

УДК 57.085.25:541.1/49

Рыбачук О. А.^{1,2,4}, Левин Р. Е.^{1,3}, Кирик В. М.², Сусарова Д. К.³, Цупиков О. М.^{1,2,4}, Сможаник Е. Г.^{1,4}, Бутенко Г. М.², Скибо Г. Г.^{1,2,4}, Трошин П. А.³, Пивнева Т. А.^{1,2,4}¹Інститут фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України, Київ, Україна²ГУ «Інститут генетическої і регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна³ФГБУН Інститут проблем хімічної фізики Російської академії наук, Черноголовка, Російська Федерація⁴Государственная Ключевая лаборатория, Київ, Україна

e-mail: oks-ribachuk@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО ПРОИЗВОДНОГО ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА СВОЙСТВА НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРОВ *IN VITRO*

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние водорастворимого производного фуллера C₆₀ на свойства культивируемых нейральных стволовых/прогениторных клеток. Добавление металлизированного фуллеренола на основе C₆₀ (Na₄[C₆₀(OH)₋₃₀], NaFL) в концентрации 20 нМ в культуру клеток увеличивало их количество почти в два раза по сравнению с контролем, а также уменьшало образование нейросфер. Полученные в работе данные позволяют предположить, что NaFL положительно влияет на пролиферативную активность нейральных прогениторов. Применение NaFL как вещества, которое влияет на пролиферацию нейральных стволовых клеток, может быть весьма перспективным для использования в биотехнологии и клеточной биологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейральные стволовые клетки, NaFL, пролиферация клеток, нейросферы, FGF-2, иммуноцитохимия, электронная микроскопия.

Одним из перспективных направлений клеточной и генноклеточной терапии является выделение, идентификация и получение клонов стволовых и, в частности, плюрипотентных клеток, с их последующей дифференциацией в специализированные клетки [1].

Нейральные стволовые клетки (НСК), или стволовые клетки ЦНС – это клетки, которые могут дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты, обеспечивая необходимое количество клеток в мозге при его развитии и патологии. Изучение свойств НСК в условиях культивирования играет огромную роль при исследовании заболеваний центральной нервной системы, развитии нейронов, дифференциации и регенерации.

Открытие нейральных стволовых клеток и их идентификация в мозге эмбрионов и взрослых особей трансформировало представления о пластичности центральной нервной системы. На смену постулату о том, что нервные клетки не обновляются и не делятся, пришло утверждение, что во взрослом организме за счет НСК происходит обновление функций поврежденных нейронов. На сегодня собрано уже достаточно большое количество экспериментальных данных по возможному использованию НСК при различных нейродегенеративных заболеваниях.

В настоящее время внимание исследователей привлекает проблема выделения, размножения, сохранения НСК и изучения их дифференциации в условиях культивирования и при трансплантации в мозг. Во взрослом организме количество стволовых клеток мно-

го меньше, чем в эмбриональном и раннем постнатальном периоде. Поэтому донорского материала для трансплантации недостаточно, и для увеличения количества стволовых клеток используют их способность к пролиферации в системах *in vitro*.

Главное преимущество культивируемых клеток – это возможность прижизненного наблюдения клеток с помощью микроскопа. Существенно то, что при работе с культурами клеток в эксперименте используются здоровые клетки и что они сохраняют жизнеспособность в течение всего эксперимента. Убедиться в этом можно, периодически тестируя культуру клеток. Более того, легко оценивать относительное содержание жизнеспособных клеток.

В культуре НСК ведут себя как самообновляющиеся в клонах незрелые мультипотентные клетки с набором селективных фенотипических признаков. После остановки пролиферации они дифференцируются в нейроны, астроглию и олигодендроциты [2]. Культивированные *in vitro* НСК являются источником клеток для трансплантации, скрининга медицинских препаратов, а также для генной терапии и исследований развития нервной ткани [3-6].

В настоящее время четко установлено регуляторное и избирательное влияние некоторых факторов роста на свойства НСК как *in vivo*, так и *in vitro* [7]. Однако, несмотря на первые успехи в изучении НСК, остается еще много вопросов и проблем, связанных с изучением свойств этих клеток, разработкой методов их выделения, роста и дифференциации.

На сегодняшний день нанотехнологии считаются самыми многообещающими из всех технологических подходов, потому что именно здесь происходит качественный скачок от манипуляции с веществом к манипуляции с отдельными атомами [8,9]. Одним из перспективных направлений является применение углеродных наноструктур – производных фуллерена (C_{60}). Фуллерен – молекулярное соединение, принадлежащее к классу аллотропных форм углерода и представляющее собой выпуклые замкнутые многогранники, построенные из sp^2 -гибридных атомов углерода. Как правило, в молекулах фуллеренов атомы углерода расположены в вершинах правильных шести- и пятиугольников, из которых составлена поверхность сферы или эллипсоида.

