

М. Ю. Еропкина¹, Е. Ю. Меленевская², К. В. Насонова², Т. С. Брызжикова¹,
Е. М. Еропкина¹, Д. М. Даниленко¹, О. И. Киселев¹

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУЛЛЕРЕНОЛОВ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП

¹ ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Получены полигидроксифуллерены — фуллеренолы с различным содержанием гидроксильных групп — $C_{60}(OH)_{12-14}$, $C_{60}(OH)_{18-24}$ и $C_{60}(OH)_{30-38}$. Первый из них нерастворим в воде и не обладает биологической активностью, будучи внесен в клеточные культуры в виде суспензии. Два других варианта фуллеренола обладают широким спектром противовирусной активности *in vitro* в отношении актуальных вирусов гриппа человека А(Н1N1), А(Н3N2) и вируса гриппа птиц А(Н5N1), вирусов простого герпеса, аденовируса и респираторно-синцитиального вируса. Водорастворимые варианты фуллеренолов нетоксичны *in vitro* в отношении клеток человека и животных различного тканевого происхождения. Кроме противовирусной активности фуллеренолы обладают защитным эффектом против индуцированной УФ фототоксичности. Максимальная биологическая активность по всем изученным параметрам отмечена у варианта фуллеренола $C_{60}(OH)_{18-24}$. Растворимые биологически активные варианты фуллеренола могут найти применение в фармакологии, так как могут служить основой новых эффективных и нетоксичных противовирусных и цитопротекторных лекарственных средств.

Ключевые слова: фуллеренолы; противовирусная активность; УФ-защитное действие; культуры клеток.

Фуллерены были первой исследованной наноформой углерода (диаметр молекулы C_{60} — около 0,7 нм). Наибольший интерес для возможного биомедицинского применения представляют их следующие свойства: 1) способность генерировать синглетный кислород при облучении УФ- или видимым светом; 2) высокая аффинность фуллеренового кора к донорам электронов, определяющая его способность быть скэвенджером электронов; 3) высокая липофильность фуллеренов [1]. В то же время немодифицированные или “простые” фуллерены нерастворимы в воде, а, следовательно, имеют низкую биодоступность, имеют тенденцию к образованию агрегатов и почти не выводятся из организма. “Функционализация” фуллеренов, т.е. их химическая модификация группами и молекулами различной степени сложности, является распространенным способом преодоления этих недостатков “простых” фуллеренов [2].

Одними из наиболее простых производных фуллеренов являются гидроксифуллерены или фуллеренолы $C_{60}(OH)_x$, где x может колебаться от 4–6 до 40–44 [3]. Фуллеренолы являются мощными антиоксидантами прямого действия (ловушками свободных радикалов) как *in vitro*, так и *in vivo*, обладают защитным действием от ионизирующей радиации, УФ-облучения, антимуtagenным, противоопухолевым и антиметастатическим эффектами [4–10].

Ранее изучалось противовирусное действие фуллерена C_{60} в виде комплекса с поливинилпирролидоном (ПВП), а также микронизированной с помощью ультразвука суспензии C_{60} на вирусы гриппа [3, 11, 12]. Комплекс C_{60} /ПВП обладал противовирусной активностью в темноте, причем сам полимер-носитель ПВП противовирусной активности не проявлял, а микронизированная суспензия C_{60} , наоборот, была эффективна только при интенсивном освещении видимым светом

и в присутствии избытка кислорода. Среди функционализированных производных C_{60} противовирусная активность обнаружена у трикарбоксифуллеренов в отношении вируса Денге-2 и вируса японского энцефалита, Na-соли 1-гидрофуллеренаминокапроновой кислоты в отношении ВИЧ и вируса герпеса [3, 13, 14]. Что касается фуллеренолов, то об их противовирусном действии ранее не сообщалось.

Задачей настоящей работы было исследование возможного противовирусного эффекта *in vitro* фуллеренолов с различным содержанием гидроксильных групп в отношении ряда актуальных вирусов гриппа, герпеса, адено- и РС-вирусов из коллекции вирусов НИИ гриппа, а также их биологического действия на клетки в культуре в темноте и при УФ-освещении.

