

## ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6:548.736.1:546.26—126

# ПАРАДОКСАЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ГИДРАТИРОВАННОГО C<sub>60</sub>-ФУЛЛЕРЕНА В СВЕРХНИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СТАРЕНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА

**О.И. Яблонская, Т.С. Рындина, В.Л. Воейков, А.Н. Хохлов**

(кафедра биоорганической химии, сектор эволюционной цитогеронтологии;  
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru)

Исследовали влияние водного раствора гидратированного C<sub>60</sub>-фуллерена (ГФ) на рост и “стационарное старение” (накопление “возрастных” изменений клеток при замедлении скорости размножения в пределах одного пассажа и дальнейшем их пребывании в стационарной фазе роста) трансформированных культивируемых клеток китайского хомячка линии B11-dii FAF28. Конечная расчетная концентрация ГФ в ростовой среде составляла 10<sup>-19</sup> М. Пара-доксально, но, в противоположность известным данным об отсутствии цитотоксичности ГФ в более высоких концентрациях, в наших экспериментах он замедлял размножение клеток (оцениваемое по росту массовой культуры, а также по эффективности колониеобразования) и ускорял процесс “стационарного старения” клеточной культуры. Более того, повторное добавление водного раствора ГФ до указанной расчетной концентрации к клеткам, уже находящимся в стационарной фазе роста, вызывало быструю (в течение не более чем 24 ч) гибель части клеточной популяции. Предполагается, что обнаруженные особенности действия ГФ в сверхмалой концентрации определяются особыми свойствами воды, окружающей молекулу фуллера, а именно тем, что она является своеобразным донором и акцептором электронов, обеспечивая упорядочение окислительно-восстановительных процессов, протекающих в водных системах, и особенно тех, в которых принимает участие кислород. Не исключено, что таким образом ГФ в сверхмалой концентрации влияет только на трансформированные клетки, так что в наших дальнейших исследованиях мы планируем повторить эксперименты на нормальных фибробластах, обладающих ограниченным митотическим потенциалом. Вполне возможно также, что выявленное другими исследователями геропротекторное действие ГФ на экспериментальных животных определяется его противоопухолевыми, иммуностимулирующими, антивирусными и антибактериальными свойствами, проявляющимися лишь на уровне целого организма.

**Ключевые слова:** гидратированный C<sub>60</sub>-фуллерен, сверхнизкие концентрации, клеточные культуры, жизнеспособность, “стационарное старение”, эффективность колониеобразования.

Фуллерены, наиболее типичным представителем которых является C<sub>60</sub>-фуллерен, обладают широким спектром биологического действия. Поскольку нативные фуллерены крайне гидрофобны, для получения их водных растворов используют различные подходы. Один из эффективных способов получения истинных растворов нативного C<sub>60</sub>-фуллерена без добавления солубилизирующих или стабилизирующих агентов предложен Г.В. Андриевским и соавт. [1]. В этих растворах, названных авторами FWS (Fullerene Water Solutions), молекулы фуллера присутствуют как единичные гидратированные фуллерены (ГФ), т.е. отдельные молекулы C<sub>60</sub>, покрыты устойчивой оболочкой из молекул воды [2]. ГФ, как и большинство химически модифицированных для повышения водорастворимости фуллеренов, не проявляет каких-либо признаков токсичности даже в самых высоких дозах [3, 4]. Исследования биологической активности

ГФ и его химически модифицированных аналогов показали, что они обладают антивирусным, антиамилоидным, антиаллергическим, противоопухолевым, гепатопротекторным и антиатеросклеротическим действием, а также стимулируют иммунитет [3, 5–6].

Одним из наиболее ярких эффектов фуллеренов является их влияние на продолжительность жизни мышей и крыс. Так, в 2008 г. американские исследователи сообщили о том, что потребление мышами водорастворимого трис-малонового производного C<sub>60</sub>-фуллера достоверно увеличивает продолжительность их жизни на 11% [7]. Недавно появилось сообщение об увеличении продолжительности жизни крыс почти вдвое по сравнению с контролем после перорального введения растворенного в оливковом масле нативного C<sub>60</sub>-фуллера [6].

Таким образом, складывается впечатление, что фуллерены оказывают ярко выраженное благотворное

действие на живые организмы, не проявляя токсичности даже в высоких концентрациях. С другой стороны, при исследовании действия нативного и модифицированных фуллеренов на культивируемые клетки были получены неоднозначные результаты. Так, нативный  $C_{60}$ -фуллерен не оказывал токсического действия на культивируемые нормальные и трансформированные клетки человека в дозах до 0,2 мг/мл [8]. В то же время сообщалось об индукции модифицированными водорастворимыми фуллеренами апоптоза опухолевых мышных клеток трех разных линий при освещении [9]. Было также обнаружено, что  $C_{60}$ -фуллерен ускоряет индуцированную УФ или видимым светом гибель трансформированных Т-клеток, но не нормальных тимоцитов, причем эффект является дозозависимым в интервале концентраций препарата от 25 до 100 мкМ [10].

