

Фуллерены и оксидативный стресс

М.А. Орлова¹, Т.П. Трофимова¹, А.П. Орлов², О.А. Шаталов³,
А.А. Свистунов³, Ю.К. Наполов³, В.П. Чехонин²

¹Химический факультет, кафедра радиохимии ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

²медико-биологический факультет, кафедра медицинских нанобиотехнологий
ГБОУ ВПО «Российский научно-исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³фармацевтический факультет, кафедра фармакологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Контакты: Марина Алексеевна Орлова orlova.radiochem@mail.ru

Многие представители обширного семейства водорастворимых аддуктов фуллеренов и наночастиц на их основе привлекают серьезное внимание как противовирусные агенты, противоопухолевые агенты и средства адресной доставки лекарств. Сегодня получено огромное количество таких производных фуллерена C_{60} . Однако для внедрения фуллереновых производных в медицинскую практику необходимо понимание причин и механизмов прямых и отдаленных последствий их эффектов *in vivo*. В первую очередь это касается их влияния на регуляцию процессов пролиферации, апоптоза и некроза. Огромное значение имеют способ получения, функционализации и морфология фуллереновых наночастиц (их размеры, форма, рельеф поверхности, аффинность к клеточным структурам), т. е. параметры, в зависимости от которых биологические эффекты наночастиц могут меняться от цитопротекторного до цитотоксического. Одним из основных эффектов фуллеренов на живые системы считается индукция образования активных форм кислорода. В данной лекции содержится анализ современных представлений о влиянии фуллеренов и их производных на образование активных форм кислорода и модуляции процессов пролиферации и апоптоза нормальных и опухолевых клеток.

Ключевые слова: фуллерены, апоптоз, оксидативный стресс

Fullerene and oxidative stress

M.A. Orlova¹, T.P. Trofimova¹, A.P. Orlov², O.A. Shatalov³, A.A. Svistunov³, Yu.K. Napolov³, V.P. Chekhonin²

¹M.V. Lomonosov Moscow State University;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow;

³I.M. Sechenov Moscow State Medical University

Fullerene derivatives superfamily attracts a serious attention as antiviral and anticancer agents and drug delivery carriers as well. A large number of such fullerene C_{60} derivatives obtained to date. However, there is an obvious deficit of information about causes and mechanisms of immediately and long-term consequences of their effects *in vivo* which is a true obstacle on the way leading to their practical medical using. First, this concerns their impact on the proliferation, apoptosis and necrosis regulation. Fullerene nanoparticle functionalization type, their sizes and surface nanopathology are of great importance for further promoting of either cytoprotective or cytotoxic effects. One of the main effects of fullerenes on living systems is the reactive oxygen species (ROS) formation induction. This lecture provides a modern concept analysis regarding fullerenes effects on ROS formation and modulation of proliferation and apoptosis in normal and tumor cells.

Key words: fullerenes, apoptosis, oxidative stress

Одним из основных факторов воздействия внешней среды, влияющих на апоптоз, является оксидативный стресс, выражающийся в образовании активных форм кислорода (АФК), среди которых наибольшее действие производят синглетный кислород, супероксид-анион-радикал, пероксид водорода и гидроксильные радикалы, дополнительно появляющиеся в катализируемых металлами реакциях Фентона и Хабера–Вейса. АФК участвуют в запуске как рецепторного, так и нереперторного механизмов апоптоза, аутофагии, перекисного окисления липидов и опосредованно влияют на многие сигнальные пути молекулярно-биологических реакций [1, 2]. Известно, что основное воздействие наночастиц вообще и фуллереновых в частности заключается как раз в индук-

ции оксидативного стресса, возникающего при их попадании в организм [3]. Конкретные последствия воздействия наночастиц сильно зависят от их физико-химических свойств: размера, формы, диспергированности в растворителе, растворимости в воде, состава боковых цепей и т. д. Их действие варьирует в широком диапазоне — от токсического до протективного. Концентрационная зависимость является одним из важнейших показателей, определяющих последствия введения фуллеренов.