Экспериментальная химическая часть

Гидроксифуллерен $C_{60}(OH)_{18-24}$ [15, 16]. В стакан, снабженный мешалкой, помещают 100 мл раствора фуллерена C_{60} (150 мг C_{60}) (“ООО Фуллереновые технологии”, С.-Петербург) в *o*-ксилоле или толуоле. При интенсивном перемешивании (на магнитной мешалке) добавляют 100 мл NaOH (50 % раствор), затем по каплям прибавляют 2 мл межфазного катализатора тетрабутиламмоний гидроксида (ТБАГ).

Реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч в присутствии кислорода воздуха. Через 2 сут образуются 3 слоя: верхний — слабо окрашенный (светло-желтый) органический слой; нижний — водный слой концентрированного раствора щелочи и промежуточный темно-коричневый эмульсионный слой, содержащий гидроксильные продукты. Основную часть органического слоя декантируют. Для улучшения растворимости образующихся продуктов порциями добавляют дистиллированную воду (50 мл в 1 сут)

Таблица 1
Защитный эффект от УФ клеток L-41 в присутствии фуллеренов в концентрации 100 мкг/мл, отличие в % от соответствующих контролей без фуллеренола

Соединение	Темновой контроль	УФ-облучение, мин		
		2,5	5	10
C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₄	97,0 ± 1,7	104,7 ± 3,3	122,4 ± 0,6*	183,6 ± 2,9*
C ₆₀ (OH) ₃₀₋₃₈	101,1 ± 3,6	105,9 ± 2,4	105,7 ± 2,9	119,0 ± 5,8*
C ₆₀ (OH) _{12-14#}	92,0 ± 3,2*	94,4 ± 9,6	94,3 ± 9,5	99,2 ± 9,2

* — достоверное отличие от контроля ($p < 0,01$); # — соединение не-растворимо, добавлялась суспензия фуллеренола.

и продолжают перемешивание еще в течение 2 сут, что приводит к переходу водорастворимых продуктов в водно-щелочной слой и окрашиванию его в темно-коричневый цвет. Затем реакцию смесь переносят в круглодонную колбу (объемом 1 л) и добавляют 200 мл воды. Водно-органический раствор отгоняют на ротационном испарителе (до остаточного объема — 40 – 50 мл). Процедуру повторяют до полного удаления органического растворителя.

Для проведения диализа полученный продукт нейтрализуют соляной кислотой до pH ≈ 7,2 – 7,5 (по индикаторной бумаге).

Диализ через полупроницаемую мембрану проводят в течение 3 сут со сменой диализной воды каждые 3 – 5 ч. В результате диализа образовывается водорастворимый продукт (окрашен в коричневый цвет) и малорастворимый осадок темно-коричневого цвета. Основной продукт смывают с мембраны в колбу, декантируют от осадка и (после отбора пробы для анализа) сушат лиофильно.

Гидроксифуллерен C₆₀(OH)₃₀₋₃₈. К раствору фуллерена C₆₀ в ксилоле (200 мг в 100 мл) добавляют 10 мл 50 % раствора щелочи, 5 мл воды, 3 мл межфазного катализатора ТБАГ и 10 капель 30 % перекиси водорода. Реакционную смесь обрабатывают ультразвуком в УЗ-ванне в течение 1 ч. Полученный раствор переносят в стакан, снабженный мешалкой. После перемешивания в течение нескольких часов органический слой обесцвечивается. Добавляют еще 50 мл

воды и отбирают органический слой. Остаточный растворитель удаляют на ротационном испарителе, как описано выше. Осадок несколько раз промывают метанолом. Конечный продукт получают лиофильной сушкой из водного раствора.

Гидроксифуллерен C₆₀(OH)₁₂₋₁₄ [17]. В этом случае используют 1 % раствор щелочи и реакцию проводят в течение 2 ч. Удаляют органический слой, содержащий непрореагировавший фуллерен. Осаждают нужную фракцию метанолом. Центрифугируют осадок и промывают несколько раз метанолом для удаления щелочи. Из осадка гидроксифуллерены с большим числом гидроксильных групп отмывают водой, а непрореагировавший фуллерен — толуолом. Конечный продукт получают выпариванием досуха водного раствора.