Как нативный  $C_{60}$ -фуллерен, например ГФ, так и его производные демонстрируют в водных средах своеобразную химическую активность: с одной стороны, их можно рассматривать как сильные антиоксиданты [11], с другой — как активаторы кислорода, т.е. прооксиданты [9], а в целом — как регуляторы свободнорадикальных реакций. При этом активность фуллеренов носит каталитический характер. ГФ может оказывать влияние на биохимические процессы [12] и свободнорадикальные реакции, протекающие *in vitro*, в очень малых [13] и сверхмалых концентрациях. Нами было обнаружено влияние ГФ уже в исчезающе малых концентрациях (вплоть до  $10^{-19}$ — $10^{-21}$  М) на активность и стабильность ряда ферментов в водных растворах, а также на свободнорадикальные процессы, протекающие в цельной крови человека или в водных растворах бикарбонатов [14].

Для выяснения возможных цитологических механизмов, лежащих в основе перечисленных проявлений биологической активности фуллеренов, в настоящей работе мы исследовали ГФ в экспериментах на культивируемых трансформированных клетках китайского хомячка, используя несколько модельных систем, применяемых нами в последние несколько десятилетий в цитогеронтологических исследованиях потенциальных геропротекторов и гепропромоторов [15—24].

## Материалы и методы

Исходный водный раствор ГФ ( $C_{60}$ FWS) с концентрацией 14,4 мг/мл (20 мкМ) приобретали у разработчика и изготовителя (Институт физиологически активных соединений, г. Харьков, Украина). Раствор содержал ГФ, полученный по методу, разработанному Г.В. Андриевским с соавт. [25]. Из этого раствора, используя деионизированную воду, нестерильно готовили запасные (маточные) растворы с концентрацией ГФ 0,1 мкМ. Запасные растворы ГФ и дистиллированную воду для последующего их разведения стерилизовали путем автоклавирования.

Для изучения действия на культивируемые клетки ГФ в сверхмалой расчетной концентрации  $10^{-19}$  М в ростовую среду в отношении 1:100 вносили раствор ГФ с расчетной концентрацией  $10^{-17}$  М, который получали из маточного стерильного раствора методом последовательных сотенных разведений. Для этого 30 мкл стерильного  $10^{-7}$  М ГФ добавляли к 3 мл стерильной воды. Далее смесь взбалтывали и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Ту же процедуру повторяли для приготовления каждого разведения до получения стерильного  $10^{-17}$  М водного раствора ГФ. Такие последовательные разведения ГФ всегда проводили за 1 сут до опыта (полученный  $10^{-17}$  М раствор хранили при 4°C).

При изучении биохемилюминесценции цельной крови человека венозную кровь здоровых доноров (10 мл) отбирали в пластиковые пробирки, в которых содержалось 0,1 мл гепарина (1000 МЕ). Кровь получали между 9-00 и 10-00 утра и использовали не ранее 1 ч и не позднее 3 ч после забора. В течение этого периода ее хранили в пластиковых пробирках в темноте при 20—25°C. Для измерения биохемилюминесценции использовали хемилюминометр “Биотокс 7А” (АНО “Инженерный центр-экология”, Россия), оснащенный фотоумножителем 9750QB/1 (EMI Electronics, США) с диаметром фотокатода 5 см (температурный ток около 25 имп./с, спектральная чувствительность — в диапазоне 380—710 нм, максимальная чувствительность — в области 450 нм). В порцию крови (200 мкл) в микропробирке типа “Эппendorф” вносили 5 мкл раствора ГФ ( $10^{-17}$  М) или физиологического раствора, а через 3 мин инкубации — 10 мкл раствора люцигенина (нитрат бис-N-метилакрилония, Sigma, США), приготовленного на дистиллированной воде, до конечной концентрации 50 мкМ — и сразу регистрировали излучение в течение 300 с. Интенсивность излучения измеряли в импульсах в секунду с дискретой 1 с.

Трансформированные клетки китайского хомячка линии B11-dii FAF28 (клон 237), полученные из Медико-генетического научного центра РАМН (г. Москва), культивировали в стеклянных флаконах Карреля, используя среду Игла в модификации Дульбекко (ДМСИ, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, г. Москва) с добавлением 5—10% сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС, “Биолот”, г. Санкт-Петербург), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Поддерживая культуру, клетки пересевали в соотношении 1:10—1:3 через 3—4 сут. Для снятия клеток с флаконов использовали смесь (1:1) 0,02%-го версена и 0,25%-го трипсина (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, г. Москва).

