

# ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ Фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-24</sub> В ОТНОШЕНИИ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Тимганова В.П.<sup>1</sup>, Бочкова М.С.<sup>1,2</sup>, Усанина Д.И.<sup>1,2</sup>, Долгих М.Д.<sup>1,2</sup>,  
Лазарев С.С.<sup>1</sup>, Раев М.Б.<sup>1,2</sup>, Заморина С.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Резюме.** Полигидроксिलированные фуллерены (фуллеренолы) C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub> являются наиболее перспективными аллотропами углерода благодаря гидрофильности, стабильности и низкой токсичности. В то же время НК-клетки, ключевые клетки противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа, практически не изучены как мишень для наночастиц фуллеренола. Целью исследования являлась оценка иммуносовместимости гидроксильного фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-24</sub> с CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>НК-клетками периферической крови человека, а также исследование интернализации наночастиц в клетки. Исследования были проведены на мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров (n = 4). В экспериментах использовали фуллеренол (MST-WS60-Bio (fullerenol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> 99,99%, МСТ-Нано, Россия; размер кластеров ~130 нм) в концентрациях 200, 100, 50, 25, 12,5, 5, 2,5, 0,5 и 0,25 мкг/мл. Контролем служили лунки без добавления наночастиц. Клетки инкубировали в присутствии фуллеренола в течение 24, 48 и 72 часов в условиях 5% CO<sub>2</sub> и 37 °С. Оценивали жизнеспособность НК-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), а также адгезию/интернализацию фуллеренола в клетки с применением проточной цитометрии. Установлено, что наночастицы фуллеренола в концентрациях 0,2-200 мкг/мл не обладают цитотоксичностью в отношении НК-клеток в изучаемые сроки наблюдения (24, 48, 72 ч). Так, не выявлено статистически значимого уменьшения процента и абсолютного количества живых НК-клеток в 24-, 48-, 72-часовых культурах с фуллеренолом. Показано, что НК-клетки не демонстрируют адгезию/интернализацию наночастиц фуллеренола в низких концентрациях – 0,25-50 мкг/мл во все периоды наблюдения (24, 48, 72 ч), однако высокие концентрации фуллеренола были зафиксированы внутри НК-клеток на 48 и 72 ч наблюдения. Установлено, что на 72 ч наблюдения ~10% НК-клеток адгезировали/интернализировали фуллеренол в концентрации 100 мкг/мл и 50% НК-клеток адгезировали/интернализировали фуллеренол в концентрации

**Адрес для переписки:**

Заморина Светлана Анатольевна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-77-94.  
Факс: 8 (342) 280-92-11.  
E-mail: mantissa7@mail.ru

**Address for correspondence:**

Svetlana A. Zamorina  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation  
Phone: +7 (342) 280-77-94.  
Fax: +7 (342) 280-92-11.  
E-mail: mantissa7@mail.ru

**Образец цитирования:**

В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, Д.И. Усанина,  
М.Д. Долгих, С.С. Лазарев, М.Б. Раев, С.А. Заморина  
«Оценка цитотоксичности фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-24</sub>  
в отношении НК-клеток периферической крови  
человека *in vitro*» // Российский иммунологический  
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 533-540.  
doi: 10.46235/1028-7221-17126-COF

© Тимганова В.П. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

V.P. Timganova, M.S. Bochkova, D.I. Usanina,  
M.D. Dolgikh, S.S. Lazarev, M.B. Rayev, S.A. Zamorina  
“Evaluation of cytotoxicity of fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-24</sub> towards  
human peripheral blood NK cells *in vitro*”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,  
Vol. 28, no. 3, pp. 533-540.  
doi: 10.46235/1028-7221-17126-COF

© Timganova V.P. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17126-COF

200 мкг/мл. Таким образом, впервые показано, что НК-клетки адгезируют/интернализуют фуллеренол в больших концентрациях (100 и 200 мкг/мл), причем процент фуллеренол (PC7)-позитивных клеток возрастает с увеличением продолжительности культивирования и увеличением концентрации наночастиц. Фуллеренол также не оказывал цитотоксического действия на изучаемую субпопуляцию клеток.