Благодаря своей уникальной сферической структуре C_{60} имеет возможность принимать до 6 электронов [4]. Эти электроны быстро двигаются вокруг структуры (фуллереновой сетки) за счет дипольных моментов. Когда C_{60} находится под воздействием

света, электрон поднимается на более высокий энергетический уровень, продуцируя возбужденный синглетный C_{60} , который реагирует с молекулой кислорода (O_2) с образованием синглетного кислорода (1O_2) — кислорода со свободным электроном на внешней орбите. Фуллерены являются чрезвычайно эффективными генераторами синглетного кислорода с квантовым выходом 1O_2 , близким к единице. Они сильно поглощают свет в ультрафиолетовой и умеренно в видимой области спектра [5], что позволяет использовать их в фотодинамической терапии.

Увеличение количества функциональных групп, добавленных к фуллерену, приводит к снижению квантового выхода синглетного кислорода и АФК-опосредованной цитотоксичности [6]. Токсичность заметно снижена или даже полностью отсутствует и у гидрофильных фуллеренов [7]. Производные фуллерена способны контролировать как экзогенные, так и эндогенные АФК [8].

Токсичность C_{60} оценивалась в разных экспериментах на клеточных культурах и экспериментальных животных [9–13]. Практически во всех экспериментах цитотоксического эффекта не было, либо он был минимальным, однако во многих экспериментах отмечалось снижение пролиферативного потенциала клеток.

Чтобы модулировать токсичность наночастиц $n-C_{60}$ и улучшить возможности их медицинского применения, фуллерены различными способами пытаются сделать либо реально, либо псевдорастворимыми в воде. Этот процесс помимо прочих свойств влияет на способность к агрегации и сильно зависит от типа боковых цепей, при этом образуются морфологически различные структуры: стержни, пузырьки, шарики, мембраны и линейные структуры [14, 15]. Морфология агрегатов производных C_{60} в основном связана с гидрофобными взаимодействиями и водородными

связями. Различия в сродстве к электрону и физические свойства (степень агрегации) сильно влияют на биологическую и биомедицинскую активность конформационных производных фуллеренов [16]. Такие изменения могут способствовать увеличению сродства к радикалам.

Для приготовления растворимых образцов C_{60} используют различные методы придания фуллерену функции растворимости: гидро- и амфифильности, которые в разной степени влияют на их последующую гено- и цитотоксичность (рис. 1) [5].

1. Химическая модификация фуллеренового каркаса путем присоединения различных гидрофильных функциональных групп (derivatization или функционализация фуллерена) [17].

2. Включение фуллерена в водорастворимые супрамолекулярные структуры с помощью поливинилпирролидона-PVP [18], каликсаренов или циклодекстринов (CD) [19–21], когда ядро фуллерена полностью покрыто модификатором и не имеет контакта с водой.

3. Метод обмена растворителей (MOR) [22, 23] использует летучие, смешивающиеся с водой растворители, которые растворяют фуллерен, а после добавления воды испаряются, оставляя суспензию $n-C_{60}$ [24].

4. Длительное (более 2 недель) перемешивание чистого C_{60} с водой. Однако при этом могут образовываться крупные агрегаты, а концентрация фуллерена снижается [25].

Ранее считалось, что более сильные растворители способствуют более высокой токсичности. Биологические эффекты C_{60} , суспендированного в растворе, определяли на культурах *E. coli*. По этим данным, наиболее безопасным растворителем при необходимости биосовместимости оказался N,N-диметилформамид, причем растворимость не связана напрямую с цитотоксичностью, зато озонирование $n-C_{60}$

