аллергии.

В настоящее время, поиск новых подходов к терапии кожных поражений является перспективным направлением исследований. В литературе описаны данные, свидетельствующие о наличии у фуллерена С₆₀ антиоксидантной активности, в частности, показано, что молекулы С₆₀ способны стимулировать заживление кожного покрова [Zhou et al., 2010]. В настоящей работе была изучена способность ВРФ влиять на процесс заживления кожного покрова. Путем визуальной оценки было выявлено, что в присутствии ВРФ в составе мазевой композиции процесс восстановления кожного покрова при моделировании раневого поражения *in vivo* шел интенсивнее относительно контрольной группы, где мыши получали мазь без ВРФ («самозаживление»). В итоговый день эксперимента площадь раневого поражения составляла: у мышей группы «самозаживление» – $44,4 \pm 6,5$ мм², «фуллерен С60» – $14,8 \pm 2,7$ мм², «фуллеренол С60-ОН» – $31,5 \pm 3,3$ мм², «Бепантен плюс» – $26,0 \pm 2,6$ мм² (рис. 4). Причем исходное поражение кожи у мышей было $143,5 \pm 6,1$ мм².

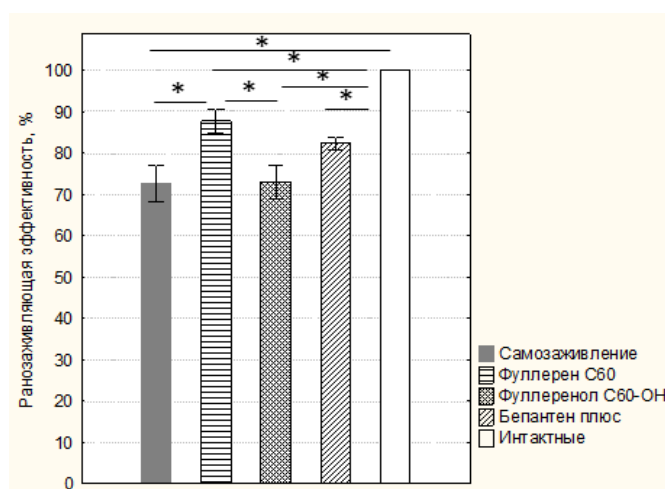


Рис. 4. Ранозаживляющая эффективность препаратов у мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Результаты гистологического анализа подтверждают данные визуальной оценки и свидетельствуют о наличии у ВРФ способности стимулировать заживление ран. Кроме того, было ярко продемонстрировано подавление уровня экспрессии генов таких провоспалительных цитокинов, как $TNF\alpha$, ИЛ-6, ИЛ-1 α и ИЛ-1 β (рис. 5).

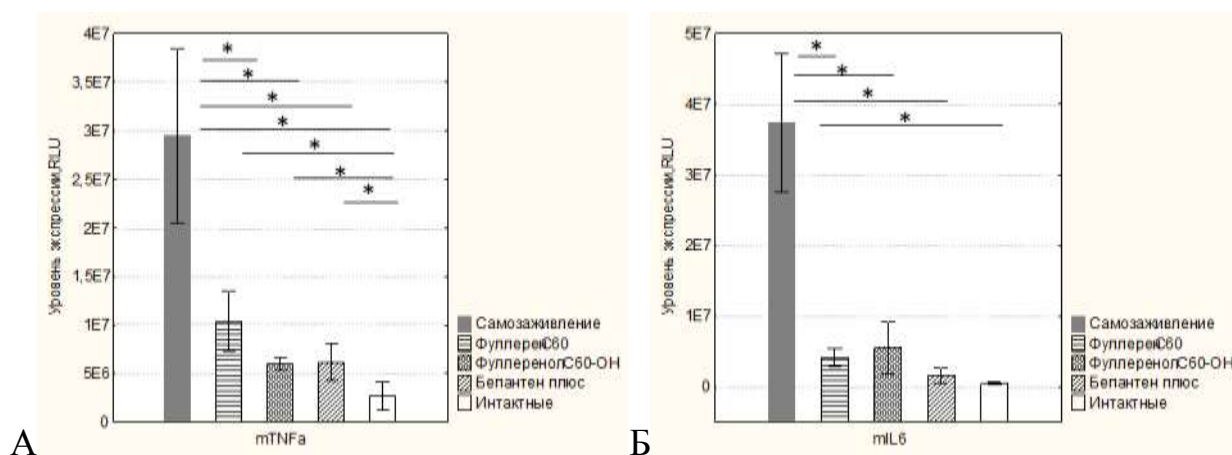


Рис. 5. Уровень мРНК *Tnfa* (А) и *Il6* (Б) в кожной ткани мышей на 12 день после моделирования раневого поражения. Примечание: * - $p < 0,05$.

Отсутствие *Tnfa* в области раневого воспаления значительно ускорило процесс заживления. Кроме того, известно, что снижение скорости заживления ран у человека связано с увеличением уровня *Tnfa* [Ashcroft et al., 2012]. Таким образом, нанесение ВРФ и его производного на раневую поверхность кожи, которое приводит к снижению уровня экспрессии $TNF\alpha$, может стимулировать регенеративные процессы. Несколькими независимыми исследователями было показано, что ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 являются факторами, ответственными за поддержание воспалительной фазы заживления. Согласно результатам, полученным в данной работе, ВРФ, ингибируя экспрессию данных генов, может способствовать подавлению процесса воспаления. Анализ заживляющего эффекта ВРФ при терапии экспериментального ожогового воспаления показал не только визуально заметное увеличение скорости заживления пораженной поверхности кожи, но и выраженное увеличение экспрессии генов, вовлеченных в процесс ангиогенеза и регенерации кожи (*Vegfa* и *Hmgb1*) (рис. 6).

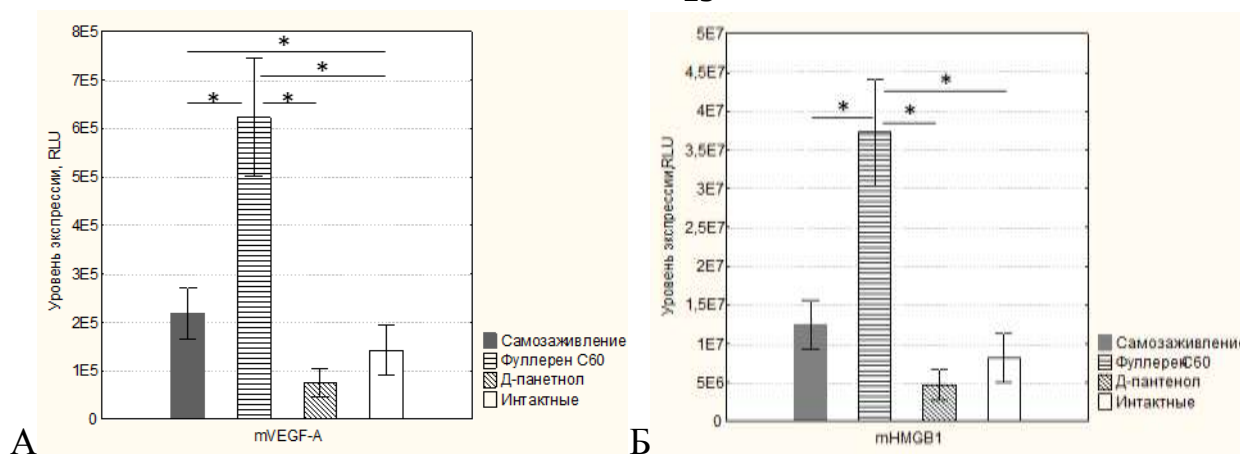


Рис. 6. Уровень мРНК *Vegfa* (А) и *Hmgb1* (Б) в кожной ткани мышей на 11 день после моделирования щелочного ожога. Примечание: * - $p < 0,05$.

Такие факторы как VEGF-A, EGF И FGF β , участвуют в процессе образования новой кровеносной сети в области раневого поражения [Bao et al., 2009]. Так, продемонстрированное повышение экспрессии данных маркеров может говорить о способности ВРФ активировать процессы ангиогенеза. 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 гена данного белка, которое наблюдалось у мышей, получавших терапию ВРФ, при моделировании ожогового поражения, может свидетельствовать о наличии активного регенеративного процесса в коже. Таким образом, по совокупности полученных результатов, можно сделать вывод о том, что ВРФ 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.

В литературе описаны данные, свидетельствующие о наличии у фуллерена С60 биологической активности относительно стимуляции роста волос [Zhou et al., 2009]. Из лекарственных препаратов для терапии алопеции на сегодняшний день только два клинически доказали свою эффективность и безопасность, однако, с каждым годом наблюдается увеличения числа пациентов с данным заболеванием. Таким образом, поиск новых средств для терапии алопеции является актуальной задачей. В данной работе на модели

алопеции *in vivo* с использованием мышей линии Nu/n^u и Balb/c было показано, что у животных, получавших ВРФ, интенсивность роста волос была заметно выше по сравнению с контрольными группами, которым вводили ФСБ (рис. 7).