*Ключевые слова:* фуллеренол  $C_{60}(OH)_{22-24}$ , НК-клетки, жизнеспособность, поглощение наночастиц, биосовместимость, культивирование *in vitro*

## EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF FULLERENOL $C_{60}(OH)_{22-24}$ TOWARDS HUMAN PERIPHERAL BLOOD NK CELLS *IN VITRO*

Timganova V.P.<sup>a</sup>, Bochkova M.S.<sup>a, b</sup>, Usanina D.I.<sup>a, b</sup>, Dolgikh M.D.<sup>a, b</sup>, Lazarev S.S.<sup>a</sup>, Rayev M.B.<sup>a, b</sup>, Zamorina S.A.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

**Abstract.** Polyhydroxylated fullerenes, commonly referred to as fullerlenols, are among the most promising carbon allotropes due to their hydrophilic nature, stability, and low toxicity. Natural Killer (NK) cells are key players of the antiviral and antitumor immune response. However, they have been largely understudied as targets for fullerlenol nanoparticles. The aim of this work was to assess the immunocompatibility of hydroxylated fullerlenol  $C_{60}(OH)_{22-24}$  with  $CD3^+CD56^+$  NK cells from human peripheral blood, as well as to study internalization of these nanoparticles into the cells. The studies were conducted with mononuclear cells from peripheral blood of healthy donors ( $n = 4$ ). Fullerlenol (MST-WS60-Bio, fullerlenol  $C_{60}(OH)_{24}$  99.99%, MST-Nano, Russia; cluster size approximately 130 nm) was used at concentrations of 200, 100, 50, 25, 12.5, 5, 2.5, 0.5, and 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Wells without added nanoparticles served as controls. Cells were incubated in the presence of fullerlenol for 24, 48, and 72 hours under conditions of 5%  $\text{CO}_2$  and 37 °C. The viability of NK cells ( $CD3^+CD56^+$ ) and the adhesion/internalization of fullerlenol into the cells were assessed using flow cytometry. We have found that fullerlenol nanoparticles at concentrations ranging from 0.25 to 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  did not exhibit cytotoxicity towards NK cells during the observation periods of 24, 48, and 72 hours. Thus, no statistically significant decrease in the percentage and absolute number of live NK cells was detected in cultures with fullerlenol over these time period. The study also showed that NK cells did not demonstrate adhesion/internalization of fullerlenol nanoparticles at low concentrations (0.25-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) during all observation periods. However, high concentrations of fullerlenol were detected inside NK cells at 48 and 72 hours of observation. After 72 hours, approximately 10% of NK cells did adhere/internalize fullerlenol particles at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , with about 50% of cells consumed the particles at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Thus, for the first time, it was demonstrated that NK cells adhere/internalize fullerlenol at high concentrations (100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and the percentage of fullerlenol-positive cells increases at both longer cultivation period and higher nanoparticle concentration. Fullerlenol didn't exhibit cytotoxic effects on the studied cell population.

*Keywords:* fullerlenol  $C_{60}(OH)_{22-24}$ , NK cells, viability, nanoparticle internalization, biocompatibility, *in vitro* cultivation

Исследование проводили при финансовой поддержке РНФ, проект 24-15-00432 «Комплексное исследование иммуносовместимости фуллеренола  $C_{60}(OH)_{22-24}$ ».

### Введение

Полигидроксированные фуллерены (фуллеренолы)  $C_{60}(OH)_n$  являются наиболее перспективными аллотропами углерода. Наноме-

тровый размер, большое отношение площади поверхности к объему, способность проникать через клеточные мембраны, адаптивная поверхность, которую можно легко модифицировать различными функциональными группами, высвобождение лекарств, высокая физическая стабильность в биологических средах, способность удалять свободные радикалы, магнитные и оптические свойства делают наночастицы фуллерено-

ла желанными кандидатами для различных биомедицинских приложений [14]. Благодаря легкой функционализации, фуллеренолы могут применяться для доставки в клетку лекарств и генетических векторов, а также в качестве адъювантов вакцин [1, 11].

Использование наноразмерных соединений углерода в биомедицинских разработках является «вызовом» иммунной системе, ранее не сталкивавшейся с подобными объектами. Однако исследования цитотоксичности фуллерена и его производных противоречивы: в ряде случаев фуллерен и его производные не влияют на жизнеспособность человеческих лейкоцитов, моноцитов и макрофагов *in vivo*, но в то же время наночастицы фуллеренола способны стимулировать функциональную активность макрофагов [16].