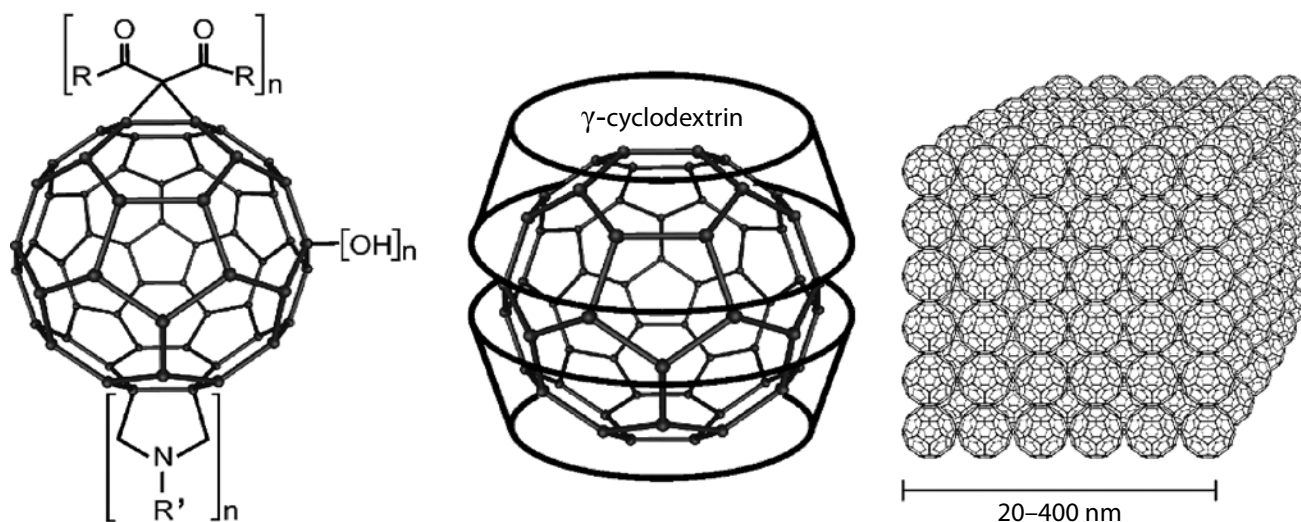


Рис. 1. Основные способы солюбилизации аддуктов фуллерена C_{60}

явно и значительно увеличивало инактивацию *E. coli* [26, 27].

При изучении противоопухолевого действия $n\text{-C}_{60}$ (МОР в диметилсульфоксиде) в высокой концентрации (1 $\mu\text{г/мл}$ $n\text{-C}_{60}$) на клетках глиомы человека (линия U251) и клетках глиомы крыс (линия С6) наблюдали индукцию оксидативного стресса, приводящего к некрозу с повреждением мембраны, опосредованному внеклеточной сигнал-регулируемой киназой (ERK), и смерти клеток [28]. Аналогичная картина наблюдалась в клетках саркомы у мышей. При низкой концентрации (0,25 $\mu\text{г/мл}$ $n\text{-C}_{60}$) имела место аутофагия и остановка пролиферации в G_2/M -фазе. Концентрационно-зависимым образом C_{60} влияет и на дифференцировку мышинных эмбриональных стволовых клеток [29].

В определенных условиях нано- C_{60} способны вызывать лизис эритроцитов человека дозо- и время-зависимым образом, который мог быть остановлен применением N-ацетил-L-цистеина (NAC), что указывает на роль АФК в этом процессе [30].

Введение C_{60} может изменять токсическое действие других микропримесей. В клетках, культивируемых с добавлением C_{60} и As(III), содержание As(III) было выше (эффект «троянского коня»), так как благодаря фуллерену не происходило повышения клеточной токсичности [31].

Азотсодержащие соединения фуллерена могут обладать сильно различающимися свойствами в зависимости от строения вплоть до значительной токсичности. Присоединение к фуллеренам C_{60} пиридинов и пиримидинов усиливает их избирательную нейротропную активность и в 3–5 раз повышает общую токсичность.

Активно исследуют производные фуллерена, модифицированные различными аминокислотами, а также карбоксифуллерены. Например, цистин- C_{60} — производное фуллерена [32] — показал высокую эффективность антиоксидантного действия против супероксид-анион- и гидроксильных радикалов, предотвращая H_2O_2 -индуцированный апоптоз клеток феохромоцитомы крыс (линия PC12) при концентрации 5 $\mu\text{г/мл}$. Из-за гидрофобных взаимодействий многие производные (например, аминокислота- C_{60}) самостоятельно собираются в сферические агрегаты, при этом морфология агрегатов существенно влияет как на цитотоксический, так и на цитопротективный эффект этих соединений против H_2O_2 -индуцированного апоптоза [33].

