

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.3>**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ Фуллеренов с одной минорной заменой в тиофеновом адденде на уровень экспрессии NADPH-ОКСИДАЗЫ 4 в эмбриональных фибробластах легкого человека**

Научная статья

Савинова Е.А.^{1,*}, Костюк С.В.², Проскурнина Е.В.³, Ершова Е.С.⁴, Каменева Л.В.⁵, Вейко Н.Н.⁶, Савинов А.Л.⁷,
Большакова В.С.⁸, Краевая О.А.⁹, Трошин П.А.¹⁰¹ ORCID : 0000-0001-5286-516X;³ ORCID : 0000-0002-8243-6339;⁸ ORCID : 0000-0002-5111-7474;¹⁰ ORCID : 0000-0001-9957-4140;^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Российская Федерация⁷ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Российская Федерация^{8, 9, 10} Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (savinova.ekaterina96[at]yandex.ru)

Аннотация

Поиск высокоэффективных антиоксидантов является актуальной медико-биологической задачей. Фуллерены и их производные обладают высокой антиоксидантной активностью, что делает их потенциальными препаратами для лечения заболеваний, вызванных активными формами кислорода. Целью данной работы было изучить влияние минорной замены (метильного радикала на карбоксиметильный) в одном из аддендов водорастворимых производных фуллерена C₆₀ с общей формулой C₆₀Ar₅Th'Th''H на уровень активных форм кислорода в клетках фибробластов легкого эмбриона человека в разных концентрациях и в разные временные интервалы. Показано, что производное фуллерена C₆₀, не имеющее карбоксильной группы в качестве минорной замены, обладает более длительным (24 часа) антиоксидантным эффектом. Полученные данные свидетельствуют о высоком антиоксидантном потенциале данного соединения, что делает его перспективным объектом для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: производные фуллерена C₆₀, активные формы кислорода, эмбриональные фибробласты легкого человека, NOX4.

INFLUENCE OF FULLERENE DERIVATIVES WITH A SINGLE MINOR SUBSTITUTION IN THIOPHENE ADDENDUM ON THE EXPRESSION LEVEL OF NADPH-OXIDASE 4 IN HUMAN EMBRYONIC LUNG FIBROBLASTS

Research article

Savinova E.A.^{1,*}, Kostyuk S.V.², Proskurnina E.V.³, Yershova E.S.⁴, Kameneva L.V.⁵, Veiko N.N.⁶, Savinov A.L.⁷,
Bolshakova V.S.⁸, Kraevaya O.A.⁹, Troshin P.A.¹⁰¹ ORCID : 0000-0001-5286-516X;³ ORCID : 0000-0002-8243-6339;⁸ ORCID : 0000-0002-5111-7474;¹⁰ ORCID : 0000-0001-9957-4140;^{1, 2, 3, 4, 5, 6} N.P. Bochkov Medical and Genetic Scientific Center, Moscow, Russian Federation⁷ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russian Federation^{8, 9, 10} Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russian Federation

* Corresponding author (savinova.ekaterina96[at]yandex.ru)

Abstract

The search for highly effective antioxidants is an urgent biomedical task. Fullerenes and their derivatives have high antioxidant activity, which makes them potential drugs for the treatment of diseases caused by reactive oxygen species. The aim of this work was to study the effect of minor substitution (methyl radical to carboxymethyl radical) in one of the addenda of water-soluble fullerene C₆₀ derivatives with the general formula C₆₀Ar₅Th'Th''H on the level of reactive oxygen species in human embryonic lung fibroblast cells at different concentrations and time intervals. It is shown that the fullerene derivative C₆₀, which does not have a carboxyl group as a minor substitution, has a longer (24 hours) antioxidant effect. The obtained data indicate a high antioxidant potential of this compound, which makes it a promising object for further research.

Keywords: fullerene C₆₀ derivatives, reactive oxygen species, human embryonic lung fibroblasts, NOX4.