На данный момент нет информации о том, как наночастицы фуллеренола взаимодействуют с НК-клетками. НК-клетки — это лимфоидные цитотоксические клетки врожденного иммунитета, которые циркулируют в организме, представляя собой первую линию защиты от опухолевых и инфекционных заболеваний. Цитотоксические способности НК-клеток реализуются через лизис клеток-мишеней путем секреции цитолитических гранул гранзима и перфорина либо путем индукции апоптоза через TRAIL и FASL [7]. Помимо этого, натуральные киллеры способны секретировать большое количество цитокинов и хемокинов, в том числе  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , GM-CSF и CCL5, модулируя адаптивный иммунный ответ [12].

Взаимодействие НК-клеток с наночастицами, как правило, изучается в контексте их противоопухолевого потенциала. Однако реакция НК-клеток на сами наночастицы, таким образом, остается без внимания. В немногочисленных работах отмечается способность НК-клеток интернализировать наноматериалы: нанозвезды, а также частицы, покрытые ПЭГом и глюкозой [10, 15]. При этом наночастицы способны индуцировать дегрануляцию НК-клеток: такой эффект обнаружен при использовании частиц оксида графена и оксида железа [13]. Однако интернализация не всегда ведет к высвобождению содержимого гранул [4]. Таким образом, НК-клетки по-разному реагируют на присутствие наночастиц, в зависимости от множества факторов.

**Целью исследования** являлась оценка иммуносовместимости наночастиц гидроксированного фуллеренола ( $C_{60}(OH)_{22-24}$ ) с НК-клетками периферической крови человека в условиях *in vitro*. Для достижения поставленной цели, изучалась жизнеспособность НК-клеток после взаимодействия с наночастицами  $C_{60}(OH)_{22-24}$ , а также адгезия/интернализация наночастиц в клетки.

## Материалы и методы

### Характеристика используемого в работе фуллеренола $C_{60}(OH)_{22-24}$

В работе использовли фуллеренол (MST-WS60-Bio (fullerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  99,99%), МСТ-Нано, Россия.

Физико-химическая характеристика фуллеренола была проведена в ИТХ УрО РАН (г. Пермь) к.т.н. Кисельковым Д.М. ИК-спектр подтвердил, что спектральные линии соответствуют полигидроксированным фуллеренам, ТГМ/ДСК анализ показал, что распад фуллеренола происходит в интервале 70–830 °С, электронный спектр водного раствора продемонстрировал отсутствие непрореагировавшего исходного фуллерена в исследуемом образце. Анализ спектров методом ЯМР  $^1H$ ,  $^{13}C$  показал отсутствие органических примесей.

Рабочая суспензия фуллеренола (при концентрации 10 мг/мл) имела монодисперсный характер со средним размером агрегатов 130 нм, дзета-потенциал равен 34,44 мВ.

Количественное содержание эндотоксина в растворе фуллеренола оценивали с помощью LAL-теста (Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Scientific, США)). Установлено, что при низких концентрациях стандарта эндотоксина (0,01–0,1 EU/мл) было обнаружено менее 0,01 EU/мл (0,006 EU/мл) эндотоксина в образцах фуллеренола, что соответствует общепринятым рекомендациям [8].

### Объекты исследования

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на работу с образцами периферической крови было получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 22.05.2024. У всех пациентов было получено информированное согласие. В работе использовали гепаринизированную кровь условно здоровых доноров ( $n = 4$ , возраст 18–25 лет). Мононуклеары выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см<sup>3</sup>). Клетки культивировали в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл.

### Дизайн исследования

Выделенные мононуклеарные клетки крови по 200 тыс. вносили в лунки 96-луночного планшета, после чего добавляли фуллеренол до конечных концентраций 200, 100, 50, 25, 12,5, 5, 2,5, 0,5 и 0,25 мкг/мл. Контролем служили лунки без добавления наночастиц. Клетки инкубировали в присутствии фуллеренола в течение 24, 48 и 72 часов во влажной атмосфере  $CO_2$ -инкубатора (5%  $CO_2$ , 37 °С).