Исследования последних лет указывают на антиоксидантные [10-18], нейропротекторные [19-23] и ноотропные [24] свойства производных фуллерена C_{60} . Также авторы сообщают о радиопротекторных [17], онкопротекторных [25,26], противоаллергических [27], антибактериальных и противовирусных [28-36] свойствах водорастворимых производных фуллерена C_{60} .

Несмотря на столь внушительный перечень биологических эффектов фуллеренов, приходится признать, что механизмы действия многих из них до сих пор не изучены, ощущается дефицит знаний о фармакодинамике и фармакокинетике исследуемых наночастиц, не разработаны схемы лечения легочных, онко-, нейродегенеративных и других заболеваний с применением фуллеренов. Поэтому данное направление требует дальнейшего, более детализированного научного исследования.

В связи с этим, целью данной работы было изучение свойств НСК при действии водорастворимого металлизированного фуллеренола C_{60} (NaFL).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВЫДЕЛЕНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРОВ И ОЦЕНКА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

В стерильных условиях из мозга мышей (17-18 дней эмбрионального развития) линии *FVB*, выделяли гиппокампы, которые механически диссоциировали в среде *Neurobasal medium* (*Gibco*, США). Полученную суспензию клеток пропускали через нейлоновые клеточные фильтры (*Falcon*, США) с диаметром пор 40 мкм. Очищенную фракцию НСК получали центрифугированием суспензии клеток в градиенте плотности (22% Percoll). Процент жизнеспособных клеток в суспензии определяли методом проточной цитометрии при помощи лазерного цитофлюориметра-сортера *FACSaria* (*Becton Dickinson*, США) после инкубирования суспензии клеток с 7-аминоактиномицином D (7-AAD).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРОВ С ДОБАВЛЕНИЕМ NaFL

Нейральные прогениторы были высажены на стекла, покрытые *Matrigel* в 24-луночной плашке, в количестве $8 \cdot 10^4$ клеток в каждой лунке. Культуры клеток помещались в CO_2 -инкубатор (температура 37 °C, 5% CO_2). Первые двое суток клетки культивировались в стандартной среде *Neurobasal medium* (*Gibco*, США) с добавлением *FGF-2* – фактора роста, который влияет на пролиферацию нейральных прогениторов. При отсутствии *FGF-2* в среде культивирования клетки начинают спонтанно дифференцироваться или образуют нейросферы.

Нейральные прогениторы культивировались в разных условиях:

- 1 – стандартные условия, в среде культивирования присутствует *FGF-2*.
- 2 – стандартные условия + *NaFL* в концентрации 20 нМ.
- 3 – в среде культивирования отсутствует *FGF-2*.
- 4 – среда культивирования без *FGF-2* + *NaFL*, 20 нМ.

Клетки культивировались 9 дней с момента посадки; в присутствии *NaFL* – 7 дней.

ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРОВ

Известно, что пролиферативная (митотическая) активность НСК зависит от наличия в среде определенных факторов роста (*FGF-2*, *EGF*, *NGF*, *BDNF*, *NT-3*, *NT-4*) [7, 37-39]. Именно факторы микроокружения в большинстве случаев и определяют дальнейшую судьбу нейральных прогениторов.

Пролиферативную активность нейральных прогениторов, выделенных из гиппокампа 17-18-дневных эмбрионов мыши, наблюдали при помощи инвертированного светового микроскопа (*Zeiss Telavar 31*, Германия). На 9-й день после эксплантации максимальная плотность клеток на единицу площади наблюдалась в лунках, куда был внесен металлофуллеренола C_{60} в концентрации 20 нМ.

Культуры клеток фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 30 мин, отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (ФБ) и заключали в бальзам. Количество нейральных стволовых клеток и нейросфер считали при помощи инвертированного микроскопа с рельефным фазовым контрастом (*Olympus IX 71*, Япония).

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НСК

Для идентификации нейральных прогениторов и возможного пути их дифференциации использовали двойное иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры *Nestin*, *β -tubulin III*. *Nestin* – специфический маркер нейрональных стволовых предшественников, постмитотических нейронов и ранних нейробластов [40]; *β -tubulin III* – специфический маркер цитоскелета зрелых нейронов.

Клеточные культуры фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 30 мин, отмывали 0,1 М раствором ФБ, обрабатывали 0,3%-ным раствором *TritonX-100*, 0,5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (*BSA*). Последующие 24 часа инкубировали в смеси мышиных моноклональных *anti-Nestin* (титр 1:300) и кроличьих поликлональных *anti- β -tubulin III* (титр 1:750) первичных антител.