В предварительных исследованиях, направленных на определение цитотоксических или митогенных свойств ГФ в сверхмалой концентрации (ГФСМК), клетки 2—3-дневного “возраста” (т.е. выращиваемые без пересева в течение 2—3 сут) засевали в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы пло-

щадью 2,83 см<sup>2</sup> с плотностью около 40 тыс. кл./см<sup>2</sup> (сuspензия в 1 мл ростовой среды, состоящей из 90% ДМСИ и 10% СКРС). В часть флаконов добавляли 10 мкл раствора ГФ до конечной расчетной концентрации ГФ в среде 10<sup>-19</sup> М. В контрольные флаконы добавляли соответствующее количество дистиллированной воды (также 10 мкл на 1 мл среды). Добавление ГФ и воды проводили после 1,5 ч культивирования при 37°C. Флаконы помещали на 4–5 сут в термостат (37°C), после чего клетки снимали с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина и подсчитывали их количество с помощью камер Горяева (5–6 флаконов на точку, 4 камеры на флакон). Перед подсчетом все флаконы шифровали.

Изучая влияние ГФ на кинетику роста клеток и их последующей гибели в стационарной фазе роста, клетки 5-дневного “возраста” снимали с поверхности флакона Кэрреля смесью растворов версена и трипсина, супензировали в ростовой среде (90% ДМСИ и 10% СКРС), разводили средой до необходимой концентрации клеток и сеяли по 1,5 мл супензии в 120 герметично закрывающихся пеницилловых флаконов площадью 4,15 см<sup>2</sup> (плотность посева — около 40 тыс. кл./см<sup>2</sup>). Все флаконы помещали в термостат (37°C). Через сутки после посева с помощью смеси растворов версена и трипсина снимали клетки со дна 4 флаконов и подсчитывали их количество в камере Горяева, чтобы определить плотность прикрепившихся клеток. После этого через определенные промежутки времени извлекали из термостата 4 флакона, клетки снимали с поверхности роста смесью версена и трипсина, супензировали в ростовой среде без СКРС и оценивали количество клеток в каждом флаконе с помощью 4 камер Горяева. Перед подсчетом все флаконы шифровали.

Через 7 сут после посева в половину оставшихся флаконов добавляли по 15 мкл раствора ГФ до конечной расчетной концентрации 10<sup>-19</sup> М, а в другую половину — по 15 мкл дистиллированной воды, после чего продолжали культивирование клеток, периодически извлекая из термостата по 3 контрольных и 3 опытных флакона, в которых оценивали количество клеток по вышеописанной схеме.

Через 16 сут после посева в 9 из оставшихся контрольных флаконов добавляли по 15 мкл раствора ГФ до конечной расчетной концентрации 10<sup>-19</sup> М, а в другие 9 контрольных флаконов — по 15 мкл дистиллированной воды. Кроме того, в 9 опытных флаконов вторично добавляли по 15 мкл раствора ГФ до конечной расчетной концентрации 10<sup>-19</sup> М. Все флаконы возвращали в термостат и продолжали культивирование клеток, периодически извлекая из термостата по 2–3 флакона каждой серии, в которых оценивали количество клеток по вышеописанной схеме.

В самом конце этого эксперимента (через 42 сут после посева), когда осталось только три опытных (однократное добавление ГФ) и два контрольных (од-

нократное добавление воды) флакона, клетки для подсчета отобрали стерильно, супензировав их в свежей ростовой среде с СКРС, после чего, оставив в каждом флаконе по 1,5 мл супензии, вернули их в термостат. Через 4 сут стандартным образом подсчитали количество клеток в каждом из 5 флаконов.

Наконец, исследуя влияние ГФ на эффективность колониеобразования, клетки 2-дневного “возраста” снимали с поверхности флакона Кэрреля смесью растворов версена и трипсина, супензировали и разводили полученную супензию сначала в обычной ростовой среде с СКРС, а затем (последнее разведение) в среде, состоявшей из 90% ДМСИ и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FetalClone® III, HyClone, США), до необходимой концентрации клеток. После этого сеяли по 2,5 мл супензии в 10 пластиковых чашек Петри (Nunclon™, Nunc, Дания) диаметром 35 мм (250 клеток на чашку). Чашки помещали в термостат (37°C, 5%-й CO<sub>2</sub>). Через 1,5 ч в 5 чашек вводили по 25 мкл раствора ГФ до конечной расчетной концентрации 10<sup>-19</sup> М, а в другие 5 чашек — по 25 мкл дистиллированной воды (контроль). Затем чашки возвращали в термостат. Через 7 сут их извлекали и фиксировали клеточные колонии 75%-м спиртом (7 мин), после чего окрашивали 0,1%-м водным раствором метиленового синего (3 мин) и подсушивали чашки на воздухе. Затем с помощью микроскопа подсчитывали количество клеток в колониях, образовавшихся на каждой чашке.