По окончании инкубации клетки окрашивали антителами к поверхностному маркеру НК-клеток CD 56-AF700 (Biotechne, США), и к поверхностному маркеру Т-клеток CD 3-PerCP (Miltenyi Biotech, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали, применяя краситель Zombie Aqua (ZA) (BioLegend, США). Результаты представляли в процентах живых ZA-клеток в целевой субпопуляции CD3-CD56<sup>+</sup>. Дополнительно оценивали абсолютное количество живых клеток в целевой популяции. Дизайн нашего исследования не позволяет разделить процессы адгезии и интернализации наночастиц, поэтому мы используем термин «адгезия/интернализация». Адгезию/интернализацию наночастиц фуллеренола оценивали по интенсивности аутофлуоресценции клеток в канале PC7 ( $\lambda_{\text{ex}} = 488$  нм; полосовой фильтр: 780/60 нм). Результаты выражали в проценте PC7<sup>+</sup> клеток в целевой популяции НК-клеток. Жизнеспособность НК-клеток, а также адгезию/интернализацию ими наночастиц фуллеренола оценивали на проточном цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter, США).

Ограничения используемых методов. Оценка процента высокогранулярных лимфоцитов методом проточной цитометрии показала противоречивые результаты, которые нельзя корректно интерпретировать без оценки экспрессии маркера дегрануляции CD107a.

Статистическую обработку данных проводили с использованием GraphPad Prism 8.0.1. Для статистического анализа использовали непараметрический аналог ANOVA (критерий Фридмана) и two-way RM ANOVA.

## Результаты и обсуждение

### Эффекты фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-24</sub> в концентрациях 0,25-200 мкг/мл на жизнеспособность НК-клеток

При изучении влияния наночастиц фуллеренола на жизнеспособность НК-клеток, не выявлено статистически значимого уменьшения как процента живых НК-клеток в 24-, 48-, 72-часовых культурах с фуллеренолом, так и их абсолютного количества (табл. 1).

В то же время мы зафиксировали снижение количества жизнеспособных НК-клеток в динамике наблюдения – если после 24 ч инкубации число клеток составляло примерно 50 тыс/лунка, то на 72 ч инкубации число клеток снижалось до 20 тыс/лунка, при этом присутствие наночастиц фуллеренола не влияло на этот процесс.

Таким образом, наночастицы фуллеренола в исследованных нами концентрациях не оказывают цитотоксического эффекта на субпопуляцию НК-клеток.

### Адгезия/интернализация наночастиц фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-24</sub> НК-клетками периферической крови человека

Известно, что клетки способны фагоцитировать и интернализировать нано- и микрочастицы небиологического происхождения. Ранее было показано, что наночастицы способны интернализироваться и иммунными клетками, не относящимися к фагоцитам [6]. В то же время лимфоциты практически не адгезировали/интернализировали наночастицы оксида графена в наших предыдущих исследованиях [2].

Адгезию/интернализацию наночастиц фуллеренола НК-клетками оценивали на проточном цитометре по флуоресценции клеток, поглотивших фуллеренол, в канале для тандемного красителя PC7 (PE-Cy7).

Установлено, что низкие концентрации наночастиц фуллеренола практически не интернализуются НК-клетками – так, уровень PC7<sup>+</sup> клеток не превышает 0,5% при сокультивированиями с фуллеренолом в концентрациях 0,25; 0,5; 2,5; 5; 12,5; 25 мкг/мл на всех сроках наблюдения. Незначительное повышение процента до 1,5% мы зафиксировали при использовании концентрации 50 мкг/мл на 48 и 72 ч инкубации (рис. 1А).

Однако мы показали, что НК-клетки адгезируют/интернализуют наночастицы фуллеренола при добавлении его в больших концентрациях (100 и 200 мкг/мл), причем процент PC7<sup>+</sup> клеток возрастает с увеличением продолжительности культивирования и увеличением концентрации наночастиц (рис. 1).