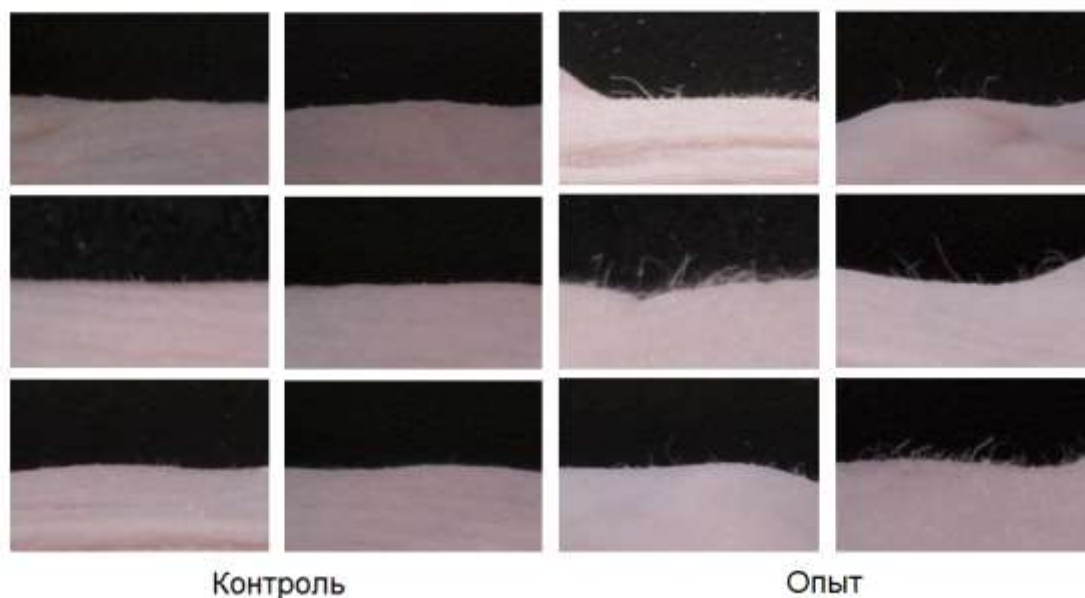


Рис. 7. Фото кожного покрова мышей линии Nu/n^u перед забором материала. «Контроль» - животные, получавшие ФСБ; «Опыт» - животные, получавшие ВРФ.

Результаты гистологического анализа подтверждают данные визуальной оценки и свидетельствуют о наличии у ВРФ способности стимулировать не только рост волос из уже имеющихся ВФ, но и появление новых ВФ (рис. 8).

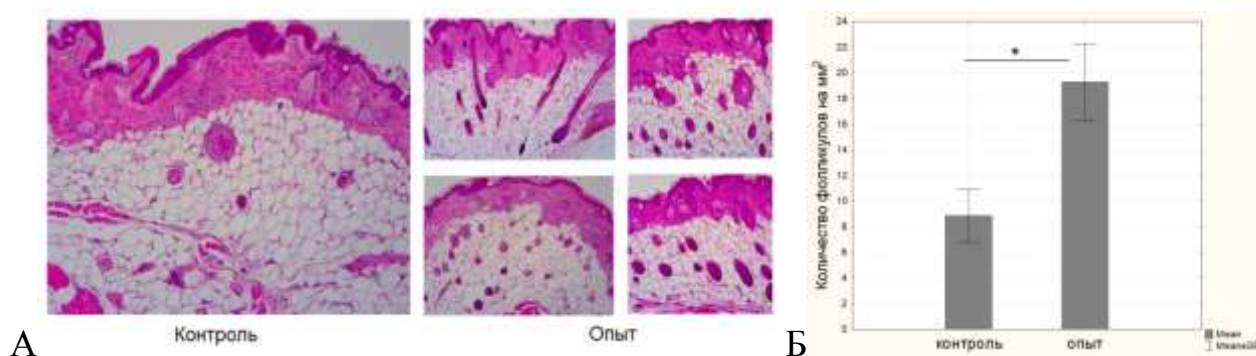


Рис. 8. Результаты гистологического исследования у мышей линии Nu/n^u. Окраска гематоксилином-эозином (x200) (А); количество волосяных фолликулов на гистологическом срезе кожного покрова в эксперименте на мышах линии Nu/n^u (Б). «Контроль» - животные, получавшие ФСБ; «Опыт» - животные, получавшие ВРФ. Примечание: * - $p < 0.05$.

Оценка экспрессии генов, вовлеченных в морфогенез ВФ, показала, что подкожный способ введения ВРФ эффективнее накожного (на мышах линии Balb/c). Такой вывод можно сделать на основании увеличения экспрессии генов *Wnt10b*, *Dkk1*, *Srd5a2*, *Vegfa*, *Egf* и *Fgfb*. Важно отметить, что увеличение экспрессии *Wnt10b* является свидетельством влияния на Wnt-сигнальный путь, который является ключевым компонентом активации стволовых клеток ВФ [Lei et al., 2014; Oujii et al., 2006] (рис. 9).

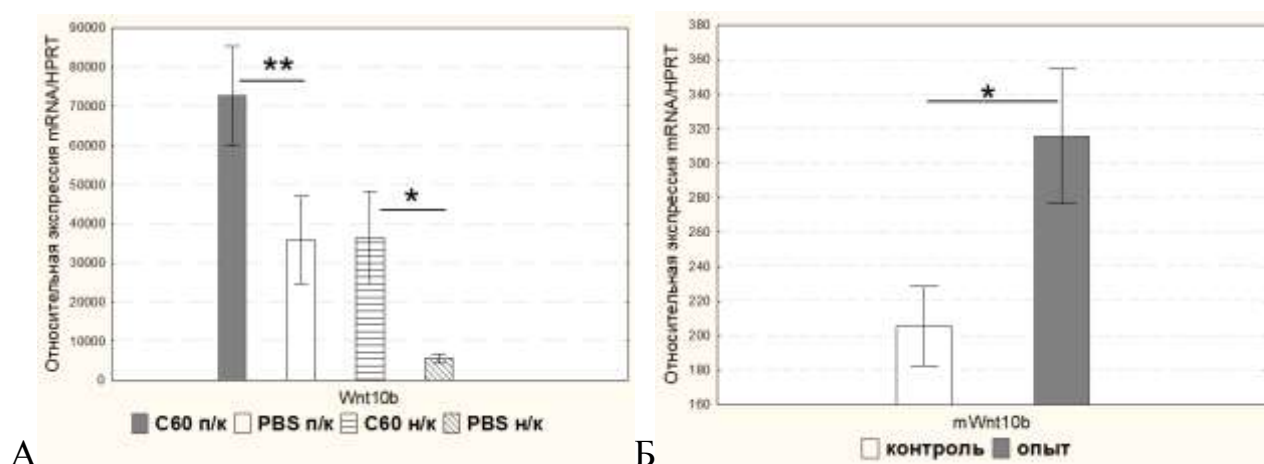


Рис. 9. Уровень мРНК *Wnt10b* в кожной ткани мышей линии Balb/c (А) и Nu/nu (Б). п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – ВРФ, PBS – фосфатно-солевой буфер, «контроль» - животные, получавшие ФСБ; «опыт» - животные, получавшие ВРФ. Примечание: * - $p < 0.05$,

Согласно данным литературы, такие факторы, как VEGF-A и EGF, 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, показанное повышение экспрессии данных маркеров у мышей обеих линий, получавших ВРФ, говорит о способности фуллерена активировать процессы ангиогенеза. При подкожном введении ВРФ наблюдалось также подавление экспрессии гена *Tnfa*. Согласно данным Ruckert с соавторами TNF α участвует в апоптозе ВФ, предположительно при очаговой алопеции [Ruckert et al., 2000]. Также стало известно, что применение анти-TNF α препаратов замедляет выпадение волос у пациентов с воспалительными заболеваниями [Shah et al., 2015]. Таким образом, введение ВРФ, приводящее к снижению уровня экспрессии *Tnfa*, оказывает положительный эффект на рост и развитие ВФ. Известно, что подавление *Tnfa* может происходить путем

активации аденозином аденозинового рецептора A2AAR [Сивак и др. 2016]. Ранее показано, что при активации этого рецептора воспаление уменьшалось, а применение синтетических аналогов аденозина повышало выживаемость при сепсисе [Ohta et al., 2001]. В ответ на стресс или ранение аденозин проявлял цитопротекторное действие, защищая ткани от повреждения и способствуя продукции фактора роста эндотелия сосудов мононуклеарными фагоцитами. Таким образом, активация рецепторов типа A2A вызывает широкий спектр ответов, которые можно классифицировать как противовоспалительные [Haskó et al., 2004]. Что касается изучения влияния ВРФ на экспрессию гена аденозинового рецептора (*Adora2a*), то в литературе описано, 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.