Распределение колоний по размерам строили, разбивая результаты на 17 классов, определяемых количеством клеток в колонии: 1–15, 16–31, 32–47, ..., 240–255, 256 и более. Таким образом, размеры всех классов, кроме первого и последнего, были одинаковыми и составляли 16 клеток. Средневзвешенный номер класса (СВНК) для каждого распределения рассчитывали по формуле

$$\text{СВНК} = \sum_{i=1}^n \left( \frac{C_i}{M} \cdot i \right),$$

где *i* — номер класса, *n* — количество классов, *C<sub>i</sub>* — количество колоний в классе *i*, *M* — общее количество колоний. Чем меньше СВНК, тем меньше в популяции доля больших колоний. Использование этого показателя позволяет оценить тонкие изменения пролиферативной активности клеток даже при неизменной эффективности колониеобразования (ЭКО).

ЭКО рассчитывали по формуле

$$\text{ЭКО} = \frac{K}{N} \cdot 100\%,$$

где *N* — количество посевенных клеток, а *K* — количество выросших колоний.

Математические расчеты и статистическую обработку результатов производили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и SigmaPlot 12.

## Результаты и обсуждение

Как следует из данных, представленных на рис. 1, люцигенин-зависимая биохемилюминесценция крови возрастает в одинаковой степени в ответ на внесение в нее ГФСМК независимо от того, подвергается или нет автоклавированию запасной раствор ГФ ( $10^{-7}$  M), из которого путем последовательных разведений готовят ГФСМК. В связи с этим мы заключили, что автоклавирование запасного раствора не влияет на биологическую активность ГФСМК, и в дальнейших цитологических экспериментах использовали именно этот способ стерилизации растворов ГФ. Однако каждый раз мы проводили процедуру автоклавирования и разведения запасного раствора за сутки до эксперимента, ибо, как оказалось, подвергнутый автоклавированию раствор

ГФ полностью утрачивает свою активность, оцениваемую по его влиянию на биохемилюминесценцию цельной крови, через 20 сут хранения даже в ходильнике.

В предварительных исследованиях, направленных на поиск цитотоксических или митогенных