В целом наночастицы, в том числе фуллеренолы, могут легко проникать в живые клетки посредством фагоцитоза, макропиноцитоза, эндоцитоза, опосредованного кавеолами, или эндоцитоза, опосредованного клатрином [9]. Физико-химические свойства наночастиц (размер, форма, поверхностный заряд и химия поверхности) влияют на эффективность их поглощения клетками, помимо этого, агрегация наночастиц может меняться в зависимости от состава среды и функциональных покрытий.

В 2020 году впервые представлены результаты исследования, ясно показывающие интернализацию фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> в клетки и их адсорбцию на плазматической мембране. Авторы показали, что C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> проникал в РВМС в количестве, пропорциональном его использованной концентрации и времени инкубации клеток. Это исследование также показало, что при более длительном времени инкубации внутриклеточное накопление фуллеренола преобладало над его адсорбцией на внешней гидрофильной поверхности клеточной мембраны [9]. Известно также, что фуллеренол способен адсорбироваться

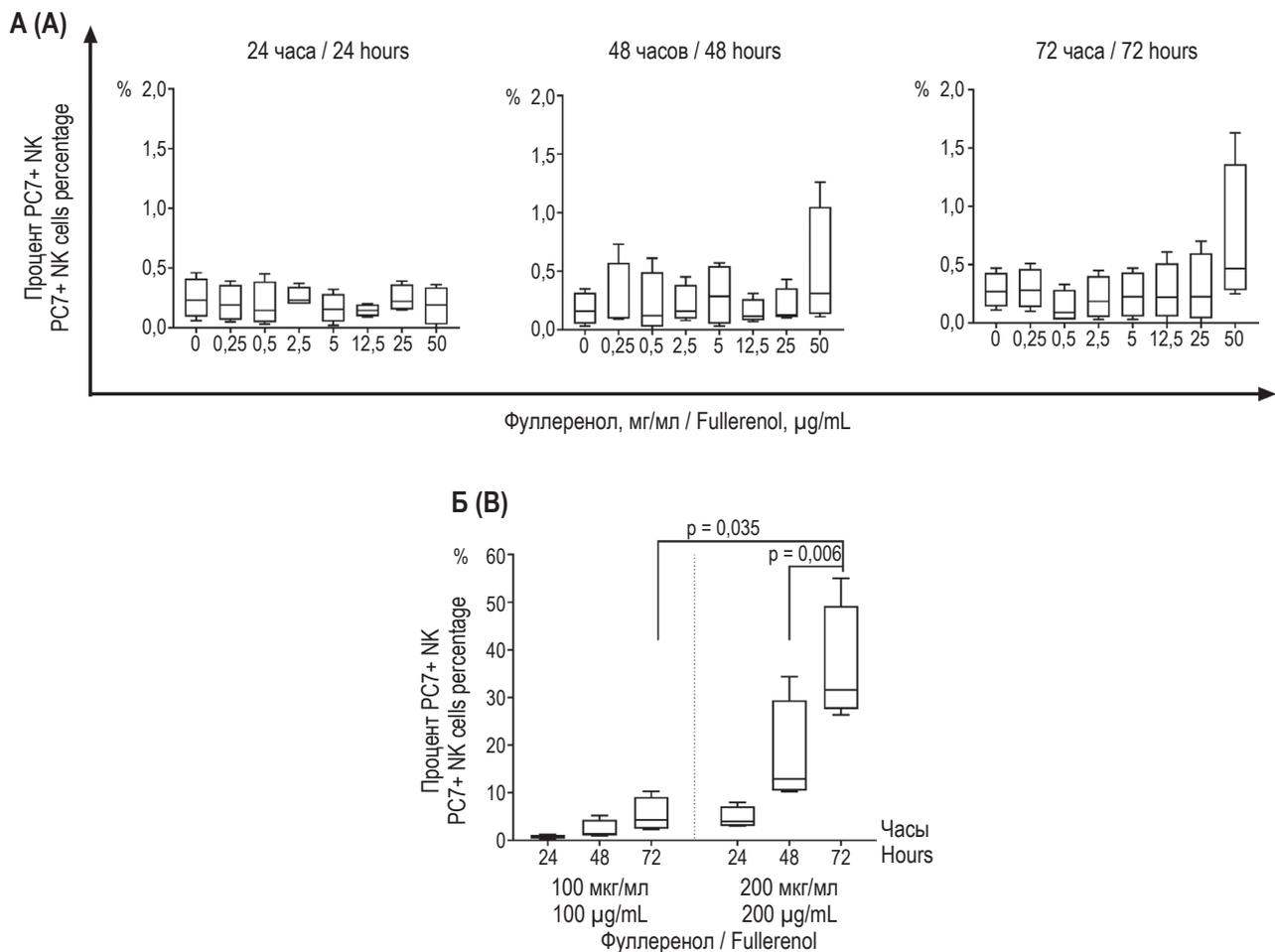
**ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТ ЖИВЫХ НК-КЛЕТОК И ИХ АБСОЛЮТНОЕ КОЛИЧЕСТВО В КУЛЬТУРАХ С ФУЛЛЕРЕНОЛОМ (n = 4), Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 1. PERCENTAGE OF LIVING NK CELLS AND THEIR ABSOLUTE NUMBER IN CULTURES WITH FULLERENOL (n = 4), Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Концентрация фуллеренола (мкг/мл) Fullerenol concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Жизнеспособность <sup>#</sup> Viability <sup>#</sup>	Абсолютное кол-во живых клеток в лунке $\times 10^3$ Absolute number of living cells per well $\times 10^3$
<b>24 часа / 24 hours</b>		