При рассмотрении разных вариантов модификации C_{60} остатками гексакарбоновой кислоты (C_3 или D_3 конформации) наблюдаются [34] важные различия между липофильными и гидрофильными частицами ($C_3/D_3\text{-}C_{60}$). В качестве модельной системы использовали антиоксидантное действие фуллеренов против перекисного окисления липидов и разрушения целостности мембран клеток, вызываемых радикалами,

полученными в реакциях ксантин/ксантин-оксидаза и Фентона. У липофильных производных C_{60} обнаружен защитный эффект даже больший, чем у природного антиоксиданта — витамина Е. Антиапоптотические функции таких производных фуллерена могут быть независимыми от их АФК-акцепторной роли. Так, трис-карбокси- C_{60} является мощным ингибитором апоптоза в человеческих кожных эпителиальных клетках (НЕК), блокируя клеточный цикл в G_0/G_1 -фазе и вызывая клеточное старение. При этом наблюдается снижение уровня экспрессии убиквитин лигазы HERC5, участвующей во врожденном иммунном ответе на вирусные и бактериальные инфекции. В клетках, обработанных гекса-карбокси- C_{60} и $\gamma\text{-CD-C}_{60}$ в этих же условиях, никаких изменений в пролиферации не наблюдалось.

Показано, что 10 $\mu\text{моль/л}$ карбоксифуллеренов уменьшают апоптоз мононуклеаров крови [35], а протокатеховая кислота- C_{60} [36] снижает апоптоз клеток феохромоцитомы крыс (линия PC12). Уровень концентрации зависит от химического строения производного, которое определяет его дальнейшую способность к агрегированию и связыванию с различными сайтами биологических компонентов, и от характеристик используемой клеточной линии. Конформационная компонента играет существенную (если не определяющую) роль в этих процессах.

Сравнение антиоксидантных свойств различных производных C_{60} (PEG (полиэтиленгликоль)- C_{60} , PVP- C_{60} , CD- C_{60} , C_{60} , содержащего ОН-группы и C_{60} -изостеариновая кислота) по отношению к кератиноцитам кожи человека выявило мощный антирадикальный акцепторный потенциал всех этих соединений [37].

Из-за декларируемого многими авторами отсутствия видимой токсичности и уникальных физико-химических свойств особый интерес вызывают фуллеролы. Гидроксильрованный водорастворимый C_{60} ($C_{60}\text{H}_n\text{Fn}$) благодаря антиоксидантному действию ингибирует катаболическую стресс-индуцированную продукцию матричных металлопротеиназ MMP-1, MMP-3 и MMP-13, а также апоптоз и преждевременное старение в культурах человеческих хондроцитов. Это позволяет предполагать возможность его использования в качестве защитного агента против остеоартрита [38]. При определенных условиях такие высокогидроксильрованные фуллерены могут существенно снижать накопление жира и генерацию АФК [39].

Акцепторную активность по отношению к супероксидрадикалу в системе ксантин/ксантин-оксидаза проявлял фуллерол $C_{60}(\text{OH})_{24}$, не оказывая генотоксических эффектов и демонстрируя цитопротекторные свойства в широком диапазоне концентраций (11–221 $\mu\text{моль/л}$). Однако по другим данным, при исследовании доксорубицин-индуцированной кардиотоксичности этот же фуллерол размером 7 нм при концентрации 1–100 $\mu\text{моль/мл}$ вызывает морфологи-