При анализе кожной ткани животных, получавших ВРФ, было показано увеличение экспрессии гена аденозинового рецептора (*Adora2a*), что, согласно литературным данным, может обуславливать показанное в текущей работе подавление выработки *Tnfa*, который крайне негативно влияет на рост и развитие волосяного фолликула, а также увеличение продукции фактора роста эндотелия сосудов и снижение выработки провоспалительных цитокинов (рис. 10).

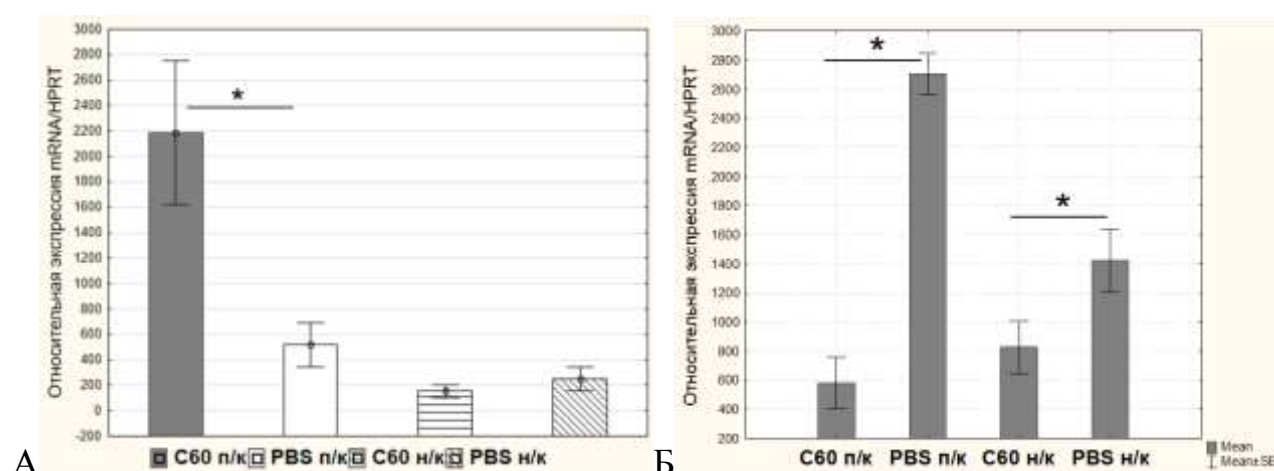


Рис. 10. Уровень мРНК *Adora2a* (А) и *Tnfa* (Б) в кожной ткани мышей линии Balb/c. Примечание: п/к – подкожный метод введения, н/к – накожный метод введения, С60 – фуллерен С60, ФСБ – фосфатно-солевой буфер. $p < 0,05$

Таким образом, по совокупности полученных результатов, можно сделать вывод о том, что ВРФ обладает способностью стимулировать рост волос. В рамках дальнейших исследований был изучен вопрос относительно сохранения стимулирующего эффекта ВРФ (рис. 11).

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]. Результаты эксперимента по изучению длительности эффекта стимуляции роста волос под действием ВРФ показали, что уже на 14-й день после введения ВРФ (с интервалом 48 часов) у мышей Nu/nu был зафиксирован рост волос. Длина волосяного стержня была небольшой и составляла около 0,5-1мм. На представленных фотографиях видно, что на 22-й день введения ВРФ у мышей визуально заметен некоторый волосяной покров. Длина стержня волоса составляла примерно 1-2 мм. Далее, на 4-й день после отмены введения ВРФ (37-й день эксперимента) у мышей был 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 (28-й день отмены введения ВРФ) волосяной покров оставался преимущественно в области введения ВРФ, причем остановки роста шерсти замечено не было. Таким образом, к концу эксперимента на 79-й день длина волосяного стержня была уже 3-4мм, а толщина видимых волос визуально была близка к таковой для нормального (не пушкового) шерстяного покрова.

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, ВРФ является весьма перспективным соединением для терапии алопеции и может составить конкуренцию имеющимся средствам для роста волос, заняв определенную нишу в клинической практике.

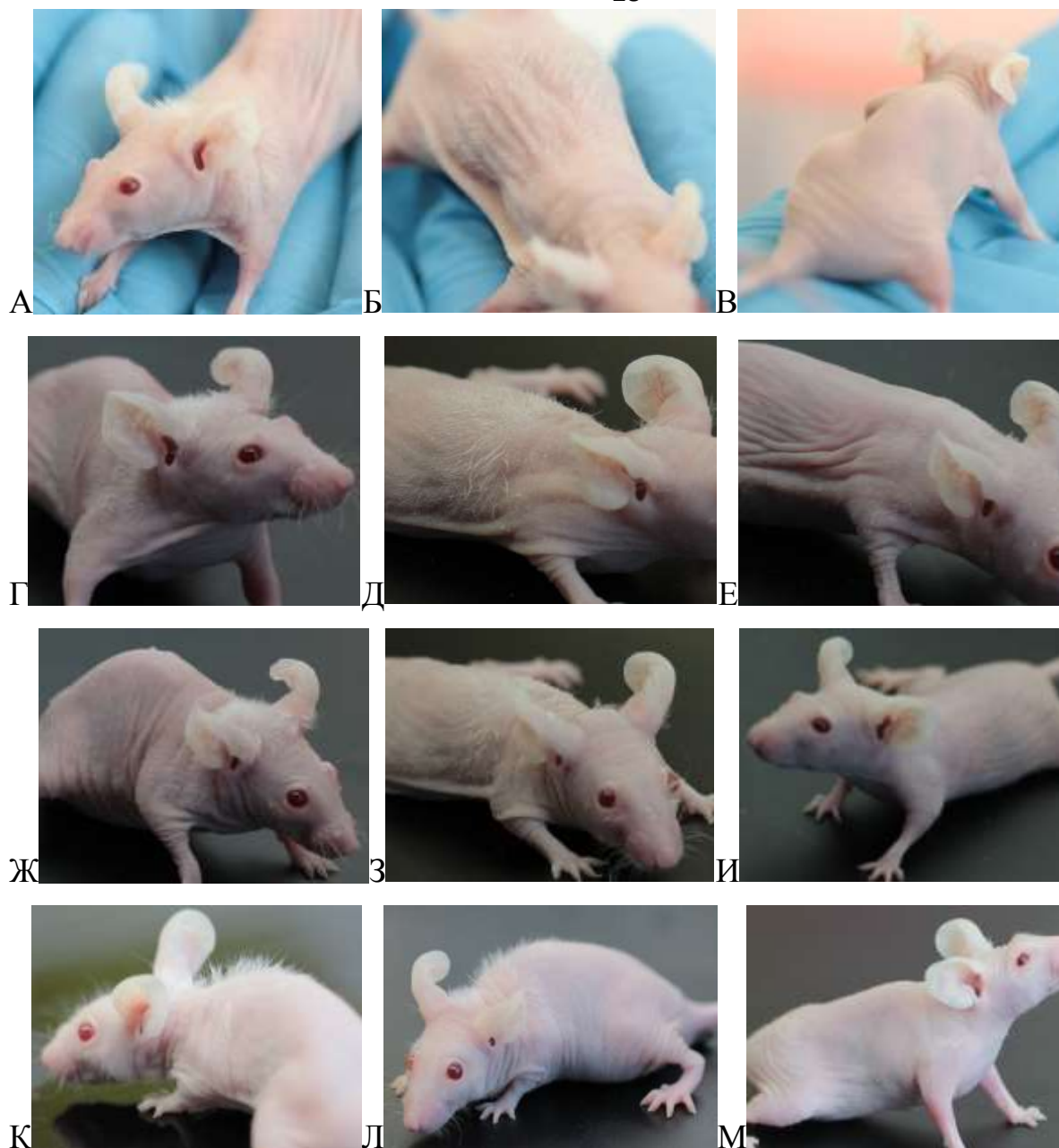


Рис. 11. Интенсивность роста волос у мышей линии Nu/pu при п/к введении ВРФ.

Мышам Nu/pu вводили ВРФ п/к (3 мкг/мышь) (А, Б, Г, Д, Ж, З, К, Л) или ФСБ (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.

Далее была изучена противовирусная активность ВРФ и проведено сравнительное изучение ВРФ и трех аминокислотных аддуктов фуллерена C60 в отношении ВПГ1-инфекции *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время получено много производных фуллерена C60 и C70, для некоторых из них показана антиоксидантная активность [Andreev et al., 2008; Lao et al., 2009; Shoji et al., 2013; Prylutskyu et al., 2014]. Ряд производных фуллерена обладают заметной противовирусной активностью [Chen et al., 2011; Goodarzi et al., 2017].

Установлено, что некоторые производные C60, 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].