Все фуллеренолы были охарактеризованы методом элементного анализа, спектральными методами и термогравиметрически. Элементный анализ (С и Н и О по разности) может иметь завышенные значения содержания Н и О из-за высокого содержания влаги в этих соединениях. Это было подтверждено методом протонного ЯМР в твердом теле, где гидроксифуллерены характеризовались сигналом при 4,77 м. д., соответствующим молекулам воды во внешних сферах гидратации.

ИК-спектры гидроксифуллеренов характеризовались интенсивной полосой поглощения в области 3360 см⁻¹ (ν, О-Н), а также полосами при 1593 см⁻¹ (ν, С=С), 1381 см⁻¹ (δ С-ОН) и 1068 см⁻¹ (ν, С-О) соответственно.

Оценку содержания гидроксильных групп в гидроксифуллерене проводят на основании данных термогравиметрии. Сопоставление потери массы образца фуллеренола с потерей массы исходного фуллерена рассчитывают по формуле:

$$n = \{MМC_{60}/\Delta m C_{60}\} \cdot \{\Delta m C_{60}(OH)_x/MМC_{60}(OH)\},$$

где ММ — молекулярная масса, а Δm — потеря массы.

Таблица 2
Противовирусный эффект *in vitro* фуллеренолов и препаратов сравнения в отношении различных вирусов

Вирус	Тест-система	Соединение	Среднее значение вирусингибирующей концентрации (ВИК ₅₀), мкМ
Герпес-вирус HSV1/СПб/248/88	Культуры клеток L-41 и А-549	C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₄	46,0 ± 1,1
		C ₆₀ (OH) ₃₀₋₃₈	122,6 ± 2,5
		C ₆₀ (OH) ₁₂₋₁₄ (суспензия)	не действует
Аденовирус Ad3/эталон/4120	Культуры клеток L-41 и А-549	Ацикловир	47,5 ± 14,7
		C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₄	161,1 ± 8,17
		Арбидол	37,2 ± 7,4
РС-вирус RS/эталон/Лондон/3541	Культура клеток L-41	C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₄	12,1 ± 3,6
Пандемический вирус гриппа 2009 г. А/СПб/56/09 (H1N1)v	Культура клеток MDCK	C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₄	37,1 ± 6,27
Вирус гриппа А/Перт/16/09 (H3N2)		—	99,4 ± 15,7
Вирус гриппа птиц А/Маргын/Костанай/7/07 (H5N1)	Куриные эмбрионы	—	85,1 ± 8,76

При расчете по указанной формуле были получены значения приблизительно 14, 23 и 36 гидроксильных групп на молекулу фуллерена соответственно.

Экспериментальная биологическая часть

Оценка токсичности соединений и эффекта УФ-облучения на культурах клеток

В работе использованы перевиваемые клеточные линии из банка клеточных культур НИИ гриппа — МА-104 (клетки почки зеленой мартышки), А-549 (линия карциномы легкого человека), L-41 (клетки моноцитарной лейкемии человека) и МДСК (клетки почки собаки). Клетки культивировали в среде Игла-МЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки теленка в 96-луночных планшетах (Nunc) в CO₂-инкубаторе в присутствии 5 % CO₂. Перед добавлением исследуемых соединений производили замену среды инкубации на бессывороточную среду Игла-МЕМ. На этой же среде готовили серийные разведения фуллеренолов. В случае фуллеренола C₆₀(OH)₁₂₋₁₄, практически нерастворимого в водных растворах, вносили его суспензию в среде Игла-МЕМ, и концентрация фуллеренола в данном случае учитывалась только условно.

УФ-облучение проводили с помощью облучателя мощностью 400 W со спектром излучения 220 – 400 нм на расстоянии 30 см от планшета с клеточным монослоем, погруженного в охлаждающую водяную баню. Для дополнительного отвода тепла использовали также внешний вентилятор. Фуллеренолы вносили за 1 ч до облучения, после которого клетки дополнительно инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 18 – 20 ч. Методами оценки токсичности *in vitro* служило восстановление клетками в культуре тетразолиевых красителей резазурина (Sigma) — флуориметрический метод или МТТ (ICN) — фотометрический метод [18, 19]. Соответствующие показатели измеряли на планшетном анализаторе Varioscan (ThermoFischer).