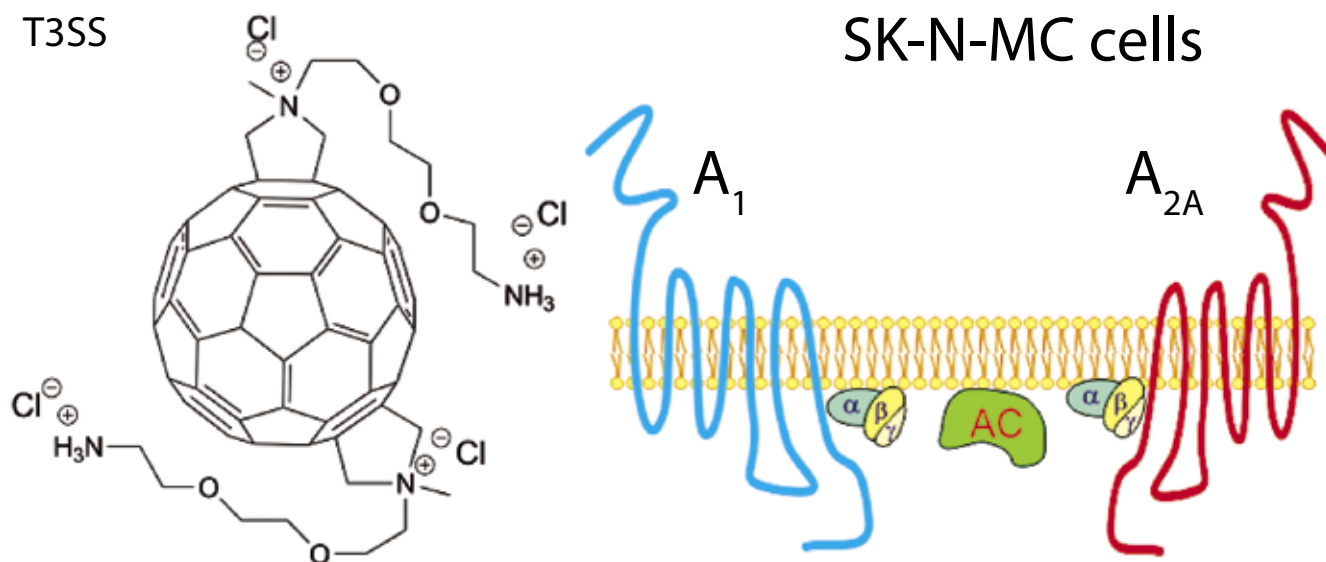


Рис. 2. Аденозиновые рецепторы в SK-N-MC линии клеток нейроэпителиомы человека во взаимодействии с аддуктом фуллерена C_{60} [49]

ческие изменения в клетках сосудов эндотелия, ингибирует их пролиферацию и активирует аутофагию. Это сопровождается накоплением в клетках полиубиквитированных белков, что активирует аутофагию [40, 41].

Другой гидроксированный фуллерол $C_{60}(OH)_{22}$ в диапазоне наномолярных концентраций вызывал ингибирование роста клеток. Эффект зависел от характеристик конкретной клеточной линии, дозы и времени его действия. В то же время $C_{60}(OH)_{22}$, как и $C_{60}(OH)_{24}$, значительно подавлял индуцированную доксорубицином цитотоксичность при любых концентрациях независимо от времени добавления фуллерола. Считается, что эти свойства $C_{60}(OH)_{22}$ опосредованы его высокой акцепторной активностью по отношению именно к ОН-радикалам [41]. При концентрациях более 10 $\mu\text{моль/л}$ фуллеролы в ряде экспериментов проявляли выраженную цитотоксичность [42].

Некоторые водорастворимые фуллерены [43] способны проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и, противодействуя оксидативному стрессу, влиять на пролиферацию клеток мозга [44]. *In vitro* было смоделировано взаимодействие наночастиц водорастворимого карбоксифуллерена $C_{60}(C(COOH)_2)_2$ с клетками ГЭБ в условиях окислительного стресса, вызван-

ного пероксидом водорода, которое показало, что частицы этого соединения селективно проникают преимущественно в окисленные (а не нормальные) клетки эндотелия микрососудов, сохраняя их целостность за счет подавления H_2O_2 -индуцированной деполимеризации F-актина [45].

Карбоксифуллерены продемонстрировали *in vivo* свою эффективность в предотвращении нейродегенерации при амиотрофическом латеральном склерозе [46].