После отмывания 0,1 М ФБ культуры клеток обрабатывали смесью вторичных антимышиных *Alexa Fluor 488* (*Invitrogen*, США) в титре 1:1000; антикроличьих *Alexa Fluor 647* (*Invitrogen*, США) в титре 1:1000 антител в течение 1 ч. Затем клетки отмывали в растворе ФБ и заключали в среду *FluoMount*.

Оптические исследования проводились при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа *FluoView™ FV1000* (*Olympus*, Япония). Флуоресценцию визуализировали, используя селективные фильтры (488 нм для *Alexa Fluor 488* и 647 нм для *Alexa Fluor 647*). Данный метод позволил выявить наличие пролиферирующих нейральных прогениторов и проследить морфологические характеристики нейросфер.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ СК ГИППОКАМПА

Культуры нейральных прогениторов фиксировали в 2,5%-ном растворе глutarальдегида и в 2%-ном растворе параформальдегида в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем культуры клеток промывали 0,1 М ФБ и дополнительно фиксировали в 1%-ном растворе *OsO₄* в течение 1 часа; дегидратировали в этаноле (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, абсолютный спирт) и в 100%-ном ацетоне. Культуры клеток заключали в эпоксидные смолы и заканчивали полимеризацией при 56 °C.

Препараты СК, заключенные в смолу, прикрепляли к плоской поверхности блоков при помощи клея “*Цианопан*” (Польша). Ультратонкие срезы (500 Å) нарезали на микротоме (*LKB Vrotoma 8800*, Швеция), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата

свинца. Морфологические характеристики нейральных прогениторов оценивали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа *JEM-100 CX* (*JEOL*, Япония).

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Статистическую обработку проводили использованием *t*-критерия Стьюдента, достоверность различий принималась при $P < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью метода проточной цитометрии было установлено, что процент жизнеспособных клеток после инкубации суспензии с *7-AAD* составлял от 89,8% до 93,5%.

Нейральные прогениторы культивировали 9 дней с момента посадки; в присутствии *NaFL* – 7 дней с *FGF-2* и без *FGF-2*.

Известно, что *FGF-2* вызывает пролиферацию мультипотентных клеток-предшественников нейронов и глии в субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга. *FGF-2* совместно с *NGF* (фактор роста нейронов) позволяют поддерживать генерацию и жизнеспособность нейронов – дериватов клеток субвентрикулярной зоны и тем самым способствуют нейрогенезу в зрелом человеческом мозге как за счет его естественных резервов, так и за счет имплантации клеток-предшественников [41]. При исследовании фармакокинетики *FGF-2* было установлено, что после подкожного введения крысам в дозе 5 нг/г массы тела быстро нарастала его концентрация в крови и параллельно в ликворе головного мозга, что говорит о его свободном прохождении через гематоэнцефалический барьер. У взрослых животных он повышал количество митозов НСК в субвентрикулярной зоне и обонятельных трактах, регулируя текущий нейрогенез особым гуморальным способом [38]. Таким образом, *FGF-2* осуществляет сложную регуляцию генерации *de novo* клеток мозга [7]. При культивировании стволовых мультипотентных клеток фактор роста вызывает интенсивную пролиферацию, а его удаление из среды культивирования индуцирует их дифференцировку в нейроны и глию [39].

В нашем случае нейральные прогениторы, которые культивировались с добавлением *FGF-2*, сохраняли пролиферативный потенциал без образования нейросфер (рис. 1 А). В лунках, где отсутствовал *FGF-2*, сохранялось небольшое количество нейральных прогениторов, а также наблюдалось появление нейросфер, что указывает на утрату нейральными прогениторами пролиферативного потенциала (рис. 1 В).

Количественный микроскопический анализ НСК при различных условиях культивирования показал, что в контрольных образцах, где в культуральной среде присутствовал *FGF-2*, находилось 543 ± 61 клеток на мм^2 (рис. 1 А; рис. 2). В то же время количество НСК при добавлении *NaFL* в концентрации 20 нМ практически не изменялось: 530 ± 66 клеток на мм^2 (рис. 1 Б; рис. 2).

В тех лунках, где клетки культивировались без *FGF-2*, наблюдалось появление нейросфер, количество нейральных прогениторов составляло 200 ± 77 клеток на мм^2 ($P < 0,001$) (рис. 1 В; рис. 2). При добавлении *NaFL* в концентрации 20 нМ (в культуральной среде отсутствовал фактор роста) мы наблюдали значительное увеличение количества НСК: 426 ± 101 клеток на мм^2 ($P < 0,001$) (рис. 1 Г; рис. 2). Полученные данные указывают, что при наличии в среде культивирования *NaFL* в концентрации 20 нМ, но без фактора роста, количество нейральных прогениторов приблизительно в 2 раза больше, чем в контрольных лунках. Можно предположить, что *NaFL*, по неизвестному пока еще механизму действия, увеличивает пролиферативный потенциал нейральных прогениторов.