В настоящей работе была изучена способность фуллерена и его производных оказывать как профилактическое, так и терапевтическое и вирулицидное действие. Профилактическое действие изучалось при внесении ВРФ и производных фуллерена C60 в клеточную культуру за 1 ч до заражения клеток вирусом, терапевтическое – при внесении соединений через 1 ч после заражения клеток вирусом, а вирулицидное – при заражении клеток вирусом, который предварительно инкубировали с исследуемыми соединениями. Поскольку противовирусное соединение должно сочетать высокую противовирусную активность с низкой цитотоксичностью, для определения потенциальной возможности применения соединений в качестве противовирусных агентов была проведена оценка индекса селективности ХТИ (SI) (рис. 12).

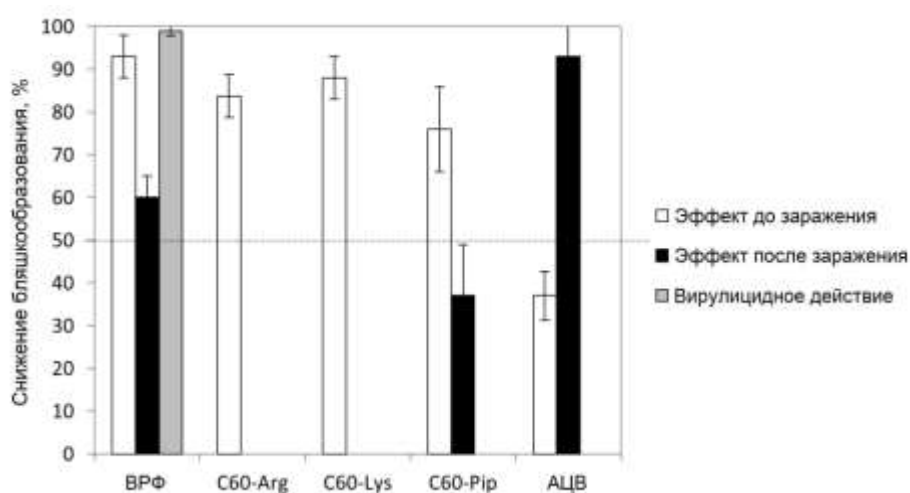


Рис. 12. Подавление ВПГ1 инфекции под действием тестируемых соединений *in vitro*. По горизонтали – обозначения соединений; по вертикали – ингибирование бляшкообразования ВПГ1, %. Белые столбики – обработка клеток соединениями до заражения вирусом; черные столбики – после заражения; серый столбик – обработка клеток смесью соединения с вирусом, после предварительной инкубации. mean±SD, %.

Полученные результаты показали, что все изученные соединения статистически значимо снижали количество инфицированных клеток (бляшек) в культуре клеток, где соединения присутствовали до заражения клеток вирусом; ВРФ и C60-Pip проявляли активность также при внесении их через 1 ч после инфицирования клеток. Важно отметить, что ВРФ обладал высокой вирулицидной (вирус-нейтрализующей) активностью. Данные показатели свидетельствуют о высоком противовирусном эффекте ВРФ.

Важным вопросом текущего исследования являлось изучение механизма действия ВРФ. Было разработано несколько гипотез о механизме биологической активности ВРФ.

Известно, что арил-углеводородный рецептор (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 *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 C₆₀ [Kasermann et al., 1998]. Было интересно оценить способность фуллерена C₆₀ влиять на экспрессию АУР и ассоциированных с ним генов в клетках легких, поскольку именно данная

ткань довольно часто поражается широко распространенными респираторными вирусами, которыми ежегодно поражается большой процент популяции. Для данного этапа исследований в качестве модельной клеточной культуры была выбрана линия клеток аденокарциномы легкого человека (A549). Кроме того, влияние ВРФ на экспрессию *Ahr* и ассоциированных с ним генов были изучены на клетках меланом, где данный рецептор высоко экспрессируется. В качестве дополнительного контроля, наряду с известными лигандами АУР (FICZ, ресвератрол), было введено такое соединение, как мелатонин, поскольку структурно он тоже может являться лигандом для АУР. На указанных линиях клеток были получены результаты по снижению экспрессии генов *Ahr* и увеличению *Nrf2* в присутствии ВРФ и других лигандов АУР, что согласуется с данными литературы, где описано, что NRF2 запускается посредством передачи сигналов через АУР (рис. 13). И система АУР, и система NRF2 направлена на борьбу с экологическими стрессами в различных тканях, включая кожу и слизистые оболочки [Shin et al., 2007].

На графиках видно, что присутствует дозозависимый эффект как для ВРФ, так и для классических лигандов АУР. Известно, что повышение экспрессия NRF2 может приводить к запуску сигнального пути NRF2/HO-1, что, в свою очередь, будет увеличивать антиоксидантную активность клеток. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что противовоспалительная активность ВРФ может быть отчасти опосредована взаимодействием с АУР и активацией данного сигнального пути за счет увеличения выработки NRF2. В рамках проведения исследования было также показано увеличение в присутствии ВРФ экспрессии *Nqo1*, который, как и *Nrf2*, является геном антиоксидантного фермента и препятствует развитию окислительного стресса и гибели клеток. На следующем этапе работ был проведен анализ экспрессии основных *Ahr* -зависимых цитохромов в условиях обработки клеток ВРФ (рис. 14).

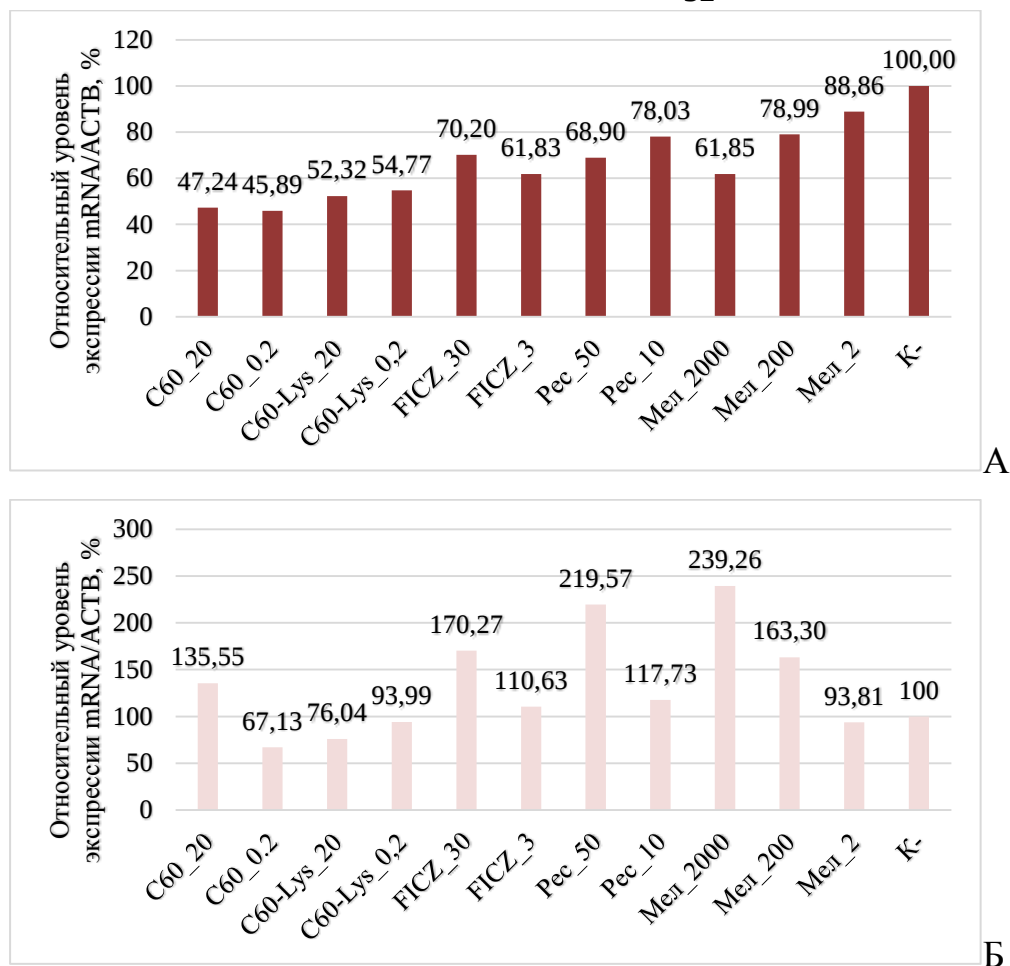


Рис. 13. Изменение экспрессии *Ahr* (А), *Nrf2* (Б) после обработки меланомы линии mel Is ВРФ и лигандами АУР. Концентрации соединений (нМ) указаны в названии групп после «_».

По литературным данным, существует АУР–зависимая индукция цитохрома CYP1A1, участвующего в детоксикации ксенобиотиков до метаболитов, которые затем выводятся с кровью, мочой и фекалиями. 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. Способность ВРФ ингибировать экспрессию *Ahr* и цитохромов наряду с повышением продукции факторов антиоксидантной защиты может свидетельствовать о том, 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 и противовирусный.