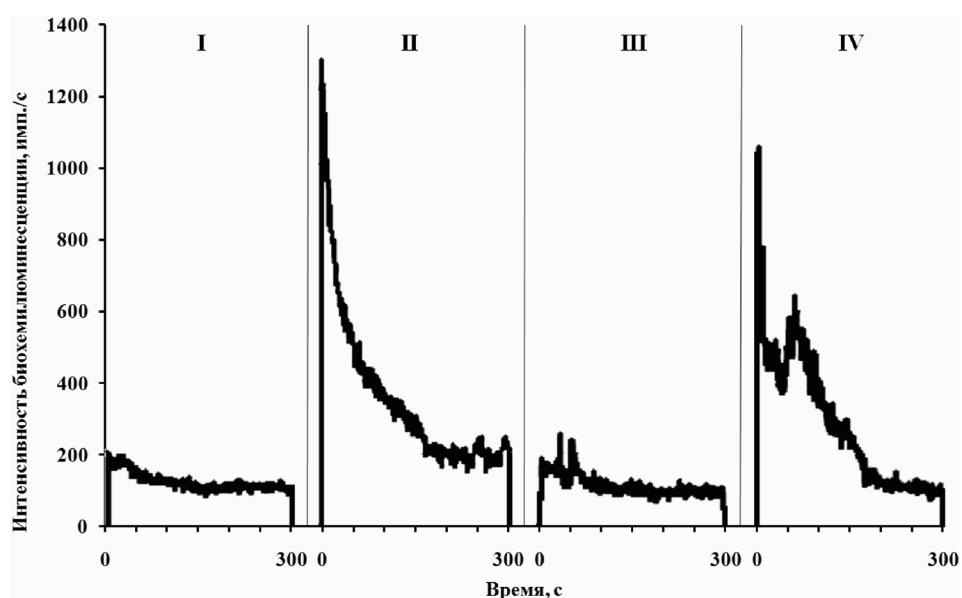


Рис. 1. Сравнение биохемилюминесценции цельной крови в присутствии нативного или подвергнутого автоклавированию ГФ: I — контроль, в котором к цельной крови добавлен физиологический раствор; II — к цельной крови добавлен раствор ГФ в физиологическом растворе до расчетной концентрации  $2,5 \cdot 10^{-19}$  M (раствор ГФ приготовлен из свежего маточного  $10^{-7}$  M ГФ); III — контроль, в котором к цельной крови добавлен подвергнутый автоклавированию физиологический раствор; IV — к цельной крови добавлен раствор ГФ в физиологическом растворе до расчетной концентрации  $2,5 \cdot 10^{-19}$  M (раствор приготовлен из подвергнутого автоклавированию маточного  $10^{-7}$  M ГФ)

свойств ГФСМК, мы изучили действие  $10^{-19}$  M ГФ, введенного через 1,5 ч после посева, на пролиферативную активность изучаемых клеток. Такую концентрацию мы выбрали в связи с тем, что ранее [14] уже продемонстрировали активность ГФ в этой концентрации на нескольких модельных системах. Как

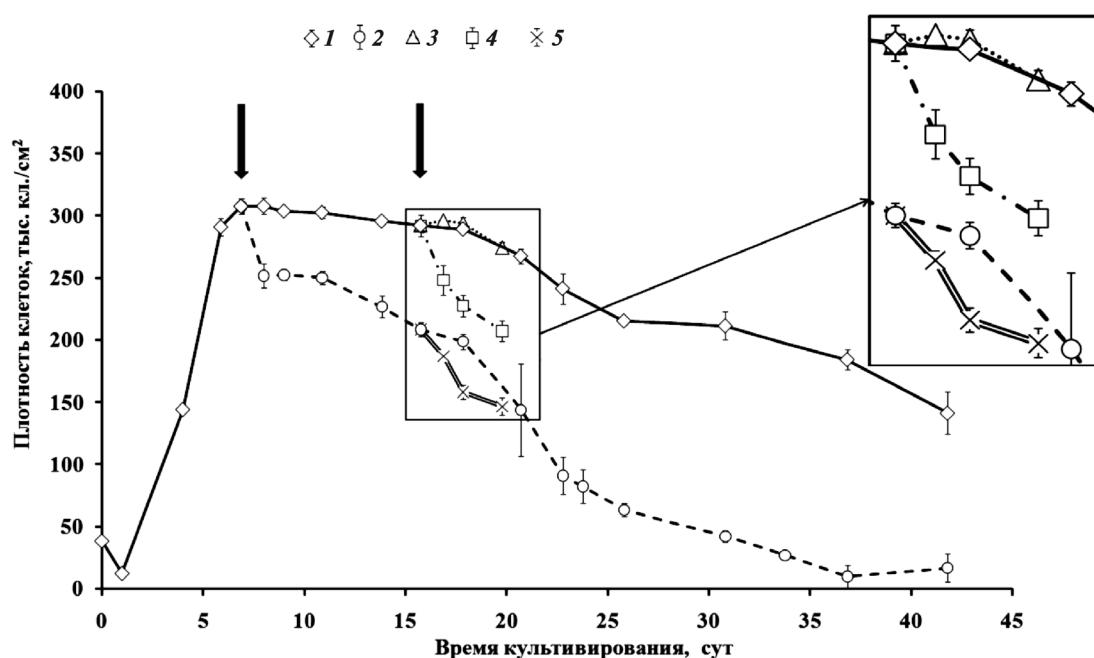


Рис. 2. Влияние ГФ в расчетной концентрации  $10^{-19}$  M на кинетику “стационарного старения” культуры трансформированных клеток китайского хомячка: 1 — контроль; 2 — ГФ; 3 — контроль, к которому повторно добавили воду; 4 — контроль, к которому добавили ГФ; 5 — опытные образцы, к которым повторно добавили ГФ. Вертикальными стрелками показано время добавления воды/ГФ.