Метод иммуноцитохимического окрашивания культуры клеток дал возможность визуализировать нейральные прогениторы

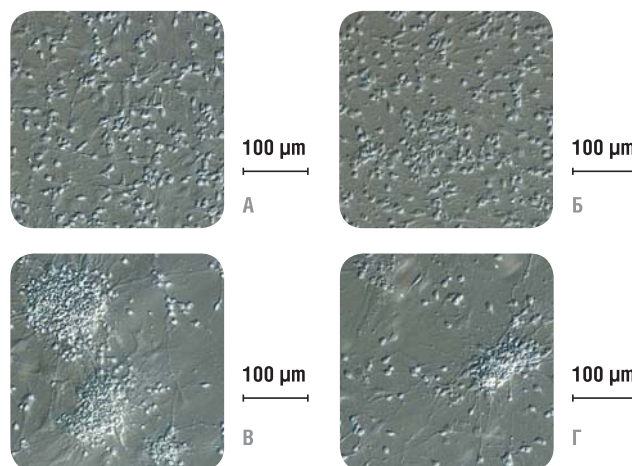


Рис. 1. Микрофотография НСК и нейросфер, 7 дней в культуре; А – контроль (НСК+*FGF-2*); Б – НСК+ *FGF-2* с добавлением *NaFL*; В – НСК без *FGF-2*, образование нейросфер; Г – НСК+ *NaFL*, без *FGF-2*.

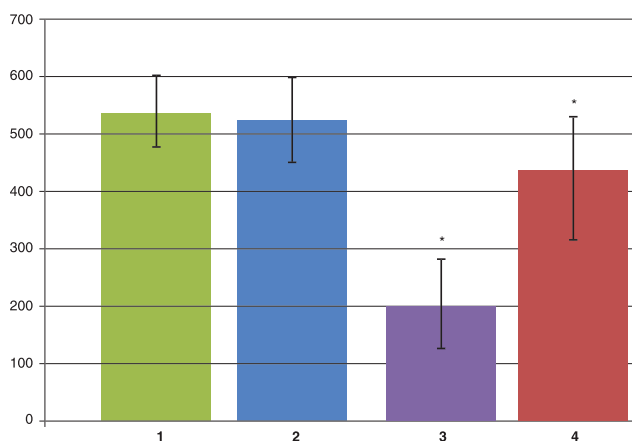


Рис. 2. Количество НСК при разных условиях культивирования, 7 дней: 1 – стандартные условия, в среде присутствует *FGF-2*; 2 – стандартные условия + *NaFL* в концентрации 20 нМ; 3 – в среде отсутствует *FGF-2*; 4 – среда культивирования без *FGF-2* + *NaFL*, 20 нМ

и нейросферы при различных вариантах культивирования. Нейральные прогениторы при культивировании в обычной среде и в среде с *NaFL* в концентрации 20 нМ, морфологически были одинаковыми и проявляли практически одинаковую пролиферативную активность (рис. 3 А-Е). Данный результат дает нам возможность предположить, что *NaFL* в концентрации 20 нМ в этом варианте культивирования не является токсичным, но и не влияет на активность пролиферации НСК.

При иммуноцитохимическом анализе клеточной культуры НСК, которая культивировалась в среде без добавления *FGF-2*, наблюдали образование нейросфер, а также наличие небольшого количества нейральных прогениторов. Рост культур клеток по типу образования нейросфер в настоящее время уже не считается чем-то исключительным. Этот факт открывает новые возможности для тщательного изучения клеток в пределах одной нейросферы и их субтипирования [42]. Очевидно, что при образовании нейросферы проявляются более сложные функции недифференцированных нейральных клеток, чем при культивировании на адгезивных средах,