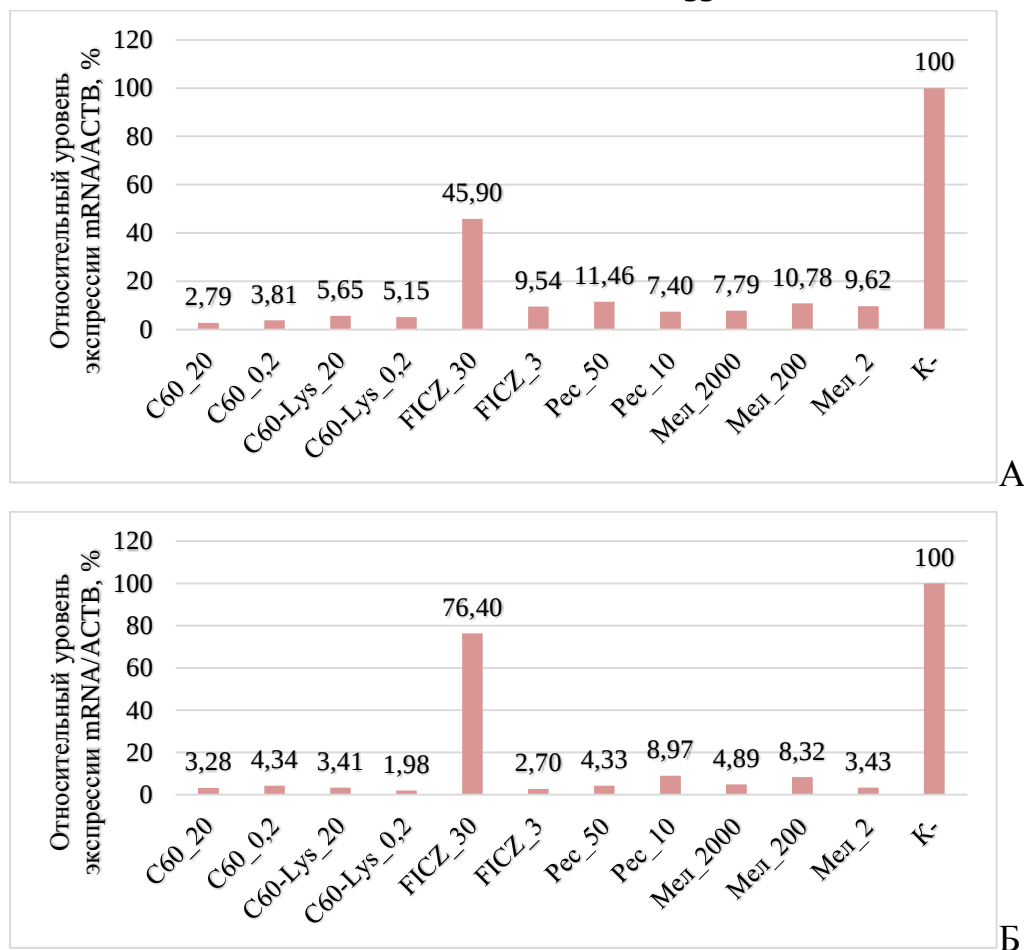


Рис. 14. Изменение экспрессии *Cyp11a1* (А) и *Cyp11b1* (Б) после обработки клеток меланомы линии mel Is ВРФ и лигандами АУР. Концентрации соединений (нМ) указаны в названии групп после «_».

Известно, что 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]. Оксид

азота (NO) и простагландин E₂ (PGE₂) являются типичными медиаторами воспаления, а цитокины, такие как фактор некроза опухоли (TNF α), ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-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. 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 ВРФ взаимодействовать с фосфолипидами, было решено использовать модель ЛПС-стимулированных макрофагов *in vitro*. 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 ВРФ инкубировали до добавления к клеткам. Функциональную активность ВРФ и его смеси с лецитином определяли путем анализа экспрессии ряда генов, патогенетически значимых при развитии воспалительной реакции (табл. 3).

Табл. 3. Изменение уровня экспрессии генов дифференцированными макрофагами фенотипа M1

№ п/п	Ген	ВРФ	ВРФ+лецитин
1	<i>TNFA</i>	↓	↑
2	<i>IL6</i>	↓	↓
3	<i>IL1B</i>	↓	↓
4	<i>COX1</i>	↓	↓
5	<i>COX2</i>	↓	↓
6	<i>ALOX5</i>	↓	↓
7	<i>ALOX12</i>	↓	0
8	<i>NRF2</i>	↑	0
9	<i>NFKB</i>	↓	0

«ВРФ» - клетки инкубировали в присутствии ВРФ; «ВРФ+лецитин» - клетки инкубировали в присутствии ВРФ и лецитина. Синие стрелочки – снижения экспрессии; красные – повышение экспрессии; малые желтые – слабый эффект снижения экспрессии.

В рамках эксперимента были получены макрофаги фенотипов M0 и M1 путем стимуляции ЛПС и IFN-γ (для получения M1). Анализ экспрессии генов ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов (*COX1*, *COX2*, *ALOX5*, *ALOX12*), продемонстрировал снижение уровня их экспрессии клетками в присутствии ВРФ. Однако, при добавлении смеси ВРФ со свободным лецитином, наблюдалось заметное уменьшение данного эффекта, что, вероятно, свидетельствует о негативном влиянии свободного лецитина на взаимодействие фуллерена C₆₀ с клетками. Кроме того, выработка провоспалительных факторов и цитокинов (TNFα, ИЛ-1β, ИЛ-6, NF-κB), снижаясь под действием ВРФ, снова увеличивалась при добавлении лецитина.

Таким образом, исходя из полученных данных о влиянии лецитина на активность ВРФ, можно сказать, что одной из предполагаемых мишеней для фуллерена C_{60} в организме могут являться фосфолипиды мембраны клеток, что в свою очередь может обуславливать 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 ВРФ наблюдается значительное снижение ферментов, участвующих в метаболизме арахидоновой кислоты, то можно сделать предположение, что фуллерен C_{60} , связываясь с фосфолипидами мембраны, экранирует их еще и от воздействия фосфолипаз.

В рамках исследований на дифференцированных макрофагах было также продемонстрировано, что ВРФ стимулировал экспрессию такого гена, как *Ccl2*, который является фактором хемотаксиса макрофагов/моноцитов, отвечая за миграцию клеток в очаг воспаления. Было выдвинуто предположение о том, что фуллерен C_{60} способен влиять на хемотаксис макрофагов и скорость их прибытия в зону поражения. Для наглядности эффекта влияния ВРФ на хемотаксис макрофагов был проведен ряд отдельных экспериментов *in vitro*. При введении ВРФ в культуру перитонеальных макрофагов мыши был визуально замечен эффект перераспределения клеток, которые концентрировались в зоне нахождения частиц фуллерена C_{60} (рис. 15).

Mizutani Y с соавторами показали, что CCL2 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. Основываясь на представленных данных, мы можем предположить, что ВРФ обладает иммуномодулирующим действием, оказывая соответствующее влияние на макрофаги.