<b>Контроль / Control</b>	99,14 (99,11-99,52)	27,72 (11,46-46,79)
<b>0,25</b>	99,38 (99,27-99,46)	26,87 (11,84-39,80)
<b>0,5</b>	99,08 (98,33-99,50)	22,79 (11,28-61,58)
<b>2,5</b>	99,47 (99,14-99,55)	30,68 (12,14-51,49)
<b>5</b>	99,34 (98,92-99,61)	29,75 (12,16-53,28)
<b>12,5</b>	99,49 (99,27-99,62)	30,55 (11,36-52,40)
<b>25</b>	99,44 (98,90-99,69)	33,48 (12,56-55,28)
<b>50</b>	99,20 (98,93-99,61)	31,89 (12,32-55,43)
<b>100</b>	99,43 (99,14-99,80)	29,35 (11,99-53,41)
<b>200</b>	98,71 (96,28-99,58)	25,63 (12,25-35,18)
<b>48 часов / 48 hours</b>		
<b>Контроль / Control</b>	98,87 (98,53-99,09)	21,78 (8,92-43,65)
<b>0,25</b>	98,35 (97,44-99,11)	20,37 (10,01-32,24)
<b>0,5</b>	98,85 (97,78-99,37)	17,49 (7,14-37,29)
<b>2,5</b>	98,86 (98,36-99,27)	19,24 (8,08-31,23)
<b>5</b>	98,83 (98,02-99,41)	19,90 (8,48-31,23)
<b>12,5</b>	98,89 (98,64-99,38)	19,02 (7,32-35,13)
<b>25</b>	99,32 (98,55-99,38)	17,12 (7,97-31,07)
<b>50</b>	99,27 (98,90-99,44)	20,73 (9,32-38,39)
<b>100</b>	99,13 (98,63-99,51)	24,47 (10,37-31,07)
<b>200</b>	97,95 (92,00-99,40)	18,81 (7,39-18,07)
<b>72 часа / 72 hours</b>		
<b>Контроль / Control</b>	98,43 (96,80-99,09)	13,78 (6,18-21,07)
<b>0,25</b>	98,56 (96,32-98,98)	15,73 (7,03-18,91)
<b>0,5</b>	98,56 (97,04-99,27)	15,20 (7,11-22,33)
<b>2,5</b>	98,47 (96,94-98,99)	14,94 (7,62-23,22)
<b>5</b>	98,13 (96,81-98,81)	17,15 (7,03-24,17)
<b>12,5</b>	98,64 (97,56-98,78)	18,28 (6,54-25,44)
<b>25</b>	98,96 (97,28-99,34)	15,25 (6,77-22,11)
<b>50</b>	98,73 (98,56-99,21)	18,77 (8,42-23,63)
<b>100</b>	98,27 (97,12-99,29)	15,94 (7,94-22,69)
<b>200</b>	98,36 (97,34-98,86)	8,47 (4,49-20,53)

Примечание. <sup>#</sup> – процент Zombie Aqua<sup>+</sup> клеток в гейте CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> клеток; контроль – проба без фуллеренола.