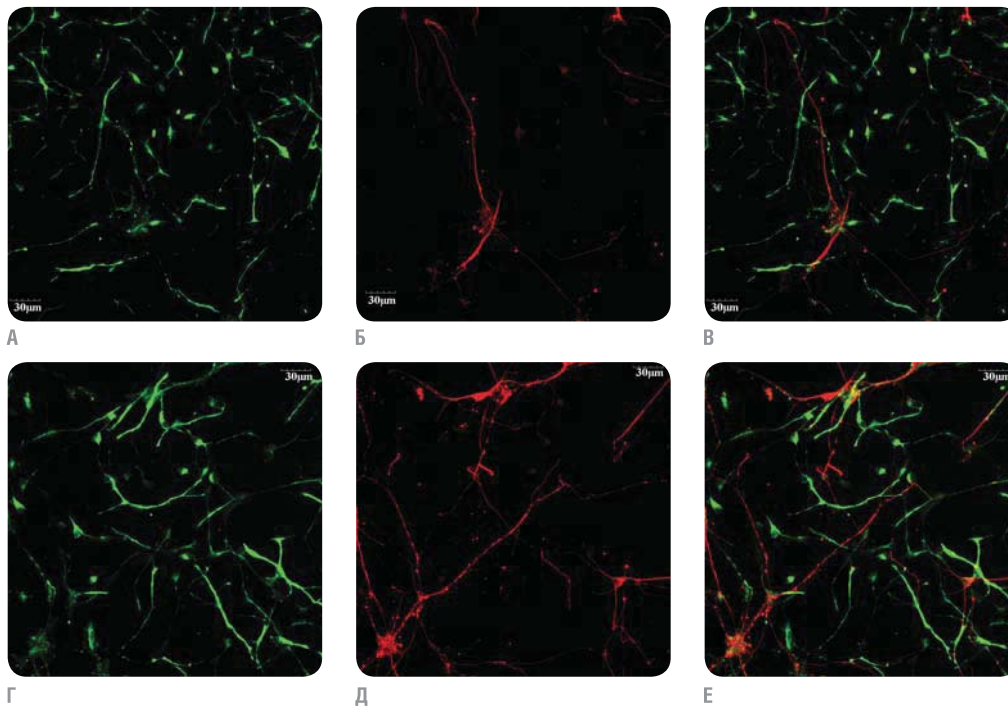


Рис. 3. Микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания нейральных прогениторов, культивируемых 7 дней в среде, содержащей *FGF-2*, (Об. $\times 40$):

А – контроль, *Nestin*-позитивные клетки (зеленый цвет);
Б – контроль, окрашивание на β -*tubulin III* (красный цвет);
В – контроль, комбинированное окрашивание на *Nestin*+ β -*tubulin III*;
Г – *HSK + NaFL*, окрашивание на *Nestin* (зеленый цвет);
Д – *HSK + NaFL*, окрашивание на β -*tubulin III* (красный цвет);
Е – *HSK + NaFL*, комбинированное окрашивание на *Nestin*+ β -*tubulin III*.

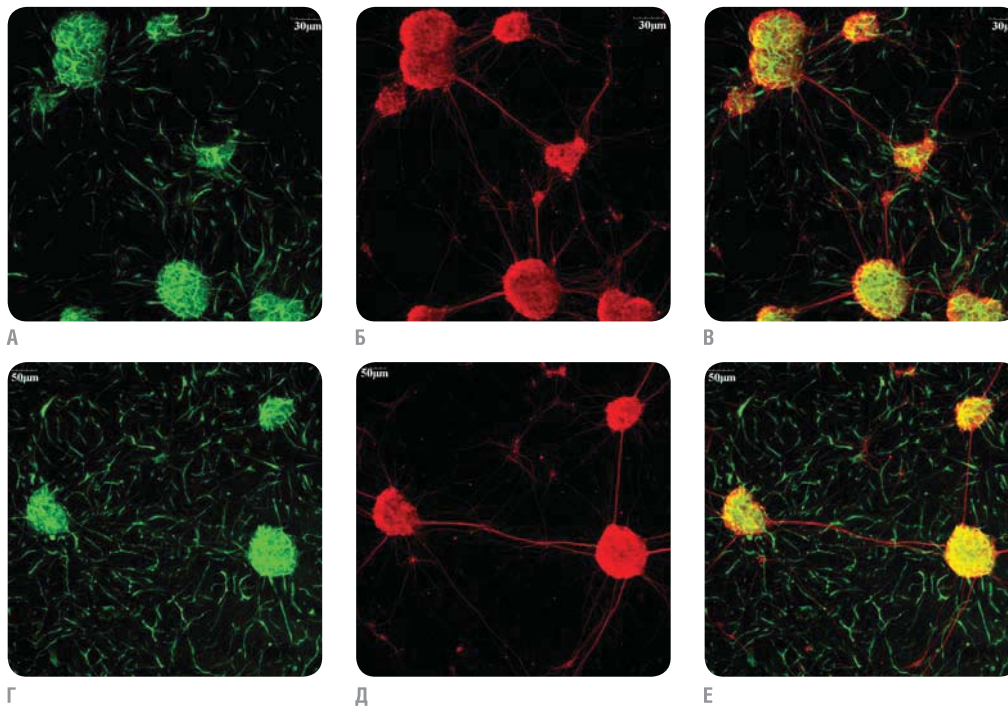


Рис. 4. Микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания нейральных прогениторов и нейросфер, культивируемых 7 дней в среде без *FGF-2* (Об. $\times 20$):

А – контроль, окрашивание на *Nestin* (зеленый цвет);
Б – контроль, окрашивание на β -*tubulin III* (красный цвет);
В – контроль, комбинированное окрашивание на *Nestin*+ β -*tubulin III*;
Г – *HSK + NaFL*, окрашивание на *Nestin* (зеленый цвет);
Д – *HSK + NaFL*, окрашивание на β -*tubulin III* (красный цвет);
Е – *HSK + NaFL*, комбинированное окрашивание на *Nestin*+ β -*tubulin III*.