Приведены стандартные ошибки среднего

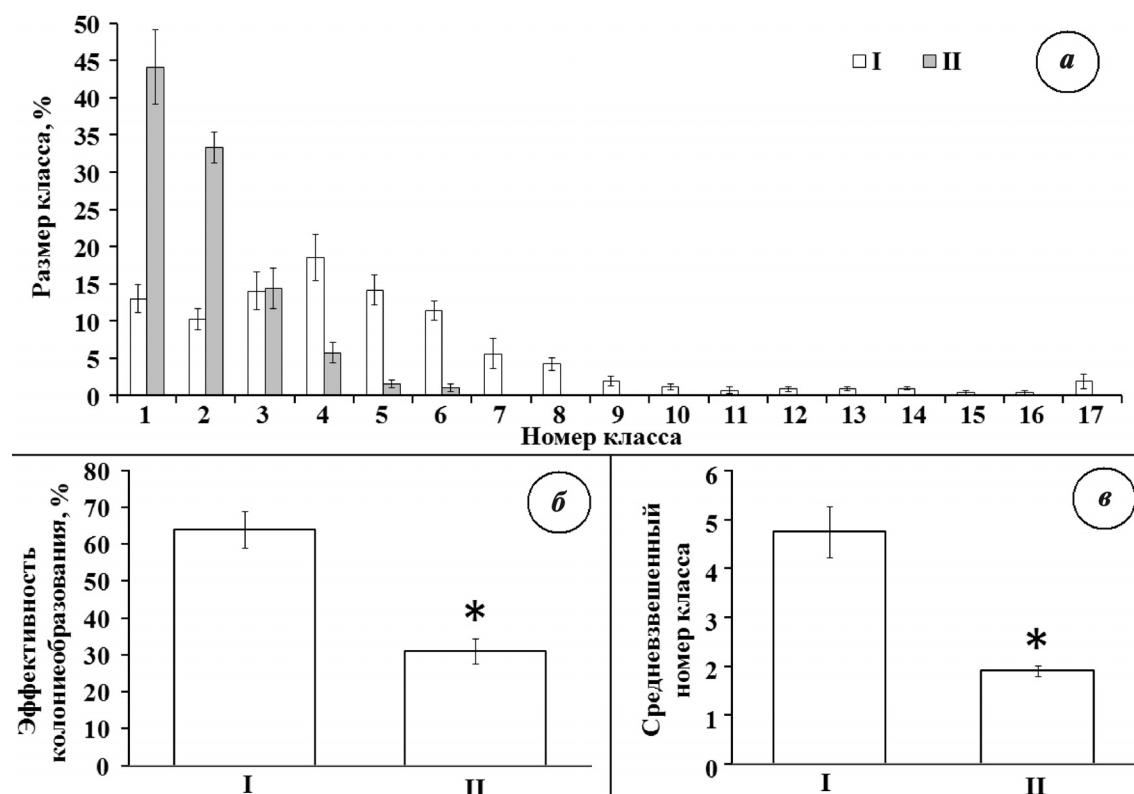


Рис. 3. Влияние ГФ в расчетной концентрации  $10^{-19}$  М на способность трансформированных клеток китайского хомячка к образованию колоний (I — контроль, II — ГФ): а — влияние ГФ на распределение колоний по размеру; б — влияние ГФ на эффективность образования колоний (учитывали только колонии, состоящие из 16 и более клеток); в — влияние ГФ на средневзвешенный номер класса распределения по размерам колоний. Приведены стандартные ошибки среднего, \* — различия с контролем достоверны ( $p < 0,001$ )

ни парадоксально, но в наших экспериментах ГФСМК проявлял очевидную цитотоксичность: через 4–5 сут после посева плотность клеток в опытных флашонах была достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в контроле.

В связи с этими данными представляло интерес выяснить, каким образом ГФСМК может повлиять на “старение” культивируемых клеток в стационарной фазе роста (подробное описание модельной системы см. в [16, 19–22]). Вышеупомянутые результаты предварительных экспериментов позволяли предполагать, что ГФСМК может не замедлять (что могло бы быть вполне оправданным, если принимать во внимание многочисленные данные литературы, рассмотренные во введении), а ускорять этот процесс. На рис. 2 представлены результаты изучения влияния ГФ в расчетной концентрации  $10^{-19}$  М на кинетику гибели трансформированных клеток китайского хомячка в модели “стационарного старения”, предполагающей сходство изменений, которые претерпевают культивируемые клетки при ограничении их пролиферации вследствие контактного торможения, с изменениями клеток стареющего организма. Видно, что введение ГФСМК на 7-е сут культивирования резко ускоряет процесс “стационарного старения”, что свидетельствует об увеличении “биологического возраста” клеток. Более того, повторное добавление водного раствора ГФ до указанной расчетной концентрации к клеткам, уже довольно долго

находящимся в стационарной фазе роста (на 16-е сут культивирования), опять вызывало быструю (в течение не более чем 24 ч) гибель части клеточной популяции.

Посев 42-дневных клеток в свежую среду показал, что в этом “возрасте” и в контрольных, и в опытных флашонах очень велика дисперсия способности культуры к размножению, однако с очевидностью в контроле сохраняется гораздо большее количество пролиферирующих клеток.

И, наконец, из данных, представленных на рис. 3, видно, что жизнеспособность изученных клеток, определяемая по их способности к колониеобразованию (с помощью оценки как ЭКО, так и СВНК), уменьшается под влиянием ГФ в расчетной концентрации  $10^{-19}$  М.