Введение

Производные фуллеренов стали предметом интенсивных исследований в последние десятилетия. Фуллерены проявляют широкий спектр различной биологической активности и могут применяться в качестве вектора для доставки лекарств, противораковых [1], [2], [3], [5], антивирусных [6], [9], [12], [14], антибактериальных препаратов [9], [10], а также для таргетной доставки веществ [15], [16], что делает их перспективными кандидатами, как для

диагностики, так и для терапевтического применения. Благодаря наличию большого количества двойных сопряжённых связей фуллерены и их водорастворимые производные являются мощными акцепторами свободных радикалов, что делает этот класс соединений привлекательным инструментом для регулирования свободнорадикальных процессов и для снижения тяжести окислительного стресса в биологических системах [17], [18], [19], [20]. Благодаря их высокой антиоксидантной активности водорастворимые производные могут применяться для лечения заболеваний, вызванных активными формами кислорода [21], [22], [23]. Данное свойство делает эти наносоединения предметом интереса не только генетики и молекулярной биологии, но также и биофизики.

Методы и принципы исследования

2.1. Клеточные культуры

Клеточная культура эмбриональных фибробластов легкого человека (ФЛЭЧ) 4-го пассажа для данного исследования была предоставлена ФГБНУ «МГНЦ». Культивирование проводилось при температуре 37°C в среде DMEM (ПанЭко, Россия), обогащенной 20%-ной телячьей сывороткой (PAA Laboratories, Вена, Австрия). В среду добавляли 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10 мг/мл гентамицина (данные реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) [24]. Клетки ФЛЭЧ инкубировали с водными растворами фуллеренов в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5%, в течение 1, 3 и 24 часов.

2.2. Производные фуллерена C₆₀

В качестве объекта исследования использовали водорастворимые производные фуллеренов C₆₀ с одной минорной заменой (присоединена карбоксильная группа к тиофен-радикалу). Синтез и спектральные данные полученных соединений представлены в работе [25].

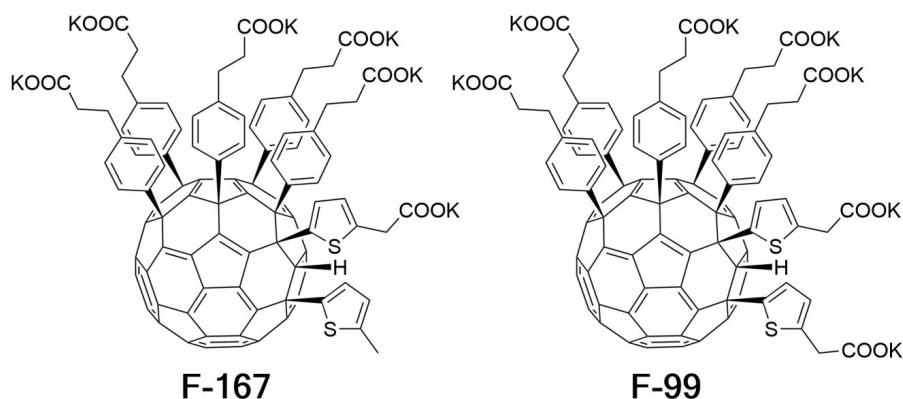


Рисунок 1 - Химические формулы исследованных водорастворимых производных фуллеренов C₆₀
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.3.1>

2.3. МТТ-тест

Токсичность соединений определяли методом метилтетразолиевым теста (МТТ-тест). В основе данного метода лежит реакция восстановления желтого МТТ (метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид) до пурпурного формазана с помощью дегидрогеназ митохондрий. Реакция протекает только в жизнеспособных клетках с функционирующими ферментами митохондрий. Измерение флуоресценции окрашенных клеток осуществлялось на приборе EnSpire Equipment (EnSpire Equipment, Турку, Финляндия), длина волны возбуждения составляла $\lambda_{ex} = 488$ нм, длина волны испускания $\lambda_{em} = 528$ нм. Эксперименты проведены не менее чем в восьми повторах.

2.4. Определение количества АФК

Уровень синтеза АФК в культуре клеток измеряли с помощью H₂DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата), данный краситель способен быстро проникать через клеточные мембраны, и гидролизироваться до DCFH в цитозоле гидролазами клетки. DCFH не флуоресцирует в клетках, но является чувствительным маркером окислительного стресса. При взаимодействии DCFH и АФК, данный краситель окисляется до флуоресцирующего DCF. Уровень синтеза АФК измерялся на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter). По окончании времени воздействия фуллерена на клетки добавлялся раствор H₂DCFH-DA и проводился анализ изменения флуоресценции сигнала в зависимости от времени инкубации клеток в присутствии красителя. Скорость синтеза DCF отражает количество АФК в клеточной культуре.