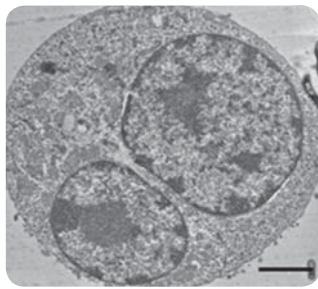
поскольку возникновение такой уникальной многоклеточной структуры, как нейросфера, требует наличия у НСК способности к сложным межклеточным взаимодействиям [43].

Примечательно, что на сегодняшний день НСК является единственным видом стволовых клеток, для которого описана возможность образования подобных самодостаточных колоний в промитотической среде [7].

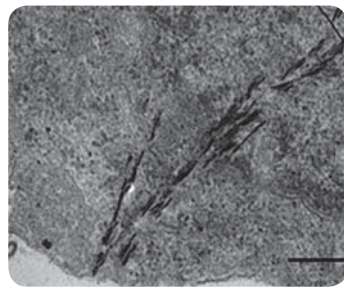
В нашем исследовании было показано, что при добавлении *NaFL* в концентрации 20 нМ в среду культивирования, которая не содержала *FGF-2*, увеличивается количество нейральных прогениторов и уменьшается количество нейросфер (рис. 4 Г-Е). Данный результат еще раз подтверждает, что *NaFL* в концентрации 20 нМ увеличивает пролиферативный потенциал НСК.

Электронно-микроскопический анализ показал, что при культивировании нейральных прогениторов в среде, которая содержала *FGF-2*, наблюдалась митотическая активность, что и свойственно данному типу клеток (рис. 5 А). Если же в среду культивирования добавлялся *NaFL*, то уже к 7 дню он наблюдался не только вне клеток, но и локализовался возле клеточной мембраны, в самой мембране и в цитоплазме клетки (рис. 5 Б, В, Г, Д).

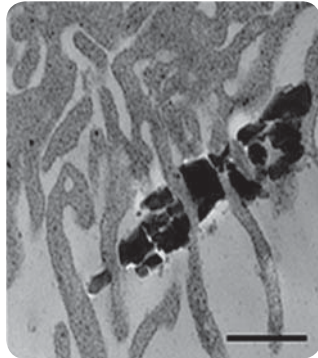
Электронно-микроскопические исследования показали, что металллофуллеренат C_{60} может присутствовать не только в растворе, но и в клетке, и ее цитоплазме, куда проникает непосредственно через клеточную мембрану, не повреждая ее. При этом вещество не проявляет специфичной тропности к органеллам нейральных прогениторов.



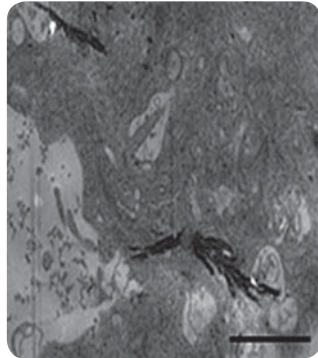
А



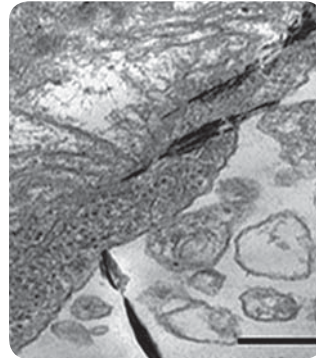
Б



В



Г



Д



Рис. 5. Электронно-микроскопическая фотография культивируемых НСК:

А – делящаяся клетка, контроль;

Б – локализация *NaFL* в мембране и в цитоплазме клетки;

В – локализация *NaFL* возле отростков клетки;

Г – локализация *NaFL* в цитоплазме клетки;

Д – локализация *NaFL* возле мембраны и в цитоплазме клетки.

Масштабная линейка: А = 0,7 мкм; Б, В, Г, Д = 0,3 мкм.