Note. <sup>#</sup>, percentage of Zombie Aqua<sup>+</sup> cells in the gate of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells; control, sample without fullerenol.



**Рисунок 1. А – процент PC7<sup>+</sup> (адгезировавших/интернализовавших фуллеренол) НК-клеток в культурах с концентрациями фуллеренола от 0,25 до 50 мкг/мл. Б – увеличение процента PC7<sup>+</sup>НК-клеток в культурах с 100 и 200 мкг/мл фуллеренола в процессе культивирования (n = 4)**

**Примечание.** По оси x – концентрации фуллеренола, по оси y – процент PC7<sup>+</sup> клеток в гейте CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> клеток. Показаны медианы, первый и третий квартили, минимальные и максимальные значения.

Figure 1. A, percentage of PC7<sup>+</sup> (adherent/internalized fullereneol) NK cells in cultures with fullereneol concentrations from 0.25 to 50 µg/mL. B, increase in percentage of PC7<sup>+</sup>NK cells in cultures with 100 and 200 µg/mL fullereneol during cultivation (n = 4)

Note. X-axis, fullereneol concentrations; y-axis, percentage of PC7<sup>+</sup> cells in the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cell gate. Medians, first and third quartiles, minimum and maximum values are shown.

на поверхности мембраны, особенно вблизи интегральных мембранных белков, таких как трансмембранные ионные насосы: АТФазы К/Na, Mg и Ca, необратимо ингибируя активность этих ферментов [5].

## Выводы

Установлено, что при возрастании концентрации фуллеренола во всех трех сериях эксперимента (24, 48 и 72 ч) наблюдается усиление поглощения наночастиц фуллеренола клетками, при сохранении их жизнеспособности.

Показано, что в присутствии наночастиц фуллеренола в концентрации 200 мкг/мл и

100 мкг/мл процент клеток, которые его интернализировали, достигал 50% и 10%, соответственно, однако, низкие концентрации фуллеренола (50, 25, 12,5, 5, 2,5, 0,5 и 0,25 мкг/м) поглощались не более чем 0,3% НК-клеток на 24 ч, 1% на 48 ч и не более чем 1,5% на 72 ч наблюдения.

Таким образом, впервые установлено, что НК-клетки адгезируют/интернализуют фуллеренол в больших концентрациях (100 и 200 мкг/мл), причем процент клеток, интернализовавших фуллеренол, возрастает с увеличением продолжительности культивирования и концентрации наночастиц.