Определение противовирусной активности *in vitro*

Антивирусное действие фуллеренолов определяли в отношении ряда актуальных штаммов гриппа человека: штамма пандемического гриппа 2009 г. А/С.-Петербург/56/09 (H1N1)v, эталонного штамма, входящего в состав гриппозной вакцины на 2010 – 2011 гг. А/Перт/16/09 (H3N2), а также штамма гриппа птиц, выделенного в Казахстане и охарактери-

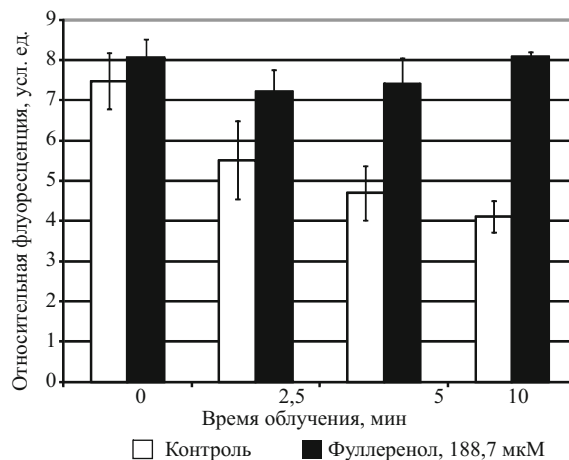


Рис. 1. Защитное действие фуллеренола C₆₀(OH)₁₈₋₂₄ на фототоксичность, вызванную УФ-освещением, в культуре клеток МА-104. Тест-метод — восстановление резазурина.

зованного в НИИ гриппа — А/Мартын/Костанай/7/07 (H5N1). Действие вирусов гриппа человека изучали на культуре клеток МДСК, а гриппа птиц – на развивающихся 10-дневных куриных эмбрионах. Клетки заражали вирусами в раститровке с шагом 10, максимальная множественность заражения при этом составляла 100 ТИД₅₀ в 100 мкл, где ТИД₅₀ – 50 % тканевая инфекционная доза.

Присутствие вируса в среде инкубации определяли микрометодом реакции гемагглютинации (РГА). Титр вируса выражали в десятичных логарифмах в 100 мкл (lgТИД₅₀). Противовирусную активность образцов оценивали по снижению титра вируса в опытных лунках планшетов по сравнению с контрольными (ΔlgТИД₅₀). Кроме того, оценивали степень цитопатогенного действия вируса при микроскопическом исследовании зараженной культуры и по указанному выше критерию восстановления клетками в культуре МТТ. Степень угнетения жизнеспособности клеток в культуре коррелирует с развитием вирусной инфекции *in vitro*. Среднюю вирусингибирующую концентрацию образца (ВИК₅₀) вычисляли по каждому из 3 указанных критериев, исходя из уравнений линейной регрессии доза — эффект.

Противовирусную активность оценивали также в отношении вируса простого герпеса I типа HSV1/С.-Петербург/248/88, аденовируса III типа

Таблица 3
Сравнительный эффект различных концентраций фуллеренолов и ацикловира на вирусы герпеса, адено- и РС-вирусы в культуре клеток L-41

Вирус	Соединение	Концентрация, мкг/мл			
		12,5	25	50	100
Снижение титра вируса по сравнению с контролем, ΔlgТИД ₅₀					
HSV1/СПб/248/88	C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₄	0	1,2	4,1	4,3
	C ₆₀ (OH) ₃₀₋₃₈	0,18	1,05	0,77	1,77
	C ₆₀ (OH) ₁₂₋₁₄ (суспензия)	0	0	0	0
	Ацикловир	3,33	3,46	4,0	4,1
Ad3/эталон/4120	C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₄	0	0,15	0,73	1,45
RSV/эталон/3541/Лондон	—“—	1,74	3,0	3,79	3,79

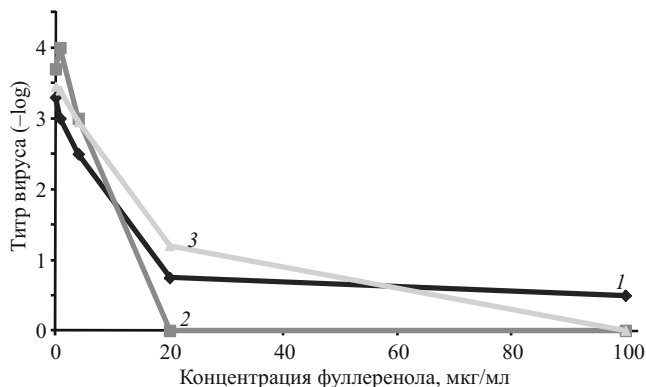


Рис. 2. Противовирусное действие фуллеренола $C_{60}(OH)_{18-24}$ на пандемический вирус гриппа А/С.-Петербург/56/09 (H1N1)v по данным 3 методов определения. ВИК₅₀ ср. = $33,9 \pm 6,65$ мкг/мл ($31,9 \pm 6,27$ мкМ): 1 – ЦПД, 2 – РГА, 3 – МТТ.