Можно полагать, что обнаруженные особенности действия ГФСМК определяются особыми свойствами воды, окружающей молекулу фуллерена, а именно тем, что она является своеобразным донором и акцептором электронов, обеспечивая упорядочение окислительно-восстановительных процессов, протекающих в водных системах, и особенно тех, в которых принимает участие кислород. Не исключено, что таким образом ГФСМК влияет только на трансформированные клетки, так что в наших дальнейших исследованиях мы планируем повторить эксперименты на нормальных фибробластах, обладающих ограни-

ченным митотическим потенциалом. Вполне возможно также, что выявленное другими исследователями геропротекторное действие ГФ на экспериментальных животных определяется его противоопухолевыми, иммуностимулирующими, антивирусными и антибакте-

риальными свойствами, проявляющимися лишь на уровне целого организма.

Авторы выражают благодарность Г.В. Андриевскому за обсуждение полученных результатов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. Are fullerenes soluble in water? // Recent advances in the chemistry and physics of fullerenes and related materials. Proc. 187<sup>th</sup> Meeting of the Electrochemical Society, 16–21 May 1995 / Eds. R.S. Ruoff, K.M. Kadish. Reno: The Electrochem. Soc. Inc., 1995. P. 1591–1602.
2. Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Bordyuh A., Dovbeshko G.I. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C-60 fullerene with help of FTIR reflectance and UV-Vis spectroscopy // Chem. Phys. Lett. 2002. Vol. 364. N 1. P. 8–17.
3. Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Derevyanchenko L.I. Is C<sub>60</sub> fullerene molecule toxic?! // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2005. Vol. 13. N 4. P. 363–376.
4. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives // Adv. Exp. Med. Biol. 2007. Vol. 620. P. 168–180.
5. Bakry R., Vallant R.M., Najam-ul-Haq M., Rainer M., Szabo Z., Huck C.W., Bonn G.K. Medicinal applications of fullerenes // Int. J. Nanomedicine. 2007. Vol. 2. N 4. P. 639–649.
6. Baati T., Bourasset F., Gharbi N., Njim L., Abderrabba M., Kerkeni A., Szwarc H., Moussa F. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene // Biomaterials. 2012. Vol. 33. N 19. P. 4936–4946.
7. Quick K.L., Ali S.S., Arch R., Xiong C., Wozniak D., Dugan L.L. A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice // Neurobiol. Aging. 2008. Vol. 29. N 1. P. 117–128.
8. Levi N., Hantgan R.R., Lively M.O., Carroll D.L., Prasad G.L. C<sub>60</sub>-fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects // J. Nanobiotechnol. 2006. Vol. 4. N 14. P. 14–25.
9. Mroz P., Pawlak A., Satti M., Lee H., Wharton T., Gali H., Sarna T., Hamblin M.R. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism // Free Radic. Biol. Med. 2007. Vol. 43. N 5. P. 711–719.
10. Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Palivoda K.O., Matyshevska O.P. Photoinduced cytotoxic effect of fullerenes C<sub>60</sub> on transformed T-lymphocytes // Exp. Oncol. 2010. Vol. 32. N 1. P. 29–32.
11. Ali S.S., Hardt J.I., Quick K.L., Kim-Han J.S., Erlanger B.F., Huang T.T., Epstein C.J., Dugan L.L. A biologically effective fullerene (C<sub>60</sub>) derivative with superoxide dismutase mimetic properties // Free Radic. Biol. Med. 2004. Vol. 37. N 8. P. 1191–1202.
12. Andrievsky G., Shakhnin D., Tronza A., Zhernosekov D., Tykhomirov A. The acceleration of blood plasma clot lysis in the presence of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures in super-small concentration // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2010. Vol. 18. N 3. P. 303–311.
13. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomirov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures in vitro and in vivo // Free Radic. Biol. Med. 2009. Vol. 47. N 6. P. 786–793.
14. Yablonskaya O.I., Voeikov V.L., Vilenskaya N.D., Malishenko S.I., Novikov K.N. Effects of hydrated fullerenes on the luminescence of bacterial luciferase, of whole blood and of bicarbonate water solutions // Luminescence. 2012. Vol. 27. N 2. P. 175.
15. Чиркова Е.Ю., Головина М.Э., Наджарян Т.Л., Хохлов А.Н. Клеточно-кинетическая модель для изучения геропротекторов и геропромоторов // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. N 6. С. 1474–1476.
16. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНИТИ АН СССР. Сер. “Общие проблемы физико-химической биологии”. Т. 9. М.: ВИНИТИ, 1988. 176 с.
17. Khokhlov A.N., Prokhorov L.Yu., Ivanov A.S., Archakov A.I. Effects of cholesterol- or 7-ketocholesterol-containing liposomes on colony-forming ability of cultured cells // FEBS Lett. 1991. Vol. 290. N 1–2. P. 171–172.
18. Khokhlov A.N. The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies // Biomarkers of aging: expression and regulation. Proceeding / Eds. F. Licastro, C.M. Calderara. Bologna: CLUEB, 1992. P. 209–216.
19. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475–476.
20. Khokhlov A.N. Cytogerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // Russ. J. Dev. Biol. 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.
21. Khokhlov A.N. In search of “gist” cytogerontological models // Longevity, aging and degradation models in reliability, public health, medicine and biology. Vol. 1 / Eds. V. Antonov, C. Huber, M. Nikulin, V. Polischook. St. Petersburg: SPbSPU, 2004. P. 84–92.
22. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
23. Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // Russ. J. Gen. Chem. 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
24. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
25. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995. N 12. P. 1281–1282.