2.5. Определение уровня экспрессии белка

Экспрессию белка оценивали методом проточной цитометрии с использованием специфических антител (CY5.5-NOX4 (bs-1091r-cy5-5, антитела Bioss, Inc. Воберн, Массачусетс, США) на проточном цитофлуориметре CyFlow Space (Partec, Meckenheim, Германия).

2.6. Оценка уровня мРНК

Оценка экспрессии генов производилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Выделение РНК после воздействия фуллеренов на клетки осуществлялось по стандартной методике набора YellowSolve (Клоноген, Санкт-Петербург, Россия). Измерение концентрации РНК проводилось на планшетном ридере (EnSpire, Турку, Финляндия), $\lambda_{ex} = 487$ нм, $\lambda_{fl} = 524$ нм. Для проведения реакции обратной транскрипции по стандартной методике использовали реагенты фирмы Sileks (Москва, Россия). ПЦР проводили с использованием соответствующих праймеров (Synthol) и смеси SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Калифорния, США)

на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, Калифорния, США). Погрешность составила около 2%. В качестве гена референса использовался ТВР [24].

Основные результаты

Исследовали влияние водорастворимых производных фуллеренов F-167 и F-99. Для оценки цитотоксичности исследуемых соединений в отношении нормальных клеток человека – ФЛЭЧ – был проведён МТТ-тест (рисунок 2). Фуллерены добавлялись в среду в начале культивирования ФЛЭЧ. Длительность культивирования составляла 72 часа.

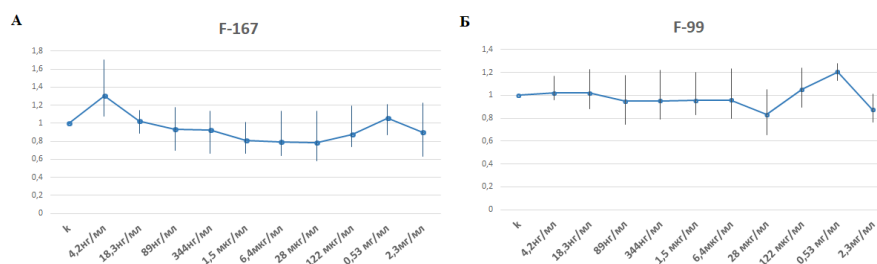


Рисунок 2 - Выживаемость клеток линии ФЛЭЧ в присутствии фуллеренов по результатам МТТ-теста: А – F-167; Б – F-99

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.3.2>

Примечание: данные МТТ теста представлены в виде среднего значения, вертикальные линии указывают на максимальное и минимальное значения выживаемости для определенной концентрации фуллерена; по оси X – концентрации фуллеренов, обозначены на рисунке; по оси Y – оптическая плотность при 570 нм; зеленая линия – контроль, по оси ординат отложены значения МТТ-теста относительно контрольного образца (клетки, культивируемые без производных фуллерена)

Для дальнейшего исследования воздействия производных фуллеренов на уровень АФК в клетках ФЛЭЧ были выбраны две концентрации каждого соединения, входящие в диапазон нетоксичных концентраций фуллеренов: низкая – 18 нг/мл и более высокая – 28 мкг/мл; и три времени инкубации клеток с соединениями - 1, 3 и 24 часа. Исследовался уровень синтезируемых АФК с помощью DCF. На рисунке 3 приводятся зависимости уровня синтеза DCF в клетках при концентрациях фуллеренов 18 нг/мл и 28 мкг/мл к контролю (клеткам, культивируемым без фуллеренов) от времени. При добавлении к клеткам производного фуллерена F-167 наблюдается снижение уровня АФК через 1 час, исследуемое соединение продолжает связывать АФК в течение 24 часов – уровень АФК не достигает в клетках физиологического уровня, а остается пониженным, хоть и возрастает со временем. При культивировании производного F-99 с клетками ФЛЭЧ в концентрациях 18 нг/мл и 28 мкг/мл наблюдается снижение уровня АФК через 1 час, в течение 3 часов уровень АФК в клетках снижается на 30-40%, а через 24 часа уровень АФК повышается на 15-30% (рисунок 3).