Ad/3/эталон/4120 и респираторно-синцитиального вируса RS/эталон/Лондон/3541 на культурах клеток L-41 и A-549, чувствительных к данным вирусам. Образцы вносили по нескольким схемам: лечебно-профилактической — за 30 мин до внесения в культуру суспензии вируса, одновременно с внесением вируса или вначале смешивали суспензию вируса с исследуемыми соединениями, инкубировали 30 мин и заражали культуры клеток. Множественность заражения — как в случае вирусов гриппа. Отдельно проверяли влияние УФ-облучения на противовирусный эффект фуллеренолов, облучая смесь вирус — фуллеренол. Цитопатическую реакцию учитывали через 48 и 72 ч по степени деградации монослоя (микроскопическое исследование культуры), а также методом МТТ. Для вычисления ВИК₅₀ применяли вышеуказанный регрессионный метод. В качестве препаратов сравнения использовали ацикловир (GlaxoSmithKlein) для вируса герпеса и арбидол (ФармСтандарт) в случае аденовируса.

Результаты и их обсуждение

Все водорастворимые фуллеренолы были нетоксичны для клеток в культуре независимо от использованной клеточной линии во всем диапазоне исследованных концентраций — до 1 мг/мл (для $C_{60}(OH)_{18-24}$ это порядка 943 мкМ). Более того, в темноте $C_{60}(OH)_{18-24}$ усиливал дыхательный метаболизм и количество жизнеспособных клеток по сравнению с контролем в резазуриновом или МТТ-тесте, например, в культуре A-549 повышение составляло 12 % ($p = 0,025$). $C_{60}(OH)_{12-14}$, нерастворимый в воде и водных растворах, будучи внесен в качестве суспензии (концентрация дана условно), выпадал в осадок, покрывая клеточный монослой, что, вероятно, определило его небольшой подавляющий эффект на исследованные метаболические показатели клеток (табл. 1). В дальнейшем было показано отсутствие какого-либо действия суспензии данного соединения на фототоксичность, вызванную УФ-облучением, и отсутствие у него противовирусной активности (табл. 1 и 2).

Остальные варианты фуллеренола обладали достоверным защитным действием в отношении вызванной УФ-облучением фототоксичности (табл. 1, рис. 1).

При этом на максимуме защитного эффекта разница с контролем у $C_{60}(OH)_{18-24}$ составляла от 1,9 раза для клеток Ma-104 и L-41 до 3 раз для клеток A-549, причем концентрация фуллеренола 200 мкг/мл (188,7 мкМ) практически полностью блокировала фототоксичность — жизнеспособность клеток не отличалась от темнового контроля (рис. 1). Из табл. 1 видно, что защитный эффект фуллеренола с более высоким содержанием гидроксильных групп $C_{60}(OH)_{30-38}$ был существенно слабее — до 1,2 раза по сравнению с облученным контролем.