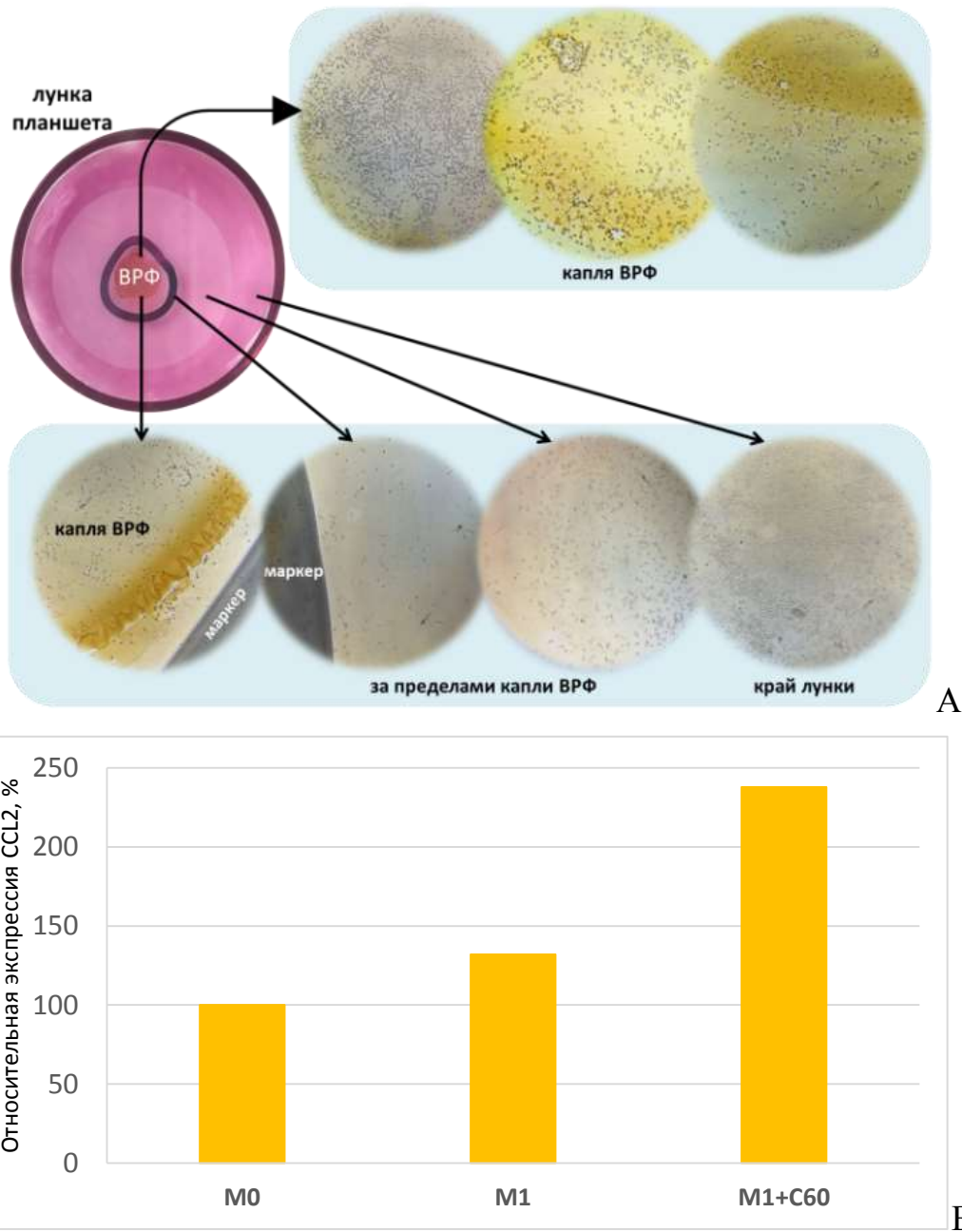


Рис. 15. Способность фуллерена C60 влиять на распределение макрофагов (А) и уровень экспрессии *Scl2* (Б). «М0» – не дифференцированные макрофаги; «М1» – дифференцированные макрофаги фенотипа М1; «М1+С60» – дифференцированные макрофаги М1, которые инкубировали в присутствии ВРФ.

Таким образом, резюмируя вышепредставленные результаты относительно разработки гипотез механизма действия фуллерена C60, была составлена схема (Рис. 16).

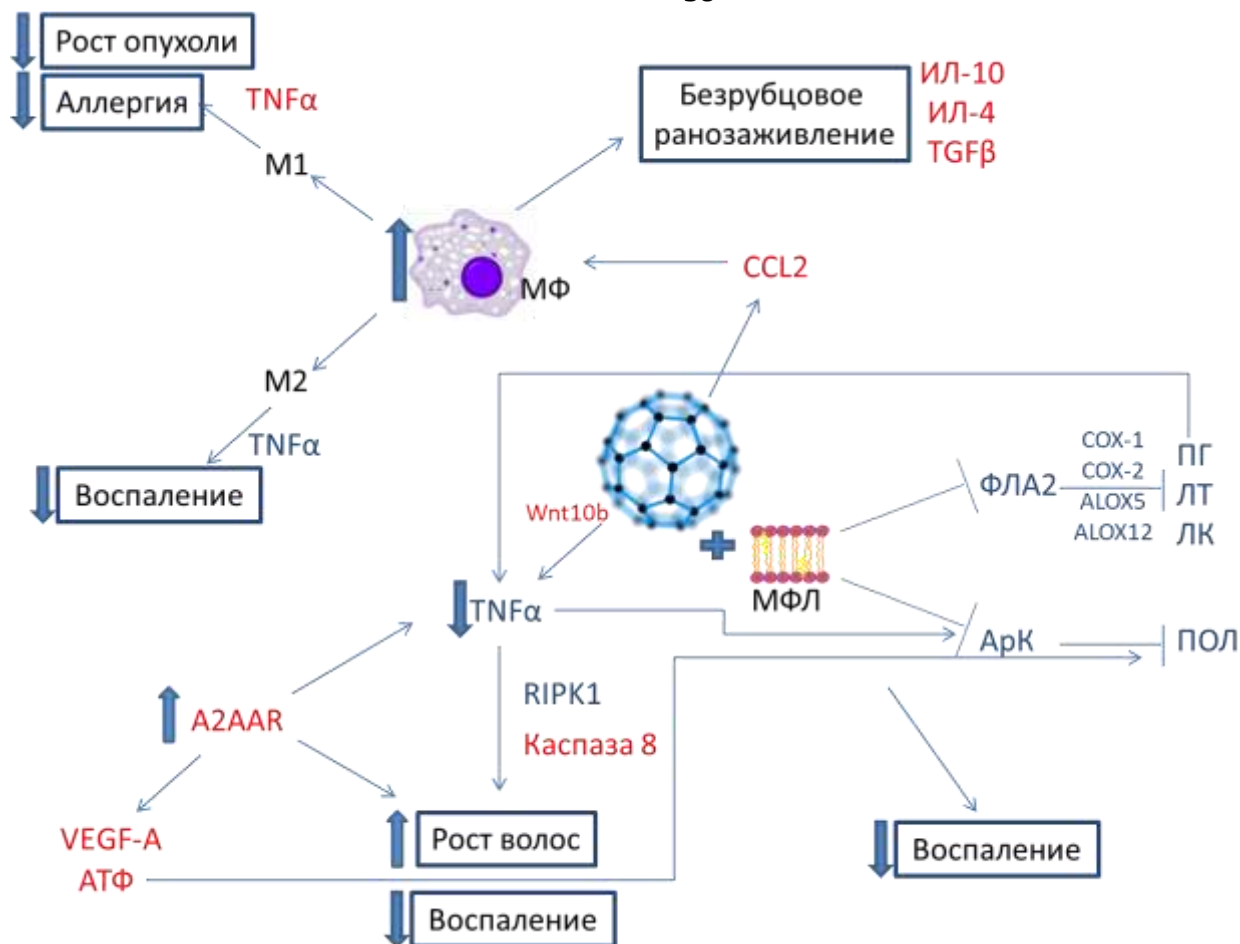


Рис. 16. Возможный механизм биологической активности фуллерена C60.

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; М1 – макрофаги фенотипа М1; М2 – макрофаги фенотипа М2; 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).

Представленная схема разработана для наглядного представления возможного механизма биологической активности ВРФ. 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 ВРФ может быть связана с показанной в текущей работе его способностью влиять на поляризацию макрофагов (рис. 17, 18).

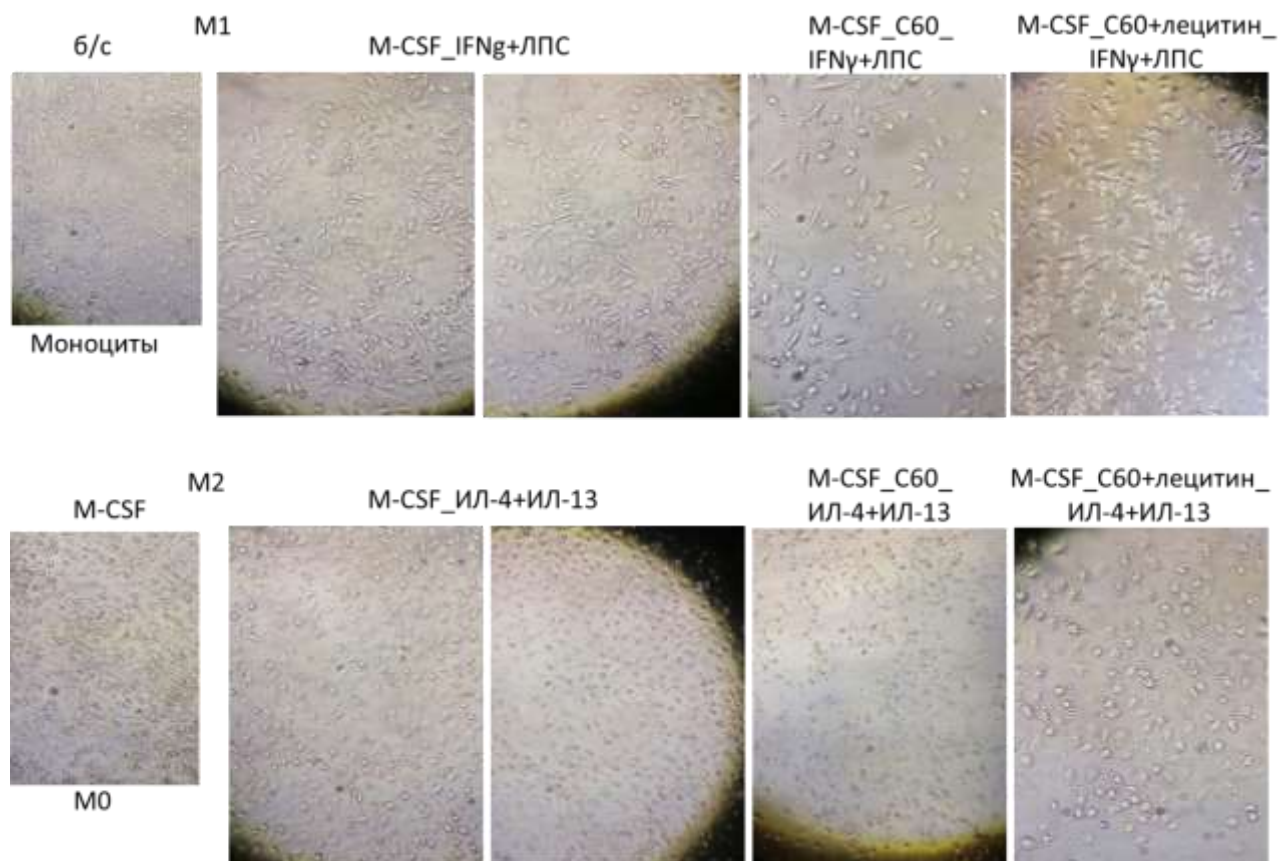


Рис. 17. Фото PBMC после проведения различных этапов стимуляции.