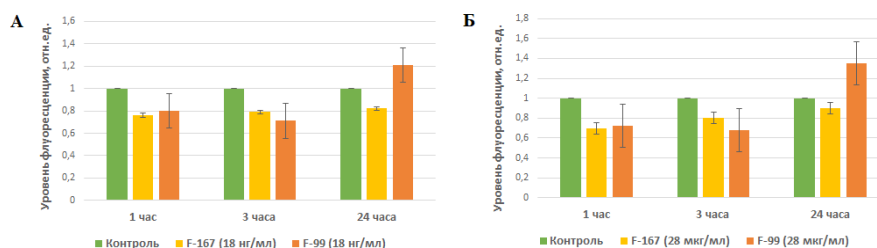


Рисунок 3 - Зависимость уровня синтеза DCF в клетках ФЛЭЧ при инкубации с фуллеренами F-167 и F-99 в концентрации 18 нг/мл (А) и 28 мкг/мл (Б) и к контролю от времени

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.3.3>

Примечание: 1, 3, 24 часа инкубации

NADPH-оксидазы являются одним из источников образования АФК (супероксидного радикала) в клетках. NADPH-оксидаза 4 (NOX4) одна из типов экспрессирующийся в фибробластах NADPH-оксидаз, экспрессия которого регулируется на уровне гена. В данной работе был исследован уровень экспрессии NOX4 на уровне гена и белка в клетках (ФЛЭЧ) после инкубации производных фуллеренов (F-167 и F-99) в концентрациях 18 нг/мл и 28 мкг/мл в различных интервалах времени (1, 3, 24 часа). При действии на клетки производного фуллерена F-167 в концентрации 28 мкг/мл через 24 часа после начала инкубации с соединением достоверно ($p < 0,01$) возрастает уровень экспрессии

NOX4 в 1,5 раза на уровне белка, и в 1,7 раз на уровне гена (рисунок 4 (Б), 5 (Б)). При действии на клетки производного фуллерена F-99 концентрациях 18 нг/мл и 28 мкг/мл возрастает уровень экспрессии NOX4 в 1,4-2,1 раз на уровне гена и белка через 3-24 часа после начала инкубации с соединениями (рисунок 4, 5). Повышение уровня экспрессии белка NOX4 через 24 часа инкубации клеток с исследуемыми соединениями может объяснить, почему возрастает уровень АФК в клетках через 24 часа после добавления, данного соединений к ФЛЭЧ.

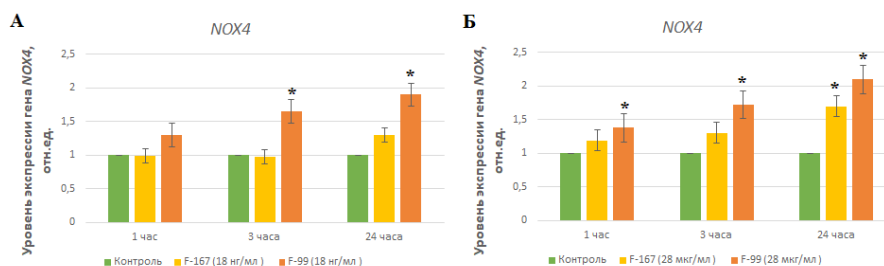


Рисунок 4 - Уровень белка NOX4 в клетках ФЛЭЧ при инкубации с фуллеренами F-167 и F-99 в концентрации 18 нг/мл (А) и 28 мкг/мл (Б) и к контролю от времени
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.3.4>

Примечание: 1, 3, 24 часа инкубации; * – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,01$, непараметрический U-тест

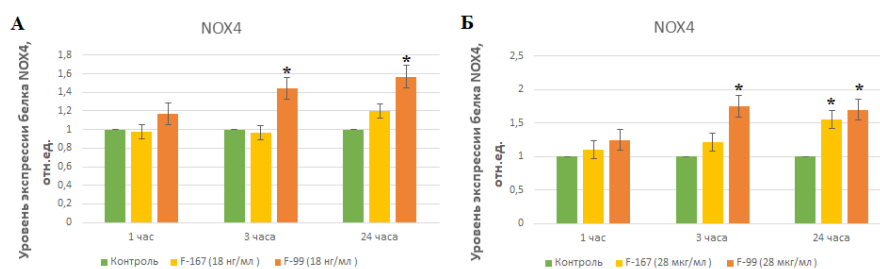


Рисунок 5 - Уровень экспрессии гена NOX4 в клетках ФЛЭЧ при инкубации с фуллеренами F-167 и F-99 в концентрации 18 нг/мл (А) и 28 мкг/мл (Б) и к контролю от времени
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.3.5>