Фуллеренолы обладали выраженным противовирусным действием в отношении всех исследованных вирусов гриппа, адено-, РС- и герпес-вирусов (табл. 2, 3; рис. 2). Наиболее детально был изучен эффект в отношении вируса герпеса (табл. 2, 3). Как и в случае цитопротекторного эффекта на фоне УФ-облучения, противовирусное действие наиболее выражено у $C_{60}(OH)_{18-24}$, причем ВИК₅₀ данного фуллеренола в молярном выражении очень близка среднеэффективному значению вирусингибирующей концентрации такого широко используемого при герпетической инфекции препарата как ацикловир (табл. 2). Очень близкие значения ВИК₅₀ получены в отношении отечественного штамма пандемического вируса гриппа H1N1 2009 г. Для актуального вируса гриппа человека H3N2 и вируса гриппа птиц H5N1 значения ВИК₅₀ несколько выше, $C_{60}(OH)_{18-24}$ также менее эффективен в отношении аденовируса, тем не менее обладая достоверным противовирусным действием (табл. 2, 3). При этом вне зависимости от использованного критерия оценки противовирусного эффекта — по РГА, микроскопическому определению цитопатического действия или МТТ — получены очень близкие результаты (рис. 2). Наиболее выраженный противовирусный эффект отмечен в отношении респираторно-синцитиального вируса (табл. 2, 3). Однако к этим данным нужно подходить с осторожностью по следующей причине: ввиду медленного размножения вируса в культуре опыт длился 5 сут. За это время жизнеспособность клеток в культуре может спонтанно уменьшаться, а поскольку нами обнаружено стимулирующее влияние фуллеренола на клетки без всякого внешнего воздействия, оценка степени его защитного действия на цитопатический эффект РС-вируса в этих условиях может быть завышена.

Предварительная инкубация вируса герпеса с фуллеренолом $C_{60}(OH)_{18-24}$ в течение 30 мин не влияла на эффективность его противовирусного действия: результаты практически не отличались от тех, когда вирус и фуллеренол вносили одновременно в среду инкубации клеток. Это свидетельствует в пользу того, что действие фуллеренола не является прямым вирус-клеточным, а связано с взаимодействием вирус — клетка. Не оказало влияния на противовирусный эффект $C_{60}(OH)_{18-24}$ также предварительное облучение смеси фуллеренол — вирус УФ в течение 5 мин при тех же условиях, что и облучение клеток. Аналогичный эффект получен с аденовирусом. Следовательно, в отличие от наносуспензии C_{60} , солубилизованно-

го ультразвуком, противовирусная активность фуллеренолов не связана с фотодинамическим эффектом.

Следует подчеркнуть одинаковый характер зависимости изученных биологических эффектов фуллеренолов (УФ-протективного и противовирусного действия) от числа гидроксильных групп. Это свидетельствует в пользу того, что в основе изученных биологических эффектов лежит антирадикальная/антиоксидантная активность фуллеренолов. Известно, что ряд антиоксидантов обладают как собственным противовирусным действием, так и способны потенцировать эффекты других противовирусных препаратов [20]. В то же время нельзя не рассматривать и гипотезу о мембранотропной составляющей в механизме противовирусного эффекта фуллеренолов, подобно действию немодифицированного C_{60} , которая обусловлена высокой липофильностью молекулы C_{60} [1, 3]. Молекула фуллерена обладает высокой электроотрицательностью, которая, естественно, уменьшается при введении в фуллереновый кор электронодонорных заместителей, поэтому полигидроксирование фуллеренолов приводит к уменьшению их способности к взаимодействию со свободными радикалами [3]. В то же время по мере увеличения количества гидроксильных групп возрастает растворимость, а, следовательно, биодоступность фуллеренолов. Вероятно, в силу этих 2 противоположных тенденций существует некоторое оптимальное количество гидроксильных групп, когда фуллеренол уже хорошо растворим, но еще обладает высокой антирадикальной активностью. Наши данные как раз иллюстрируют такую ситуацию: фуллеренол $C_{60}(OH)_{12-14}$ нерастворим и не обладает в наших тест-системах значимой биологической активностью, $C_{60}(OH)_{18-24}$ обладает максимальной противовирусной и УФ-защитной активностью, а у фуллеренола $C_{60}(OH)_{30-38}$ эти эффекты выражены уже меньше. По мнению некоторых авторов, несмотря на пониженное сродство к электрону молекулы фуллеренола по сравнению с C_{60} , наличие у фуллеренола аллильных гидроксильных групп делает его весьма перспективным кандидатом на роль ловушки свободных радикалов или растворимого антиоксиданта [3].