б/с – стимуляции клеток PBMC не проводилось; М-CSF – клетки стимулировали только фактором М-CSF; М-CSF_IFN γ +ЛПС - клетки стимулировали М-CSF с последующим внесением IFN γ и ЛПС; М-CSF_C60_IFN γ +ЛПС - клетки стимулировали М-CSF с последующим внесением ВРФ, а затем IFN γ и ЛПС; М-CSF_C60+лецитин_IFN γ +ЛПС - клетки стимулировали М-CSF с последующим внесением ВРФ в смеси с лецитином, а затем IFN γ и ЛПС; М-CSF_ИЛ-4+ИЛ-13 - клетки стимулировали М-CSF с последующим внесением ИЛ-4 и ИЛ-13; М-CSF_C60_ИЛ-4+ИЛ-13 - клетки стимулировали М-CSF с последующим внесением ВРФ, а затем ИЛ-4 и ИЛ-13; М-CSF_C60+лецитин_ИЛ-4+ИЛ-13 - клетки стимулировали М-CSF с последующим внесением ВРФ в смеси с лецитином, а затем ИЛ-4 и ИЛ-13.

На графике видно, что визуальный анализ подтверждается данными проточной цитометрии. На макрофагах предположительно фенотипа М1 (клетки вытянутой формы) преимущественно экспрессируется CCR7, а на макрофагах предположительно фенотипа М2 (клетки округлой формы) –

CD206. На клетках, обработанных ВРФ, экспрессия указанных маркеров несколько меняется. Так, при предварительной инкубации ВРФ с клетками M1, наблюдается некоторое уменьшение количества CCR7+ клеток, а с клетками M2 – уменьшение количества CD206+ клеток. Показанные результаты могут косвенно свидетельствовать модулирующей активности ВРФ в отношении макрофагов. Так, при внесении к макрофагам M0 IFN γ +ЛПС ВРФ препятствует дифференцировке клеток в M1, а при добавлении ИЛ-4+ИЛ-13 – в M2. Однако, следует отметить, что в присутствии ВРФ сдвиг дифференцировки макрофагов в сторону M2 был выражен сильнее.

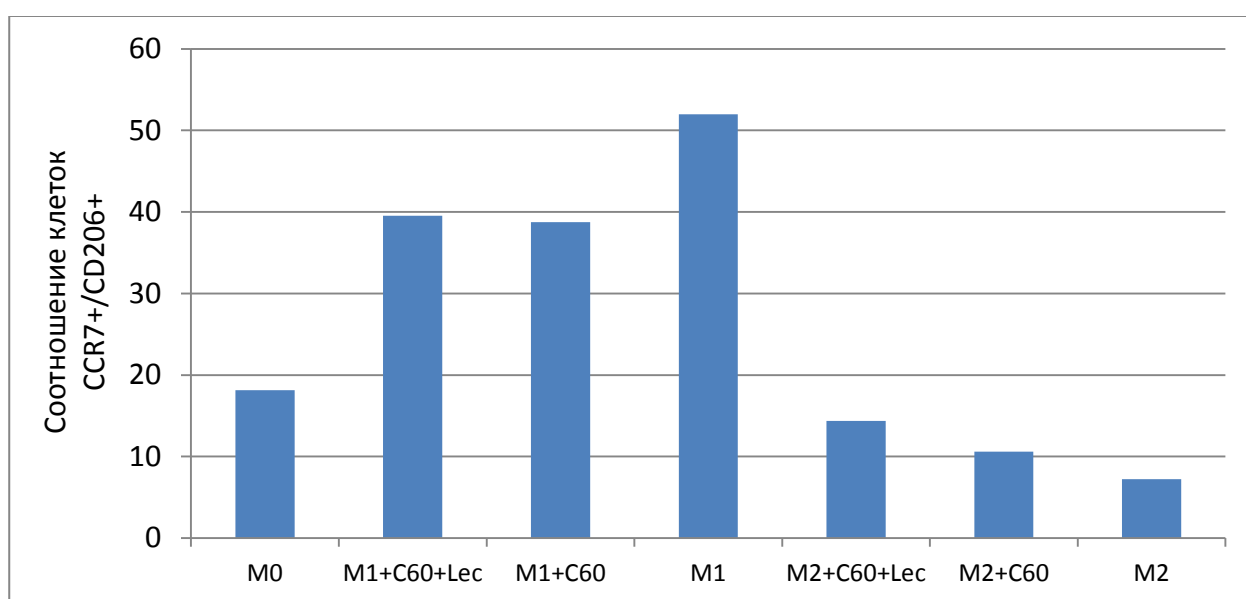


Рис. 18. Анализ фенотипа макрофагов методом проточной цитометрии. Соотношение клеток CCR7+/CD206+ (M1/M2).

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 (рис. 16) показана его связь со способностью фуллерена C₆₀ привлекать в зону поражения большое количество 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 ВРФ, по-видимому, обусловлен соответствующей поляризацией макрофагов, прибывших в зону поражения, и развитием Th1 иммунного ответа, поскольку в проведенных экспериментах мы наблюдали снижение уровня Th2-цитокинов и увеличение уровней ИЛ-12 и IFN- γ , а также снижение уровня специфического IgE. Кроме того, была показана способность фуллерена C₆₀ препятствовать дифференцировке макрофагов в присутствии IFN γ +ЛПС в M1, а в присутствии ИЛ-4+ИЛ-13 в M2, соответственно. Показанное увеличение экспрессии аденозинового рецептора может обуславливать не только противовоспалительную активность фуллерена C₆₀, но и фолликулостимулирующую, учитывая подавление экспрессии *Tnfa* и стимуляцию экспрессии *Vegfa*. Таким образом, представленная схема иллюстрирует возможные механизмы биологической активности ВРФ и может быть основой для дальнейших исследований в данной области.

Одним из этапов оценки биологической безопасности и перспективности применения соединения как действующего начала терапевтического средства является анализ токсичности. В настоящей работе мы установили, что ВРФ, независимо от способа введения, токсическим эффектом не обладал. Гистологический анализ также не выявил каких-либо патологических изменений внутренних органов, характерных для токсического поражения. Длительный эксперимент по анализу токсичности ВРФ (ежедневное введение в течение месяца), проведенный на мышах линии Balb/c также показал отсутствие токсических эффектов.

Из проведенного в текущей работе анализа фармакокинетики фуллерена C₆₀ можно сделать заключение о том, что способ введения 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 C_{60} , впервые было показано, что фуллерен C_{60} может активно выводиться из организма. Во-первых, через почки, и, во вторых, через желчные протоки. Причем исследование было количественным. Наличие фуллерена C_{60} в моче и кале фиксировалось в течение 72 часов. Степень выведения фуллерена C_{60} в неизменном виде составляла, по крайней мере, около 70%. Часть фуллерена C_{60} , вероятно, может метаболизироваться путем окисления в печени и выводится уже в форме метаболитов.

Прикладной аспект представленных разработок заключается в получении ряда патентов, масштабировании технологии получения ВРФ, а также регистрации готовых препаратов для применения. В рамках текущей работы была проведена оптимизация и стандартизации технологии получения ВРФ. В 2019 году была запатентована технология получения высококонцентрированного ВРФ (Патент 2679257). Концентрация получаемого по данной технологии ВРФ 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 ВРФ был получен первый сертификат соответствия о том, что он разрешен для применения в косметологии (РОСС RU.НВ25.Н01264 от 20.12.2019, срок действия до 19.12.2022). Действующим является сертификат соответствия РОСС RU.32001.04ИБФ1.ОСП18.27421 от 20.12.2022.