Водорастворимые фуллеролы считаются главным достижением нанотехнологий для нейромедицины [47]. При концентрациях от 10 до 100 $\mu\text{моль/л}$ они на 10–80 % ингибируют активность глутаматных рецепторов. Однократная обработка клеток нейроэпителиомы человека (линия SK-N-MC) нетоксичной концентрацией водорастворимого C_{60} -бис-аддукта (рис. 2) вызывала модуляцию экспрессии аденозиновых рецепторов с увеличением экспрессии A2A- и A2B-рецепторов мРНК и повышением уровня A1 и A2A белков [48].

Однако нельзя забывать, что наряду с нейропротекторным возможно и нейротоксическое действие фуллеренов, проявления которого пока изучены далеко недостаточно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Orlova M.A., Orlov A.P. Role of zinc in an organism and its influence on processes leading to apoptosis. *Br J Med Res* 2011;1:239–305.
2. Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M. Anti-apoptosis and cell survival. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:238–59.

3. Shvedova A.A., Kagan V.E., Fadeel B. Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:63–88.
4. Markovic Z., Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species

- generation and quenching by fullerenes (C_{60}). *Biomaterials* 2008;29:3561–73.
5. Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A. et al. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C_{60}) as potential medicines: $O_2^{\cdot-}$ versus 1O_2 . *J Am Chem Soc* 2003;125:12803–9.