Примечание: 1, 3, 24 часа инкубации; * – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,01$, непараметрический U-тест

Обсуждение

Вероятно, при добавлении производных фуллеренов F-99 и F-167 к клеткам ФЛЭЧ в среду культивирования, данные соединения работают как акцепторы свободных радикалов на протяжении 3 часов, что можно отследить по уровню АФК. Однако уровень экспрессии NOX4 различается для этих соединений, как на уровне белка, так и на уровне гена в интервале 1-24 часа. Уровень транскрипционной активности NOX4 выше для F-99, чем для F-167 от 1 до 24 часов, а следовательно ферментный комплекс не только успевает синтезироваться в достаточном количестве, но и начинает активно функционировать, в связи с резким падением уровня АФК, что объясняет высокий уровень АФК после 24 часов при воздействии F-99.

Заключение

Исследованные водорастворимые производные фуллерена C_{60} с одной минорной заменой (метильного радикала на карбоксиметильный) активно участвуют в гомеостазе АФК в клетках ФЛЭЧ. Был изучен большой диапазон концентраций и выбраны две для каждого соединения – 18 нг/мл (концентрация, входящая в диапазон нетоксичных концентраций фуллеренов); и концентрация, близкая к повреждающей – 28 мкг/мл. При добавлении в среду культивирования клеток ФЛЭЧ *in vitro* соединения показали себя как эффективные антиоксиданты в первые 3 часа инкубации, наиболее эффективным антиоксидантом оказалось производное фуллерена F-167 в концентрации 18 нг/мл. Наблюдалось повышение уровня АФК через 24 часа культивирования ФЛЭЧ в присутствии исследуемого соединения F-99 связано с усилением транскрипционной активности гена NOX4, приводящей к увеличению экспрессии белка NOX4. Таким образом, данное исследование открывает новые перспективы использования фуллеренов и их производных и дает предпосылки к дальнейшему подробному изучению влияния на клетки человека.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект 22-43-08005).

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The study was supported by the Russian Science Foundation (project 22-43-08005).