ВЫВОДЫ

БЫЛО ПОКАЗАНО, ЧТО В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* КОЛИЧЕСТВО КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НСК ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ВОДОРАСТВОРИМОГО МЕТАЛЛИРОВАННОГО Фуллеренола C₆₀ В КОНЦЕНТРАЦИИ 20 НМ УВЕЛИЧИВАЕТСЯ ПОЧТИ В 2 РАЗА ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ. ПРИ ЭТОМ СОХРАНЯЕТСЯ ИХ ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ В ТЕЧЕНИЕ ВСЕГО ПЕРИОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, А ТАКЖЕ УМЕНЬШАЕТСЯ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙРОСФЕР. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАЛ, ЧТО *NaFL* НЕПОСРЕДСТВЕННО ПРОНИКАЕТ В КЛЕТКУ ЧЕРЕЗ КЛЕТЧНУЮ МЕМБРАНУ, НЕ ПОВРЕЖДАЯ ЕЕ, И ЛОКАЛИЗУЕТСЯ В ЦИТОПЛАЗМЕ КЛЕТКИ.

ТАКИМ ОБРАЗОМ, РЕЗУЛЬТАТЫ ДАННОЙ РАБОТЫ ПОЗВОЛЯЮТ СДЕЛАТЬ ПРЕДПОЛОЖЕНИЕ О ТОМ, ЧТО *NaFL*, ВЛИЯЯ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, МОЖЕТ БЫТЬ ПЕРСПЕКТИВНЫМ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ И КЛЕТочНОЙ БИОЛОГИИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Репин В. С. Эмбриональная стволовая клетка: от фундаментальных исследований в клинику // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 2004 – №2. – С. 3–8.
2. Price J., Williams B. Neural stem cells // Curr. Opin. Neurobiol. – 2001. – **11**, № 5. – P. 564–87.
3. Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system // Nat. Biotechnol. – 2005. – **23**, № 7. – P. 862–871.
4. Ourednik V., Ourednik J., Xu Y. et al. Cross-talk between stem cells and the dysfunctional brain is facilitated by manipulating the niche: evidence from an adhesion molecule // Stem Cells. – 2009. – **27**, №11. – P. 2846–2856.
5. Prestoz L., Relvas J., Hopkins K. et al. Association between integrin-dependent migration capacity of neural stem cells in vitro and anatomical repair following transplantation // Mol. Cell Neurosci. – 2001. – **18**, №5. – P. 473–484.
6. Svendsen C., Smith A. New prospects for human stem cell therapy in the nervous system // Trends Neurosci. – 1999. – **22**, №8. – P. 357–364.
7. Gage F. Mammalian neural stem cell // Science. – 2000. – **287**, № 5457. – P. 1433–1438.
8. Бурлакова Е. Б., Конрадов А. А., Мальцева Е. Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Химическая физика. – 2003 – **22**, № 2. – С 21–40.
9. Хадарцев А. А., Туктамышев И. Ш. Шунгит в медицине. Информационный материал. – Тула, 2005. – С. 5–6.
10. Tikhomirov A. A., Andrievsky G. V. Chronic alcoholization-induced damage to astroglia and intensification of lipid peroxidation in the rat brain protector effect of hydrated form of fullerene C₆₀ // Neurophysiology. – 2007. – **39**, № 2. – P. 119–125.
11. Скупачев В. П. H2O2-сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма // Пульмонология. – 2000. – № 2. – С 6–9.
12. Wang I., Tai L., Lee D. et al. C₆₀ and Water-Soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation // J. Med. Chem. – 1999. – **4**, № 42(22). – P. 4614–4620.
13. Bensasson R., Bretteich M., Frederiksen J. et al. Reactions of (aq), CO₂⁻, HO[•], O₂⁻ and O₂ with a dendro[60]fullerene and C₆₀[C(COOH)₂]_n (n = 52–6) // Free Radical Biology and Medicine. – 2000. – **29**, №1. – P. 26–33.