В 2019 году качестве инновационного продукта был зарегистрирован крем на основе ВРФ (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.РА05.В.31256/22 от 03.09.2022. Фуллерен C_{60} , 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. Был проведен анализ противогерпетической

активности крема в условиях терапевтического применения. Для этого была сформирована группа пациентов N 28. Было показано, что применение крема на основе ВРФ в течение 1-2 дней подавляет развитие инфекции при применении на ранней стадии клинических проявлений. По результатам оценки пациентами качества препарата выяснилось, что средний балл по семи показателям (консистенция/текстура, цвет, запах, впитываемость, субъективные ощущения на коже, легкость применения, переносимость) 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.

Принимая во внимание показанную в представленной работе фолликулостимулирующую активность ВРФ, 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). Представленный клинический случай описывает эффект применения спрея у пациента после курса химиотерапии. Видно, что идет постепенное восстановление роста волос, причем волос не является пушковым (рис. 19).



Рис. 19. 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).

Важным этапом разработки лекарственных средств является проведение цикла доклинических исследований. Запланировано проведение доклинических

исследований (ДКИ) ВРФ для терапии пищевой аллергии. Кроме того, перспективной является разработка на основе ВРФ комплексных противовирусных препаратов. Успешное завершение ДКИ позволит в дальнейшем провести клинические испытания для вывода лекарственных средств на рынок и внедрения их в клиническую практику.

Выводы

1. Показано, что фуллерен C60 связывается с арил-углеводородным рецептором и влияет на экспрессию *Ahr*-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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Shershakova N.N., Andreev S.M., Tomchuk A.A., Makarova E.A., Nikonova A.A., Turetskiy E.A., Petukhova O.A., Kamysnikov O.Y., Ivankov O.I., Kyzyma O.A., Tomchuk O.V., Avdeev M.V., Dvornikov A.S., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C₆₀ produced by "green technology". *Nanomedicine*. 2023 V. 47:102619. PP. 15.
2. Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Y., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R., Pronin A.V., Kushch A.A. Adjuvant effect of dispersed fullerene C₆₀ on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Vopr Virusol*. 2023. V. 67. № 6. P. 516-526.
3. Галкина А. А., Болякина Д. К., Шатилова А. В., Шатилов А. А., Бабихина М. О., Голомидова А. К., Андреев С. М., Шершакова Н. Н., Хаитов М. Р. Разработка и оценка эффективности ранозаживляющих соединений на основе катионных пептидов и фуллерена. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2023. №3. С. –1-9
4. Порошина А.С., Шершакова Н.Н., Шиловский И.П., Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Гудима Г.О., Хаитов М.Р. Роль ИЛ-25, ИЛ-33 и TSLP в развитии кортикостероидной резистентности. *Иммунология*. 2023. Т. 44. № 4. С. 500–510.
5. Елисютина О.Г., Шершакова Н.Н., Смирнов В.В., Шиловский И.П., Корнеев А.В., Порошина А.С., Смольников Е.В., Литовкина А.О., Феденко Е.С., Кудлай Д.А., Валента Р., Хаитов М.Р. Новые подходы к аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ): разработка рекомбинантной вакцины от аллергии на пыльцу березы. *Иммунология*. 2022. Т. 43. № 6. С. 621-631.
6. Tomchuk A.A., Ivankov O.I., Tropin T.V., Tomchuk O.V., Avdeev M.V., Voiteshenko I.S., Shershakova N.N., Andreev S.M., Turetskiy E.A., Khaitov M.R. Comparative structural study of C₆₀-lysine and C₆₀-piperazine biocompatible aqueous solutions, Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2022. V. 30. № 1. P. 27-35.
7. Klimova R., Andreev S., Momotyuk E., Demidova N., Fedorova N., Chernoryzh Y., Yurlov K., Turetskiy E., Baraboshkina E., Shershakova N., Simonov R., Kushch A., Khaitov M., Gintsburg A. Aqueous fullerene C₆₀

- solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections, Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2020. V. 28. № 6. P. 487-499.
8. Tomchuk A.A., Shershakova N.N., Andreev S.M., Turetskiy E.A., Ivankov O.I., Kyzyma O.A., Tomchuk O.V., Avdeev M.V. (2020) C60 and C60-arginine aqueous solutions: *In vitro* toxicity and structural study. Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures. V. 28. I. 4. P. 245-249.
 9. Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Кожихова К.В., Шатилов А.А., Тимофеева А.В., Турецкий Е.А., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Перспективные соединения из природных источников для терапии COVID-19. Российский аллергологический журнал. 2020. Т. 17. № 2. С. 18-32.
 10. Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamysnikov 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.
 11. Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Барабошкина Е.Н., Шабанова Д.Д., Макарова Э.А., Хаитов М.Р. Противоаллергические свойства водорастворимой формы фуллерена C60. Иммунология. 2016. Т. 37. № 6. С. 329-331.
 12. Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Макарова Э.А., Барабошкина Е.Н., Хаитов М.Р. Изучение гемолитической активности водной дисперсии фуллерена C60. Иммунология. 2016. Т. 37. № 4. С. 212-215.
 13. Шершакова Н.Н., Барабошкина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р. Отсутствие острой токсичности у водного раствора фуллерена C60. Иммунология. 2016. Т. 37. № 6. С. 325-329.
 14. Смирнов В.В., Петухов А.Е., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Егоренков Е.А., Шершакова Н.Н., Хаитов М.Р. Количественное определение фуллерена C60 в водных средах. Иммунология. 2016. Т. 37. № 6. С. 343-347.
 15. Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev A., Osipova N., Shershakova N., Khaitov M. 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.

16. Shershakova N, Bashkatova E, Babakhin A, Andreev S, Nikonova A, Shilovsky I, Kamyshnikov O, Buzuk A, Elisyutina O, Fedenko E, Khaitov M Allergen-Specific Immunotherapy with Monomeric Allergoid in a Mouse Model of Atopic Dermatitis. PLoS ONE. 2015. V. 10. № 8. P. e0135070.
17. Андреев С.М., Башкатова Е.Н., Пургина Д.Д., Шершакова Н.Н., Хаитов М.Р. Фуллерены: биомедицинский аспект. Иммунология. 2015. Т. 36. № 1. С. 57-61.
18. Бабахин А.А., Шершакова Н.Н., Ласкин А.А., Камышников О.Ю., Шиловский И.П., Андреев С.М., Львов В.Л., Апарин П.Г., Хаитов М.Р. Аллерген-специфическая иммунотерапия экспериментального атопического дерматита мономерным аллергоидом, адъювантированным экзополисахаридом из *Shigella sonnei*. Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9. № 1 (18). С. 121-124.
19. Бабахин А.А., Ласкин А.А., Камышников О.Ю., Шершакова Н.Н., Шиловский И.П., Бержец В.М., Гущин И.С., Хаитов М.Р. Модель экспериментальной бронхиальной астмы, индуцированной у мышей аллергенным экстрактом из клещей домашней пыли *Dematophagoides pteronyssinus*. Российский аллергологический журнал. 2015. № 6. С. 25-33.
20. Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Башкатова Е.Н., Камышников О.Ю., Андреев С.М., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Аллергенспецифическая иммунотерапия при экспериментальном атопическом дерматите. Иммунология. 2014. Т. 35. № 3. С. 155-160.
21. Бабахин А.А., Шершакова Н.Н., Ласкин А.А., Камышников О.Ю., Шиловский И.П., Андреев С.М., Львов В.Л., Апарин П.Г., Хаитов М.Р. Иммунопатология: патогенез и диагностика аллергических, аутоиммунных, лимфопролиферативных заболеваний и иммундефицитов. Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8. № 3 (17). С. 503-505.
22. Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Башкатова Е.Н., Елисютин О.Г., Хаитов М.Р. Комбинированная сенсibilизация при моделировании атопического дерматита. Российский аллергологический журнал. 2012. № 1. С. 293-294.
23. Башкатова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Разработка препаратов, подавляющих аллергическое воспаление, и их тестирование в модели гиперчувствительности замедленного типа. Синтез и изучение эффектов

- катионных аддуктов фуллерена C₆₀. Российский аллергологический журнал. 2012. № S5. С. 19-20.
24. Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Елисютина О.Г., Хаитов М.Р. Атопический дерматит: экспериментальные модели для изучения патогенеза и разработки новых методов лечения. Российский аллергологический журнал. 2011. № 6. С. 3-11.
 25. Патент 2630561, RUS Способ получения водно-солевых дисперсий фуллерена.— № 2015145015; заявл. 20.10.2015; опубл. 2017.
 26. Патент 2641041, RUS Композиция для терапии атопического дерматита на основе фуллерена.— № 2016149440; заявл. 15.12.2016; опубл. 2018.
 27. Патент 2641091, RUS Применение водно-солевого раствора фуллерена C₆₀ в качестве терапевтического средства при заболеваниях атопическим дерматитом.— № 2016149439; заявл. 15.12.2016; опубл. 2018.
 28. Патент 2679257, RUS Способ получения высококонцентрированного водного раствора фуллерена — № 2018101687/05(002206), заявл. 17.01.2018, опубл. 2019.
 29. Патент 2694754, RUS Противовирусная активность водного раствора фуллерена — № 2018136488, заявл. 16.10.2018, опубл. 2019.