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Yin R. Photodynamic therapy with decacationic [60] fullerene monoadducts: Effect of a light absorbing electron-donor antenna and micellar formulation / R. Yin, M. Wang, Y. Huang [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. — 2014. — № 4. — P. 795–808.
2. Raffaini G. A molecular dynamics study of a photodynamic sensitizer for cancer cells: Inclusion complexes of γ -cyclodextrins with C70 / G. Raffaini, F. Ganazzoli // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — № 20.
3. Zhou W. Aminated Fullerene Abrogates Cancer Cell Migration by Directly Targeting Myosin Heavy Chain 9 / W. Zhou, J. Huo, Y. Yang [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. — 2020. — № 12. — P. 56862–56873.
4. Serda M. Development of photoactive Sweet-C 60 for pancreatic cancer stellate cell therapy / M. Serda, M.J. Ware, J.M. Newton [et al.] // *Nanomedicine*. — 2018. — № 23. — P. 2981–2993.
5. Watanabe T. Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma / T. Watanabe, S. Nakamura, T. Ono [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2014. — № 1. — P. 93–100.
6. Friedman S.H. Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification / S.H. Friedman, D.L. DeCamp, G.L. Kenyon [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. — 1993. — № 115. — P. 6506–6509.
7. Voronov I.I. Synthesis and Antiviral Activity of Water-Soluble Polycarboxylic Derivatives of [60]Fullerene Loaded with 3,4-Dichlorophenyl Units / I.I. Voronov, V.M. Martynenko, A.V. Chernyak [et al.] // *Chem Biodivers*. — 2018. — № 11.
8. Hirayama J. Photoinactivation of vesicular stomatitis virus with fullerene conjugated with methoxy polyethylene glycol amine / J. Hirayama, H. Abe, N. Kamo [et al.] // *Biol Pharm Bull*. — 1999. — № 10. — P. 1106–1109.
9. Lyon D.Y. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size / D.Y. Lyon, L.K. Adams, J.C. Falkner [et al.] // *Environ Sci Technol*. — 2006. — № 14. — P. 4360–4366.
10. Tan Y. Facile construction of fluorescent C70-COOH nanoparticles with advanced antibacterial and anti-biofilm photodynamic activity / Y. Tan, Y. Ma, S. Fu [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2020. — № 234.
11. Shoji M. Correction: Anti-Influenza Activity of C 60 Fullerene Derivatives / M. Shoji, E. Takahashi, D. Hatakeyama [et al.] // *PLoS One*. — 2013. — № 6.
12. Cho M. Escherichia coli inactivation by UVC-irradiated C60: Kinetics and mechanisms / M. Cho, S.D. Snow, J.B. Hughes [et al.] // *Environmental Science & Technology*. — 2011. — № 22. — P. 9627–9633.
13. Mashino T. Inhibition of E. coli growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism / T. Mashino, K. Okuda, T. Hirota [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 1999. — № 20. — P. 2959–2962.
14. Tsao N. In vitro action of carboxyfullerene / N. Tsao, T.Y. Luh, C.K. Chou [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 2002. — № 4. — P. 641–649.
15. Äärelä A. Synthesis of Site-Specific Antibody-[60]Fullerene-Oligonucleotide Conjugates for Cellular Targeting / A. Äärelä, K. Räsänen, P. Holm [et al.] // *ACS Appl Bio Mater*. — 2023. — № 8. — P. 3189–3198.
16. Al-Anbari H.H. Investigating a nickel-decorated fullerene for adsorbing tespa anticancer: drug delivery assessments / H.H. Al-Anbari, Z.A.A. Mahdi, H. Zandi [et al.] // *Journal of Molecular Modeling*. — 2022. — № 12.
17. Wang I.C. C60 and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation / I.C. Wang, L.A. Tai, D.D. Lee [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 1999. — № 22. — P. 4614–4620.
18. Monti D. C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells / D. Monti, L. Moretti, S. Salvioli [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2000. — № 3. — P. 711–717.
19. Gharbi N. [60] Fullerene is an in vivo Powerful Antioxidant With no Acute or Sub-acute Toxicity / N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel [et al.] // *Nano Letters*. — 2005. — № 12. — P. 2578–2585.
20. Grebowski J. Fullerenol C60(OH)36 Protects the Antioxidant Enzymes in Human Erythrocytes against Oxidative Damage Induced by High-Energy Electrons / J. Grebowski, P. Kaźmierska-Grebowska, N. Cichoń [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — № 23. — 10939. — DOI: 10.3390/ijms231810939.
21. Kuznietsova H. Water-Soluble Pristine C60 Fullerenes Inhibit Liver Fibrotic Alteration and Prevent Liver Cirrhosis in Rats / H. Kuznietsova, N. Dziubenko, V. Hurmach [et al.] // *Oxid Med Cell Longev*. — 2020. — 8061246. — P. 14.
22. Vereshchaka I.V. C60 fullerenes diminish muscle fatigue in rats comparable to N-acetylcysteine or β -Alanine / I.V. Vereshchaka, N.V. Bulgakova, A.V. Maznychenko [et al.] // *Front Physiol*. — 2018. — № 9.

23. Xiao L. 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 / L. Xiao, H. Takada, K. Maeda [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2005. — № 7. — P. 351–358.
24. Proskurnina E.V. Effects of aqueous dispersions of c60, c70 and gd@c82 fullerenes on genes involved in oxidative stress and anti-inflammatory pathways / E.V. Proskurnina, I.V. Mikheev, E.A. Savinova [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2021. — № 11.
25. Bolshakova V.S. A regioselective step-by-step C60C16 functionalization approach affords a novel family of C60Ar5Th''H fullerene derivatives with promising antiviral properties / V.S. Bolshakova, O.A. Kraevaya, A.S. Peregudov [et al.] // *Chem. Commun*. — 2023. — № 59. — P. 3882–3885.