14. Ali S., Hardt J., Quick K. et al. Biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2004. – **37**, № 8. – P. 1191–1202.
15. Chueh S., Lai M., Lee M. et al. Decrease of free radical level in organ perfusate by a novel water-soluble carbon-sixty, hexa (sulfobutyl) fullerenes // *Transplant Proc.* – 1999. – **31**, №5. – P. 1976–1977.
16. Avdeev M., Khokhryakov A., Tropin T. Structural features of molecular-colloidal solutions of C₆₀ fullerenes in water by small-angle neutron scattering // *Langmuir*. – 2004. – **20**, № 11. – P. 4363–4368.
17. Mchedlov-Petrossyan N., Klochkov V., Andrievsky G. Colloidal dispersions of fullerene C₆₀ in water: some properties and regularities of coagulation by electrolytes // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* – 1997. – **93**. – P. 4343–4346.
18. Huang S., Mashino T., Mochizuki M. et al. Effect of hexasulfobutylated C₆₀ on the isolated aortic ring of guinea pig // *Pharmacology*. – 2000. – **64**. – P. 91–97.
19. Запороцкая И. В., Чернозатонский Л. А. Исследование механизма положительного влияния фуллерена на процессы восстановления про-странственной памяти // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2005. – Т.2. – С. 117–119.
20. Yang D., Wang M., Chen I. et al. Systemic administration of a water-soluble hexasulfonated C(60) (FC(4)S) reduces cerebral ischemia-induced infarct volume in gerbils // *Neurosci. Lett.* – 2001. – **311**, №2. – P. 121–124.
21. Kim J., Lee M. Fullerene inhibits beta-amyloid peptide aggregation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – **303**, №2. – P. 576–579.
22. Marsagishvili L., Bobylev A., Shpagina M. et al. Effect of fullerenes C₆₀ on X-protein amyloids // *Biofizika*. – 2009. – **54**, № 2. – P. 202–205.
23. Bobylev A., Kornev A., Bobyleva L. et al. Fullerenolates: metallated polyhydroxylated fullerenes with potent anti-amyloid activity // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. – **9**. – P. 5714–5519.
24. Ширинкин С. В. Медицинские нанотехнологии. Использование природных фуллеренов при патологии памяти, внимания и реакций // *Мир психологии*. – 2007. – **3**, № 51. – С. 170–174.
25. Andrievsky G., Zhmuro A., Zabobonina L. First clinical case of treatment of patient (volunteer) with rectal adenocarcinoma by hydrated fullerenes: natural course of the disease or non-specific anticancer activity // *The Electrochemical Society Interface, Canada: Spring*. – 2000. – P. 700.
26. Chem C., Xing G., Wang J. et al. Multihydroxylated (Gd@C82(OH)22)_n nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity // *Nanoletters*. – 2005. – **5**. – P. 2050–2057.
27. Ryan J., Bateman H., Stover A. et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response // *J. Immunology*. – 2007. – **179**, № 1. – P. 665–672.
28. Huang Y., Shen C., Luh T. et al. Blockade of apoptotic signaling of transforming growth factor-beta in human hepatoma cells by carboxyfullerene // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – **254**, № 1. – P. 38–43.
29. Lin Y., Lei H., Luh T. et al. Light-independent inactivation of dengue-2 virus by carboxyfullerene C3 isomer // *Virology*. – 2000. – **276**, №1. – P. 258–262.
30. Piotrovsky L., Dumpis M., Poznykova L. et al. Study of the biological activity of the adducts of fullerenes with poly(N-vinylpyrrolidone) // *Mol. Mat.* – 2000. – **13**. – P. 41–50.
31. Миллер Г. Г., Куц А. А., Романова В. С. Средство для ингибирования ВИЧ и ЦМВ-инфекций и способ их ингибирования / RU 2196602. – 2003. – С. 1.
32. Tsao N., Luh T., Chou C. et al. In vitro action of carboxyfullerene // *J. Antimicrobial Chemother.* – 2002. – **49**, № 4. – P. 641–649.
33. Bosi S., Da Ros T., Spalluto G. et al. A new multi- charged C₆₀ derivative: synthesis and biological properties // *Eur. J. Org. Chem.* – 2002. – **17**. – P. 2928–2934.
34. Kornev A., Peregodov A., Martynenko V. et al. Synthesis and antiviral activity of highly water-soluble polycarboxylic derivatives of [70]fullerene // *Chem. Commun.* – 2011. – **47**, № 29. – P. 8298–8300.
35. Chawla P., Chawla V., Maheswari R. et al. Fullerenes: From carbon to nanomedicine // *Mini Reviews in Medicinal Chem.* – 2010. – **10**, № 8. – P. 662–677.
36. Kornev A., Khakina E., Troyanov S. et al. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60]fullerene using chlorofullerene C60Cl6 as a precursor // *Chem. Commun.* – 2012. – **48**, № 44. – P. 5461–5463.
37. Ciccolini F. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development // *Mol. Cell Neurosci.* – 2001. – **17**, № 5. – P. 895–907.
38. Sun Y Shi J., Lu P. Neurotrophic factors and neural stem cells (abstract) // *Sheng Li Ke Xue Jin. Zhan.* – 2002. – **33**, № 4. – P. 313 – 316.
39. Israsena N., Hu M., Fu W. et al. The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells // *Dev. Biol.* – 2004. – **268**, № 1. – P. 220–231.
40. Andressen C., Stocker E., Klinz F. Nestin-Specific Green Fluorescent Protein Expression in Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursor Cell Used for Transplantation // *Stem Cell*. – 2001. – **19**, №5. – P. 419–424.
41. Caldwell M.A., He X., Wilkie N. et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres // *Nature Biotechnol.* – 2001. – **19**, № 5. – P. 475 – 480.
42. Bez A., Corsini E., Curti D. et al. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization // *Brain Res.* – 2003. – **993**, № 1–2. – P. 18–29.
43. Campos L. Neurospheres: insights into neural stem cell biology // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – **78**, № 6. – P. 761–769.