Таким образом, получены фуллеренолы с различным содержанием гидроксильных групп, которые обладают широким спектром противовирусной активно-

сти *in vitro* и защитным эффектом против индуцированной УФ фототоксичности, причем максимальная биологическая активность отмечена у варианта $C_{60}(OH)_{18-24}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Piotrovsky, M. Eropkin, E. Eropkina, et al., In: *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, F. Cataldo and T. da Ros (eds.), Springer (2008), pp. 139 – 155.
2. R. Partha, J. L. Conyers, *Int. J. Nanomed.*, **4**, 261 – 275 (2009).
3. Л. Б. Пиотровский, О. И. Киселев, *Фуллерены в биологии*, Санкт-Петербург, Росток (2006).
4. J. Mrdanovic, S. Solajic, V. Bogdanovic, et al., *Mutation Res.*, **680**(1–2), 25 – 30 (2009).
5. Jun-Jie Yin, Lao Fang, P. P. Fu, et al., *Biomaterials*, **30**, 611 – 621 (2009).
6. S. M. Mirkov, A. N. Djordjevic, N. L. Andric, et al., *Nitric Oxide*, **11**(2), 201 – 207 (2004).
7. S. Trajkovic, S. Dobric, V. Jacevic, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **58**(1), 39 – 43 (2007).
8. Fang Jiao, Ying Qu, Wei Li, et al., *Carbon*, **48**(8), 2231 – 2243 (2010).
9. Y. Saitoh, A. Miyanishi, H. Mizuno, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, doi:10.1016 / j.photobiol.2010.09.006 (2010).
10. H.-S. Lai, Y. Chen, W.-J. Chang, L.-Y. Chiang, *Transpl. Proc.*, **32**, 1272 – 1274 (2000).
11. Л. Б. Пиотровский, К. Н. Козелецкая, Н. А. Медведева и др., *Вопр. вирусол.*, № 3, 38 – 42 (2001).
12. V. V. Zarubaev, I. Belousova, V. Rylkov, et al., In: *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, F. Cataldo and T. da Ros (eds.), Springer (2008), pp. 107 – 122.
13. Н. И. Носик, Н. Г. Кондрашина, А. Ю. Григорьева и др., *Вопр. вирусол.*, № 1, 15 – 18 (2009).
14. Д. А. Носик, Н. К. Лялина, Л. Б. Калнине и др., *Вопр. вирусол.*, № 5, 41 – 43 (2009).
15. В. М. Mikawa, H. Kato, M. Okumura, et al., *Bioconjug Chem.*, **12**, 510 – 514 (2001).
16. C. Y. Chen, G. M. Xing, J. X. Wang, et al., *Nano Let.*, **5**(10), 2050 – 2057 (2005).
17. R. Singh, T. H. Goswami, *J. Organometal. Chem.*, **693**, 2021 – 2032 (2008).
18. R. Clothier, G. Starzec, L. Pradel, et al., *Alternatives To Lab. Animals*, **30**, 493 – 504 (2002).
19. T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.*, **65**(1), 55 – 63 (1983).
20. М. Ю. Еропкин, Т. М. Гудкова, Н. И. Коновалова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **70**(5), 33 – 37 (2007).

Поступила 10.09.11

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF FULLERENOLS WITH VARIOUS CONTENTS OF HYDROXYL GROUPS

M. Yu. Eropkin¹, E. Yu. Melenevskaya², K. V. Nasonova², T. S. Bryazhnikova¹, E. M. Eropkina¹, D. M. Danilenko¹, and O. I. Kiselev¹

¹ Research Institute of Influenza, Ministry of Public Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197376 Russia;

² Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

Polyhydroxy fullerenes – fullerlenols with various contents of hydroxyl groups – $C_{60}(OH)_{12-14}$, $C_{60}(OH)_{18-24}$, and $C_{60}(OH)_{30-38}$ have been synthesized. The first is insoluble in water and exhibits no biological activity when introduced into cell cultures in the form of a suspension. The two other variants of fullerlenol possess a broad spectrum of antiviral activity *in vitro* against actual strains of human influenza virus A(H1N1) and A(H3N2), avian influenza A(H5N1), human herpes simplex virus, adenovirus, and respiratory-syncytial virus. Water-soluble variants of fullerlenol were non-toxic *in vitro* towards human and animal cells of various tissue origins. Besides the antiviral activity, fullerlenols demonstrated a protective effect against UVA-induced phototoxicity. The maximum overall biological activity for all test indices was found in fullerlenol variant $C_{60}(OH)_{18-24}$. Water-soluble biologically active variants of fullerlenol can be used in pharmacology, since they could serve as a basis for new effective and non-toxic antiviral and cytoprotective formulations.

Key words: Fullerlenols; antiviral activity; UVA-protective effect; cell cultures