## Список литературы / References

1. Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуев-Эллистон В.Т., Турецкий Е.А., Иванов А.В., Николаева Т.Н., Хайтов М.Р., Пронин А.В., Куш А.А. Адьювантное действие диспергированного фуллерена  $C_{60}$  на иммунный ответ на конструкции, содержащие аминокислоты и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С // Вопросы вирусологии, 2023. Т. 67, № 6. С. 516-526. [Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Y., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R., Pronin A.V., Kushch A.A. Adjuvant effect of dispersed fullerene  $C_{60}$  on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2023, Vol. 67, no. 6, pp. 516-526. (In Russ.)]
2. Ужвиюк С.В., Храмов П.В., Раев М.Б., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Литвинова Л.С., Заморина С.А. Взаимодействие наночастиц оксида графена с мононуклеарными клетками человека в системе Cell-IQ // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2023. № 1. С. 62-68. [Uzhviyuk S.V., Khramtsov P.V., Raev M.B., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Litvinova L.S., Zamorina S.A. Interaction of graphene oxide nanoparticles with human mononuclear cells in the cell-IQ system. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, Vol. 175, no. 1, pp. 172-178. (In Russ.)]
3. Alhallak K., Sun J., Muz B., Jeske A., O'Neal J., Ritchey J.K., Achilefu S., DiPersio J.F., Azab A.K. Liposomal phytohemagglutinin: *In vivo* T-cell activator as a novel pan-cancer immunotherapy. *J. Cell. Mol. Med.*, 2022, Vol. 26, no. 3, pp. 940-944.
4. Bouchlaka M.N., Ludwig K.D., Gordon J.W., Kutz M.P., Bednarz B.P., Fain S.B., Capitini C.M. (19)F-MRI for monitoring human NK cells *in vivo*. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no 5, e1143996. doi: 10.1080/2162402X.2016.1143996.
5. Grebowski J., Krokosz A., Puchala M. Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1828, pp. 241-248.
6. Huq R., Samuel E.L., Sikkema W.K., Nilewski L.G., Lee T., Tanner M.R., Khan F.S., Porter P.C., Tajhya R.B., Patel R.S., Inoue T., Pautler R.G., Corry D.B., Tour J.M., Beeton C. Preferential uptake of antioxidant carbon nanoparticles by T lymphocytes for immunomodulation. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 33808. doi: 10.1038/srep33808.
7. Imširović V., Wensveen F.M., Polić B., Jelenčić V. Maintaining the balance: regulation of NK cell activity. *Cells*, 2024, Vol. 13, no. 17, 1464. doi: 10.3390/cells13171464.
8. Jeong Y.H., Lennon G., Veldman G., Serna D.M., Ibrahimov A. Establishing endotoxin limits to enhance the reliability of *in vitro* immunogenicity risk assessments. *mAbs*, 2025, Vol. 17, no. 1. <https://doi.org/10.1080/19420862.2025.2458627>.
9. Lichota A., Piwoński I., Michlewska S., Krokosz A. A multiparametric study of internalization of fullereneol  $C_{60}(OH)_{36}$  nanoparticles into peripheral blood mononuclear cells: cytotoxicity in oxidative stress induced by ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, 2281. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.013.
10. Liu B., Cao W., Cheng J., Fan S., Pan S., Wang L., Niu J., Pan Y., Liu Y., Sun X., Ma L., Song J., Ni J., Cui D. Human natural killer cells for targeting delivery of gold nanostars and bimodal imaging directed photothermal/photodynamic therapy and immunotherapy. *Cancer Biol. Med.*, 2019, Vol. 16, no. 4, pp. 756-770.
11. Liu J., Feng X., Chen Z., Yang X., Shen Z., Guo M., Deng F., Liu Y., Zhang H., Chen C. The adjuvant effect of  $C_{60}(OH)_{22}$  nanoparticles promoting both humoral and cellular immune responses to HCV recombinant proteins. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2019, Vol. 97, pp. 753-759.
12. Liu M., Liang S., Zhang C. NK cells in autoimmune diseases: protective or pathogenic? *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 624687. doi: 10.3389/fimmu.2021.624687
13. Loftus C., Saeed M., Davis D.M., Dunlop I.E. Activation of human natural killer cells by graphene oxide-templated antibody nanoclusters. *Nano Lett.*, 2018, Vol. 18, no. 5, pp. 3282-3289.
14. Seke M., Zivkovic M., Stankovic A. Versatile applications of fullereneol nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 2024, Vol. 660, 124313. doi: 10.1016/j.ijpharm.2024.124313.
15. Shamalov K., Meir R., Motiei M., Popovtzer R., Cohen C.J. Noninvasive tracking of natural killer cells using gold nanoparticles. *ACS Omega*, 2021, Vol. 6, no. 43, pp. 28507-28514.
16. Zhu J., Ji Z., Wang J., Sun R., Zhang X., Gao Y., Sun H., Liu Y., Wang Z., Li A., Ma J., Wang T., Jia G., Gu Y. Tumor-inhibitory effect and immunomodulatory activity of fullerol  $C_{60}(OH)_x$ . *Small*, 2008, Vol. 4, no. 8, pp. 1168-1175.

### Авторы:

**Тимганова В.П.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

### Authors:

**Timganova V.P.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Бочкова М.С.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Усанина Д.И.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; аспирант кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Долгих М.Д.** — инженер лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; магистрант кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Лазарев С.С.** — инженер лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Раев М.Б.** — д.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Заморина С.А.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Bochkova M.S.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

**Usanina D.I.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; PhD Student, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

**Dolgikh M.D.**, Technician, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Master's Student, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

**Lazarev S.S.**, Technician, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Rayev M.B.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

**Zamorina S.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 19.03.2025  
Отправлена на доработку 09.05.2025  
Принята к печати 25.05.2025

Received 19.03.2025  
Revision received 09.05.2025  
Accepted 25.05.2025