6. Sayes C.M., Gobin A.M., Ausman K.D. et al. Nano- C_{60} cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 2005;26:7587–95.
7. Scrivens W.A., Tour J.M., Creek K.E., Pirisi L. Synthesis of ^{14}C -labeled C_{60} , its suspension in water, and its uptake by human keratinocytes. *J Am Chem Soc* 1994;116:4517–8.
8. Maeda R., Noiri E., Isobe H. et al. A water-soluble fullerene vesicle alleviates angiotensin II-induced oxidative stress in human umbilical venous endothelial cells. *Hypertension Res* 2008;31:141–51.
9. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv Exp Med Biol* 2007;620:168–80.
10. Jia G., Wang H., Yan L. et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol* 2005;39:1378–83.
11. Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C_{60} water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vitro* profiles. *Nano Lett* 2007;7:2399–406.
12. Baker G.L., Gupta A., Clark M.L. et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C_{60} fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol Sci* 2008;101:122–31.
13. Horie M., Nishio K., Kato H. et al. *In vitro* evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C_{60} medium dispersion. *J Biochem* 2010;148:289–98.
14. Zhou S., Burger C., Chu B. et al. Spherical bilayer vesicles of fullerene-based surfactants in water: a laser light scattering study. *Science* 2001;291:1944–7.
15. Sawamura M., Kawai K., Matsuo Y. et al. Stacking of conical mesogens with a fullerene apex into polar columns in crystals and liquid crystals. *Nature* 2002;419:702–5.
16. Yin J.J., Lao F., Fu P.P. et al. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials* 2009;30:611–21.
17. Husebo L.O., Sitharaman B., Furukawa K. et al. Fullerenols revisited as stable radical anions. *J Am Chem Soc* 2004;126:12055–64.
18. Yamakoshi Y.N., Yagami T., Sueyoshi S., Miyata N. Acridine adduct of [60]fullerene with enhanced DNA-cleaving activity. *J Org Chem* 1996;61:7236–7.
19. Makha M., Purich A., Raston C.L., Sobolev A.N. Structural diversity of host-guest and intercalation complexes of fullerene C_{60} . *Eur J Inorg Chem* 2006;3:507–17.
20. Deguchi S., Mukai S.A., Tsudome M., Horikoshi K. Facile generation of fullerene nanoparticles by hand-grinding. *Adv Mater* 2006;18:729–32.
21. Quaranta A., Zhang Y., Filippone S. et al. Photophysical studies of six amphiphilic 2:1 cyclodextrin:[60]fullerene derivatives. *Chem Phys* 2006;325:397–403.
22. Dhawan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K. et al. Stable colloidal dispersions of C_{60} fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ Sci Technol* 2006;40:7394–401.
23. Deguchi S., Alargova R.G., Tsujii K. Stable dispersions of fullerenes, C_{60} and C_{70} , in water: preparation and characterization. *Langmuir* 2001;17:6013–7.
24. Lyon D.Y., Adams L.K., Falkner J.C., Alvarez P.J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size. *Environ Sci Technol* 2006;40:4360–6.
25. Brant J.A., Labille J., Bottero J.Y., Wiesner M.R. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry. *Langmuir* 2006;22:3878–85.
26. Cook S.M., Aker W.G., Rasulev B.F. et al. Choosing safe dispersing media for C_{60} fullerenes by using cytotoxicity tests on the bacterium *Escherichia coli*. *J Hazard Mater* 2010;176:367–73.
27. Cho M., Fortner J.D., Hughes J.B., Kim J.H. *Escherichia coli* inactivation by water-soluble, ozonated C_{60} derivative: kinetics and mechanisms. *Environ Sci Technol* 2009;43:7410–5.
28. Каркищенко Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов. *Биомедицина* 2009;1:5–27.
29. Nishimura T., Kubota R., Tahara M. et al. Biological effects of fullerene C_{60} in mouse embryonic stem cells. *Toxicol Lett* 2006;164S:S214.
30. Trpkovic A., Todorovic-Markovic B., Kleut D. et al. Oxidative stress-mediated hemolytic activity of solvent exchange-prepared fullerene (C_{60}) nanoparticles. *Nanotechnol* 2010;21(37):375102.
31. Costa C.L.A., Chaves I.S., Ventura-Lima J. et al. *In vitro* evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C_{60}) in zebrafish hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C* 2012;155:206–12.
32. Hu Z., Guan W., Wang W. et al. Protective effects of a novel cystine C_{60} derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem Biol Interact* 2007;167:135–44.
33. Hu Z., Guan W., Wang W. et al. Synthesis of amphiphilic amino acid C_{60} derivatives and their protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Carbon* 2008;46:99–109.
34. Wang I.C., Tai L.A., Lee D.D. et al. C_{60} and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J Med Chem* 1999;42:4614–20.
35. Monti D., Moretti L., Salvioi S. et al. C_{60} carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:711–7.
36. Guan S., Bao Y., Jiang B., An L. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Eur J Pharmacol* 2006;538:73–9.
37. Xiao L., Takada H., Maeda K. et al. Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxylipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes. *Biomed Pharmacotherapy* 2005;59:351–8.
38. Alcaraz M.J., Megias J., Garcia-Arnandis I. et al. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 2010;80:13–21.
39. Bal R., Turk G., Tuzcu M. et al. Protective effects of nanostructures of hydrated C_{60} fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology* 2011;282:69–81.
40. Mirkov S.M., Djordjevic A.N., Andric N.L. et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerene, $C_{60}(OH)_{24}$. *Nitric Oxide* 2004;11:201–7.
41. Bogdanovic G., Koji V., Dordevic A. et al. Modulating activity of fullerol $C_{60}(OH)_{22}$ on doxorubicin-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2004;18:629–37.
42. Wielgus A.R., Zhao B., Chignell C.F. et al. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;242:79–90.
43. Cagle D.W., Kennel S.J., Mirzadeh S. et al. *In vivo* studies of fullerene-based materials using endohedral metallofullerene radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5182–7.
44. Oberdorster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C_{60}) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* 2004;112:1058–62.
45. Lao F., Chen L., Li W. et al. Fullerene nanoparticles selectively enter oxidation-damaged cerebral microvessel endothelial cells and inhibit JNK related apoptosis. *ACS Nano* 2009;3:3358–68.
46. Lin J., Wu C. Surface characterization and platelet adhesion studies on polyurethane surface immobilized with C_{60} . *Biomaterials* 1999;20:1613–20.
47. Linazasoro G. Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. *Parkinson Relat Disor* 2008;14:383–92.
48. Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A. et al. Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:4–22.
49. Lee Y.T., Chiang L.Y., Chen W.J., Hsu H.C. Water-soluble hexasulfobutyl-[60]-fullerene inhibits low-density lipoprotein oxidation in aqueous and lipophilic phases. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224:69–75.