## A PARADOXICAL EFFECT OF HYDRATED C<sub>60</sub>-FULLERENE AT ULTRA-LOW CONCENTRATION ON THE VIABILITY AND AGING OF CULTURED CHINESE HAMSTER CELLS

O.I. Yablonskaya, T.S. Ryndina, V.L. Voeikov, A.N. Khokhlov

Hydrated fullerene (HyFn) is the molecule of C<sub>60</sub>-fullerene (C<sub>60</sub>) encased in a stable shell of water molecules, providing hydrophilic properties to this complex and its solubility in aqueous solutions. HyFn, as well as chemically modified fullerenes and fullerenes solubilized in water in other ways, is known to have a broad spectrum of biological activities both *in vivo* and *in vitro* with no signs of toxicity. HyFn and various chemically modified fullerenes in aqueous environment exhibit a peculiar chemical activity — on the one hand, they can be regarded as strong antioxidants, on the other hand — as electron donors for oxygen, i.e. prooxidants. Given that C<sub>60</sub> is not very active chemically and that in HyFn it is surrounded by a water shell, it could be assumed that the entire pattern of HyFn activity is due to unique properties of the water shell formed around C<sub>60</sub>. There are also some evidences of influence of HyFn at ultra-low concentrations on biochemical processes and free-radical reactions occurring *in vitro*. Previously, we have shown the effect of HyFn at ultra-low concentrations on redox processes in human whole blood as well as in aqueous bicarbonate solutions. In the present study we investigated effect of HyFn aqueous solution on the growth and “stationary phase aging” (accumulation of “age” changes in cultured cells during cell proliferation slowing down within a single passage and subsequent “aging” in the stationary phase of growth) of transformed B11-dii FAF28 Chinese hamster cells. The final calculated concentration of HyFn in the growth medium after serial dilutions of its original solution was equivalent to 10<sup>-19</sup> M. It is paradoxical, but, in contrast to the known data about absence of HyFn cytotoxicity at higher concentrations, in our experiments it inhibited cell proliferation and accelerated the process of “stationary phase aging” of the cell culture. Moreover, secondary addition of HyFn aqueous solution at this calculated concentration to the cells that had already reached the stationary phase of growth caused a rapid (within no more than 24 h) death of a significant part of the cell population. Perhaps, the observed features of HyFn at ultra-low concentration are determined by some special properties of the water surrounding C<sub>60</sub>, namely, its ability to serve as an electron donor and acceptor regulating redox processes in aqueous systems, especially those in which oxygen is involved. At the moment we cannot rule out the possibility that HyFn at ultra-low concentrations affect transformed cells only. Therefore in our further studies we plan to carry out the similar experiments on normal fibroblasts possessing limited mitotic potential. Probably, the anti-aging effect of fullerenes revealed by other researchers in experimental animals is related to their antitumor, antiviral, immunopotentiating, and antibacterial activities which manifest themselves only at the level of the whole organism.

**Key words:** hydrated C<sub>60</sub>-fullerene, ultra-low concentrations, cell cultures, viability, “stationary phase aging”, colony-forming ability.

### Сведения об авторах

**Яблонская Ольга Игоревна** — аспирантка кафедры биоорганической химии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-68; e-mail: olga.yablonsky@gmail.com

**Рындина Татьяна Сергеевна** — магистрант сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: ryndina.tatyana@gmail.com

**Воейков Владимир Леонидович** — докт. биол. наук, проф. кафедры биоорганической химии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-68; e-mail: v109028v1@yandex.ru

**Хохлов Александр Николаевич** — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru