

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Мещеряков Анатолий Анатольевич

Функционализация фуллерена C₆₀ для получения материалов биомедицинского назначения

Научная специальность 1.4.15. Химия твёрдого тела

Диссертация представлена на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научные руководители:

д-р хим. наук, доцент,

Семёнов Константин Николаевич

д-р биол. наук, доцент,

Шаройко Владимир Владимирович

Санкт-Петербург

2022

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Особенности строения фуллеренов	12
1.2. Термодинамические свойства фуллеренов и их производных	17
1.3. Химические свойства фуллеренов	21
1.4. Физико-химические свойства растворов фуллеренов и их производных	25
1.5. Биологическая активность и перспективы использования водорастворимых аддуктов фуллеренов	27
1.5.1. Антиоксидантные и цитопротекторные свойства	27
1.5.2. Токсичность фуллеренов	34
1.5.3. Биодegradация фуллеренов	39
1.5.4. Радиопротекторные свойства	40
1.5.5. Доставка лекарств	41
1.5.6. Антиоксидантные свойства при облучении	43
1.5.7. Взаимодействие с белками	47
Глава 2. Экспериментальная часть	49
2.1. Реактивы и их характеристики	49
2.2. Синтез водорастворимых аддуктов фуллерена C ₆₀	50
2.2.1. Синтез аминокислотных аддуктов фуллерена C ₆₀	50
2.2.2. Синтез полигидроксилированного фуллерена C ₆₀ (OH) ₂₄	51
2.2.3. Синтез карбоксилированного фуллерена C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃	51
2.3. Идентификация водорастворимых производных фуллерена C ₆₀	52
2.4. Изучение физико-химических свойств аддуктов фуллерена C ₆₀	53
2.5. Биосовместимость аддуктов фуллерена C ₆₀	53
2.5.1. Спонтанный гемолиз	53
2.5.2. Агрегация тромбоцитов	54
2.5.3. Плазмо-коагуляционный гемостаз	54
2.5.4. Взаимодействие с ДНК	55
2.5.5. Антирадикальная активность	57
2.5.6. Цитотоксичность	57
2.5.7. Взаимодействие с ЧСА	58

2.5.8. Эстеразная активность ЧСА	59
2.5.9. Генотоксичность	59
2.5.10. Фотовыцветание	59
2.5.11. Взаимодействие с коллагеном	60
2.5.12. Протекторный эффект C ₆₀ -Met при УФ-повреждении коллагена.....	60
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	61
3.1. Идентификация производных фуллерена C ₆₀	61
3.1.1. Идентификация производных фуллерена C ₆₀ с L-аминокислотами	61
3.1.2. Идентификация полигидроксилированного фуллерена C ₆₀ (OH) ₂₄	69
3.1.3. Идентификация карбоксилированного фуллерена C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃	73
3.2. Физико-химические свойства производных	77
3.2.1. Плотность водных растворов C ₆₀ -Gly	77
3.2.2. Скорость звука в водных растворах C ₆₀ -Gly	84
3.2.3. Вязкость водных растворов C ₆₀ -Gly.....	88
3.2.4. Изобарная теплоёмкость	93
3.2.5. Распределение наночастиц C ₆₀ -Gly по размерам в водном растворе и ζ- потенциалы	95
3.3. Корреляция температурных и концентрационных зависимостей плотности, вязкости и скорости звука водных растворов C ₆₀ -Gly.....	97
Глава 4. Изучение биосовместимости водорастворимых аддуктов фуллерена C ₆₀ с L- аминокислотами, фуллеренола и карбоксилированного фуллерена	101
4.1. Биосовместимость аддуктов фуллерена C ₆₀ с L-аминокислотами	101
4.1.1. Спонтанный гемолиз	101
4.1.2. Агрегация тромбоцитов.....	103
4.1.3. Взаимодействие с ДНК.....	104
4.1.4. Антирадикальная активность.....	107
4.1.5. Цитотоксичность.....	110
4.1.6. Взаимодействие C ₆₀ -Met с коллагеном	113
4.1.7. Протекторный эффект C ₆₀ -Met	116
4.2. Биосовместимость карбоксилированного фуллерена C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃	118
4.2.1. Спонтанный гемолиз	118
4.2.2. Агрегация тромбоцитов.....	119

4.2.3. Взаимодействие с ЧСА.....	120
4.2.4. Антиоксидантная активность	122
4.2.5. Фотовыцветание.....	125
4.2.6. Цитотоксичность.....	126
4.2.7. Генотоксичность	127
4.3. Биосовместимость полигидроксилированного фуллерена $C_{60}(OH)_{24}$	129
4.3.1. Спонтанный гемолиз	129
4.3.2. Агрегация тромбоцитов.....	129
4.3.3. Плазмо-коагуляционный гемостаз	130
4.3.4. Взаимодействие с ЧСА.....	130
4.3.5. Фотовыцветание.....	132
4.3.6. Взаимодействие с ДНК.....	133
4.3.7. Генотоксичность	135
Основные результаты и выводы.....	138
Благодарности	139
Список цитированной литературы.....	140

Введение

Одним из наиболее перспективных направлений использования фуллеренов и их производных является биология и медицина. Это связано с тем, что фуллерены обладают высокой реакционной способностью благодаря наличию двойных связей, способных присоединять различные радикалы, и демонстрирует высокую антиоксидантную активность, способность проникать через липидный бислой, модулировать трансмембранный транспорт ионов [1–4].

Проблема растворимости фуллерена стоит особенно остро в связи с его потенциальным применением в медицине, в водной среде он практически нерастворим ($<10^{-11}$ г/л) [5,6], что обусловлено его высокой гидрофобностью.

Большим достижением в химии фуллеренов является то, что в последние годы были разработаны подходы, позволяющие синтезировать аддукты фуллерена с приемлемыми для медицинского применения показателями растворимости в воде: 10–200 мг/мл и более [1–3,7].

С начала открытия препаративного способа получения фуллерена актуальной задачей является синтез водорастворимых аддуктов фуллеренов, которые обладают широким спектром биологической активности: противоопухолевой [8], противовирусной [9,10], антимикробной [11], антиоксидантной [12], нейропротекторной [13,14], фотодинамической [15,16], мембранотропной [17]; кроме того, они могут использоваться как ингибиторы ферментов и апоптоза, а также в качестве радиопротекторов (Рис. 1).

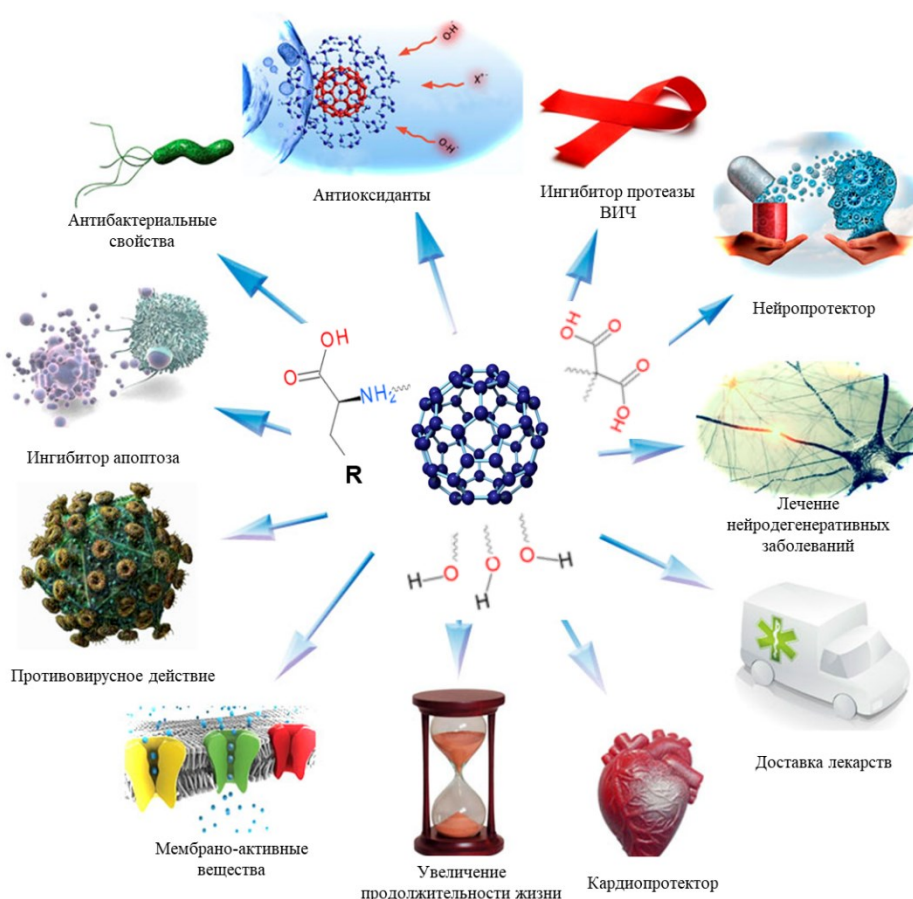


Рис. 1. Основные биологические свойства водорастворимых аддуктов фуллеренов.

Всё это говорит о том, что фуллерены и его производные могут являться основой для создания новых высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов. Например, в работах [18,19] показано, что производные фуллеренов могут являться стерическими ингибиторами протеазы вируса ВИЧ за счёт встраивания в полость активного центра фермента (Рис. 2).

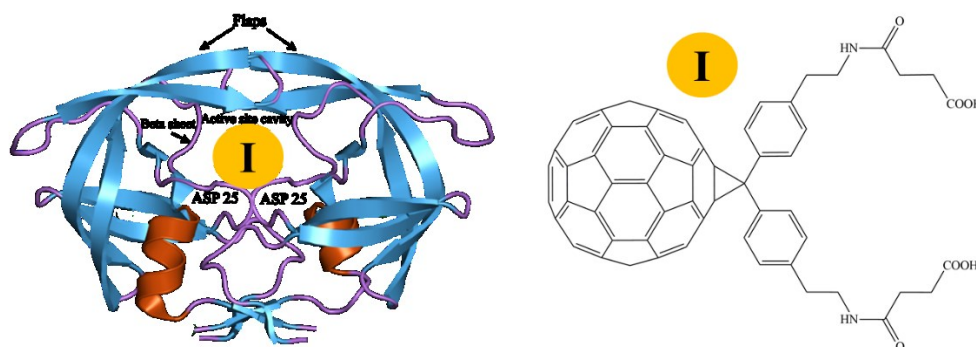


Рис. 2. Кристаллическая структура протеазы ВИЧ-1, содержащая в полости ингибитор.

Цель работы

Целью работы является разработка методов синтеза, изучение физико-химических свойств и биосовместимости водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} с L-

аминокислотами (глицином, L-метионином, L-гидроксипролином, L-цистеином), фуллеренола и карбоксилированного фуллерена, имеющих перспективы использования в нанобиомедицине.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Разработка масштабируемых одностадийных методик синтеза аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами.
2. Идентификация синтезированных наноматериалов (аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами, фуллеренола и карбоксилированного фуллерена) с использованием комплекса физико-химических методов: ИК-, УФ-, ^{13}C ЯМР-спектроскопия, элементный анализ, термогравиметрия, жидкостная хроматография.
3. Изучение физико-химических свойств водных растворов синтезированных аддуктов фуллерена C_{60} , а именно: температурных и концентрационных зависимостей плотности, вязкости, скорости звука, теплоёмкости, а также изучение процессов ассоциации в водных растворах.
4. Изучение биосовместимости синтезированных водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} , включающее исследование цито- и генотоксичности, гемосовместимости, антиоксидантной активности.
5. Результаты изучения УФ-фотопротекторных свойств аддукта C_{60} с L-метионином.

Научная новизна результатов

1. Разработаны одностадийные масштабируемые методики получения водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} с глицином, L-гидроксипролином, L-цистеином и L-метионином, позволяющие получать конечный продукт с выходом более 85 %.
2. Массив экспериментальных данных по изучению физико-химических свойств растворов синтезированных аддуктов фуллерена C_{60} является основой для создания материалов биомедицинского назначения.
3. Показано, что синтезированные водорастворимые аддукты фуллерена C_{60} с L-аминокислотами, фуллеренол и карбоксилированный фуллерен являются биосовместимыми на основании данных по изучению гемолиза, агрегации тромбоцитов, связыванию с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), антиоксидантной активности, цито- и генотоксичности.
4. На основе изучения физико-химических свойств и биосовместимости аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами, фуллеренола и карбоксилированного фуллерена

установлено, что полученные наноматериалы могут быть использованы для создания фотопротекторов, антиоксидантов, покрытий для сердечных клапанов и стентов, систем для адресной доставки лекарств, биовизуализации и тераностики.

Достоверность и апробация результатов исследования

Результаты были опубликованы в семи работах в рецензируемых научных журналах и доложены на шести международных и всероссийских научных конференциях.

Список публикаций

1. V. V. Sharoyko, O. S. Shemchuk, A. A. Meshcheriakov, L. V. Vasina, N. R. Iamalova, M. D. Luttsev, D. A. Ivanova, A. V. Petrov, D. N. Maystrenko, O. E. Molchanov, K. N. Semenov, Biocompatibility, antioxidant activity and collagen photoprotection properties of C₆₀ fullerene adduct with L-methionine, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 40 (2022) 102500. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102500> (Q1, ИФ 6.458).
2. V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A. A. Meshcheriakov, N. E. Podolsky, J. P. Vallejo, L. Lugo, I. T. Rakipov, A. V. Petrov, A. V. Ivanova, N. A. Charykov, K. N. Semenov, Physicochemical investigation of water-soluble C₆₀(C₂NH₄O₂)₄H₄ (C₆₀-Gly) adduct, *J. Mol. Liq.* 344 (2021) 117658. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117658> (Q1, ИФ 6.633).
3. V. V. Sharoyko, N. R. Iamalova, S. V. Ageev, A. A. Meshcheriakov, G. O. Iurev, A. V. Petrov, D. A. Nerukh, V. S. Farafonov, L. V. Vasina, A. V. Penkova, K. N. Semenov, *In Vitro and In Silico Investigation of Water-Soluble Fullerenol C₆₀(OH)₂₄: Bioactivity and Biocompatibility*, *J. Phys. Chem. B.* 125 (2021) 9197–9212. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03332> (Q1, ИФ 3.466).
4. A. A. Meshcheriakov, G. O. Iurev, M. D. Luttsev, N. E. Podolsky, S. V. Ageev, A. V. Petrov, L. V. Vasina, I. L. Solovtsova, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, K. N. Semenov, Physicochemical properties, biological activity and biocompatibility of water-soluble C₆₀-Hyp adduct, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 196 (2020) 111338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111338> (Q1, ИФ 5.999).
5. V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A. A. Meshcheriakov, A. V. Akentiev, B. A. Noskov, I. T. Rakipov, N. A. Charykov, N. A. Kulenova, B. K. Shaimardanova, N. E. Podolsky, K. N. Semenov, Physicochemical study of water-soluble C₆₀(OH)₂₄ fullerenol, *J. Mol. Liq.* 311 (2020) 113360. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113360> (Q1, ИФ 6.633).
6. I. N. Gaponenko, S. V. Ageev, G. O. Iurev, O. S. Shemchuk, A. A. Meshcheriakov, A. V. Petrov, I. L. Solovtsova, L. V. Vasina, T. B. Tennikova, I. V. Murin, K. N. Semenov, V. V.

Sharoyko, Biological evaluation and molecular dynamics simulation of water-soluble fullerene derivative $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, *Toxicol. Vitro.* 62 (2020) 104683. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104683> (Q2, ИФ 3.685).

7. K. N. Semenov, A. A. Meshcheriakov, N. A. Charykov, M. E. Dmitrenko, V. A. Keskinov, I. V. Murin, G. G. Panova, V. V. Sharoyko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, *Physicochemical and biological properties of C_{60} -L-hydroxyproline water solutions*, *RSC Adv.* 7 (2017) 15189–15200. <https://doi.org/10.1039/C6RA26621E> (Q1, ИФ 4.036).

Список конференций

1. Шемчук О. С., Мещеряков А. А. Синтез, идентификация и изучение биологической активности фуллерена C_{60} , модифицированного L-метионином. XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», Москва, 2021.
2. Мещеряков А. А. Производные фуллерена $C_{60}(Gly)_4$, $C_{60}(Lys)_2$, $C_{60}(Hyp)_2$: синтез, идентификация, биологическая активность. LXXXI научно-практическая конференция студентов и молодых учёных «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины — 2020», Санкт-Петербург, 2020.
3. Мещеряков А. А. Фотопротекторный эффект производного фуллерена C_{60} с L-гидроксипролином. VIII Международный молодёжный медицинский конгресс, Санкт-Петербург, 2019.
4. Мещеряков А. А. Изучение физико-химических свойств и биологической активности производных фуллерена C_{60} с L-лизином и L-гидроксипролином. IX Научно-техническая конференция студентов, аспирантов, молодых учёных «Неделя науки — 2019», Санкт-Петербург, 2019.
5. Мещеряков А. А. Цитотоксичность и связывание с белками производных фуллерена C_{60} с L-лизином и L-гидроксипролином. VI Межвузовский конкурс-конференция научных работ студентов имени А. А. Яковкина (с международным участием) «Физическая химия — основа новых технологий и материалов», Санкт-Петербург, 2018.
6. Почкаева Е. И., Мещеряков А. А., Юрьев Г. О., Печникова Н. А. Исследование гемосовместимости водорастворимых аддуктов лёгких фуллеренов *in vitro*. LXXIX Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины», Санкт-Петербург, 2018.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ «Новые композиционные материалы пролонгированного действия на основе углеродных наноструктур и аэросила для

онкологии: синтез, физико-химические свойства, цитостатическая активность» (№ 19-315-90122).

Положения, выносимые на защиту

1. Масштабируемая одностадийная методика синтеза водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами, позволяющая получать конечный продукт с выходом 85 %.
2. Идентификация синтезированных аддуктов фуллерена C_{60} с использованием физико-химических методов.
3. Данные по изучению физико-химических свойств растворов в бинарных системах аддукт фуллерена C_{60} –вода.
4. Результаты *in vitro* исследований биосовместимости синтезированных аддуктов фуллерена C_{60} .

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения; в первой главе представлен обзор литературы, во второй главе описаны методы исследований, в третьей главе обсуждаются полученные результаты по синтезу, идентификации, физико-химическим свойствам, в четвёртой главе — результаты по биологической активности водорастворимых производных фуллерена C_{60} . Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 72 рисунка, 32 таблицы и 220 ссылок.

Личный вклад автора заключался в синтезе и идентификации аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами, фуллеренола и карбоксилированного фуллерена, изучении физико-химических свойств и биосовместимости синтезированных соединений, подготовке научных публикаций.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Особенности строения фуллеренов

Исследования замкнутых углеродных структур развиваются более трёх десятилетий в направлениях изучения высших гомологов, пространственных изомеров, экзоэдральных и эндоэдральных комплексов, начиная с наиболее распространённого сферически симметричного фуллерена C_{60} . Являясь усечённым икосэдром с двадцатью шестиугольными и двенадцатью пятиугольными гранями, C_{60} в сравнении с молекулами ряда C_{70} , C_{76} , C_{78} , C_{80} , C_{82} , C_{84} и др. обладает наиболее устойчивой структурой [20]. Это даёт преимущества фуллерену C_{60} при использовании в биомедицине, и его достаточно легко превратить в водорастворимую форму, например, присоединив гидроксильные группы. Внимание к фуллеренам, как к основе для создания лекарственных препаратов, обусловлено следующими свойствами: размером, липофильностью, наличием внутреннего объёма, химическими и фотофизическими свойствами. Фуллерен C_{60} (Рис. 1.1) имеет кубическую структуру $Fm\bar{3}m$ ($T > 260$ К) и $Pa\bar{3}$ ($T < 260$ К). Диаметр углеродной ячейки 7.1 Å, длины связей составляют C=C 1.391 Å, C–C 1.455 Å, расстояние между молекулами C_{60} в кристаллах — 3.1 Å, плотность — 1.65 г см⁻³, сродство к электрону — 2.6–2.8 эВ, энергия ионизации — 7.6 эВ, ширина запрещённой зоны — 1.9 эВ, показатель преломления — 2.2 (630 нм) [21].

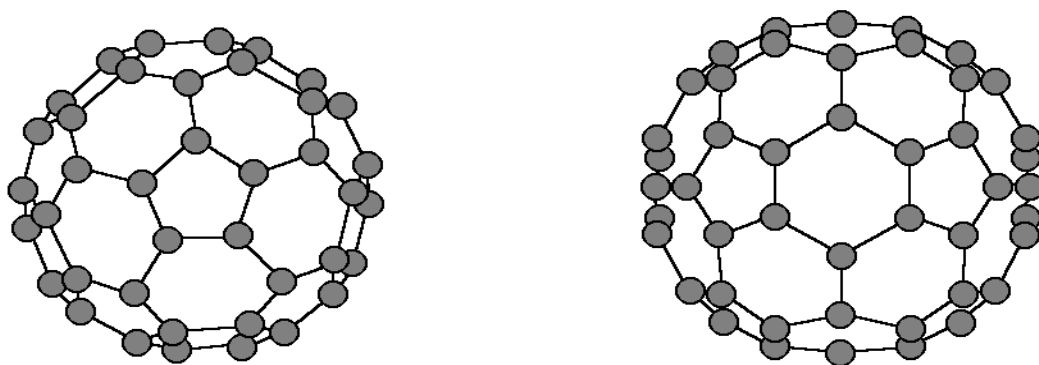


Рис. 1.1. Строение молекул фуллеренов C_{60} (слева) и C_{70} (справа).

В свою очередь, фуллерен C_{70} (Рис. 1.1) имеет структуру с эллипсоидальной формой, описываемой группой симметрии D_{5h} . Формально фуллерен $D_{5h}-C_{70}$ может быть получен из двух половинок фуллерена C_{60} в результате вставки пяти пар атомов углерода в экваториальной плоскости. Общее число связей между атомами этой молекулы равно 105, среди них выделяется восемь групп различных связей (Рис. 1.2 и Табл. 1.1) [22]. «Высота» молекулы равна 7.8 Å. Экваториальная часть C_{70} имеет диаметр 6.94 Å.

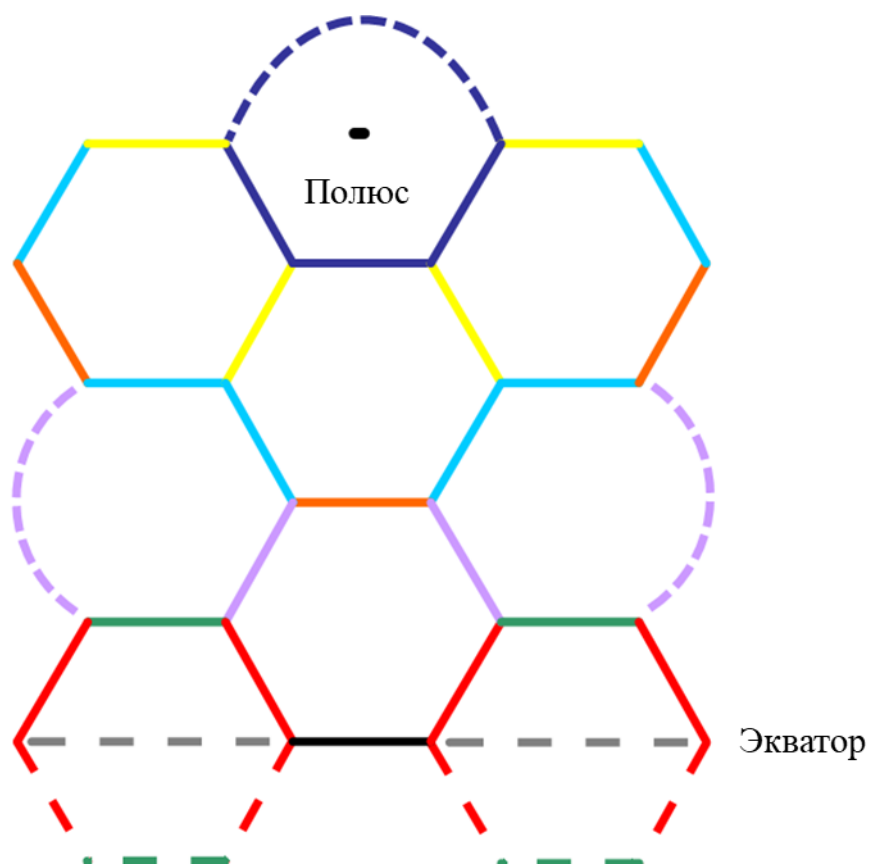


Рис. 1.2. Типы связей в молекуле C_{70} (см. Табл. 1.1).

Табл. 1.1. Характеристики типов связи С–С в молекуле C_{70} (Рис. 1.2) [22].

№	Цвет	Число связей данного типа	Категория связей	Длина связи, нм
1	—	5	Шестиугольник– шестиугольник	0.141 ± 0.002
2	—	20	Шестиугольник– шестиугольник	0.139 ± 0.001
3	—	10	Шестиугольник– пятиугольник	0.147 ± 0.002
4	—	20	Шестиугольник– пятиугольник	0.146 ± 0.002
5	—	10	Шестиугольник– пятиугольник	0.137 ± 0.002
6	—	20	Шестиугольник– пятиугольник	0.147 ± 0.002
7	—	10	Шестиугольник– пятиугольник	0.137 ± 0.002

8	—	10	Шестиугольник– пятиугольник	0.1464 ± 0.00092
---	---	----	--------------------------------	------------------

В случае высших фуллеренов необходимо учитывать наличие структурных изомеров, которые стабильны при выполнении правила изолированных пятиугольников (isolated-pentagon rule, IPR), окружённых шестиугольниками в каркасе [23]. Самыми стабильными являются фуллерены C_{60} и C_{70} . Далее количество изомеров, удовлетворяющих правилу IPR, увеличивается с массой фуллерена: пять для C_{78} , семь для C_{80} , девять для C_{82} и 24 для C_{84} [23]. Для эндоэдральных фуллеренов правило IPR продолжает действовать, но перенос электронной плотности от атома металла на углеродный каркас влияет на стабильность, электронные и магнитные свойства молекулы [24–27].

Размеры молекулы фуллерена C_{60} сравнимы с размерами обычных органических молекул и меньше размеров сложных органических молекул. Отсюда следует, что молекулы фуллеренов вполне совместимы с биологическими мишенями, будь то сайты связывания ферментов или сайты распознавания рецепторов. Поэтому можно предположить, что среди многообразия биологических структур могут существовать и структуры, способные к комплементарным взаимодействиям с молекулами фуллеренов.

Важной характеристикой молекул фуллеренов, которая определяет их применение, например, в биологии и медицине, является липофильность, оцениваемая по коэффициенту распределения этого вещества между липофильной и гидрофильной фазами ($\lg P$). Ханш и др. [28] ввели константу π для количественной оценки связи структуры с биологической активностью. Немодифицированный фуллерен C_{60} обладает высокой липофильностью; его коэффициент распределения в системе октанол–вода ($\lg P_{ow}$) равен 6.67 [29]. Кроме того, была рассчитана константа распределения для аддуктов C_{60} . Например, для аддукта фуллерена с бензойной кислотой ($\lg P > 4$) константа π оказалась больше трёх, что свидетельствует о том, что введение остатка фуллерена приводит к сильному увеличению гидрофобности бензойной кислоты [30]. Липофильность определяет мембранотропный механизм противовирусного действия фуллерена и его аддуктов, а также лежит в основе создания на его основе сорбентов для аффинной хроматографии белков [10,31,32].

Особый интерес представляет наличие в молекулах фуллеренов внутреннего объёма и их способность образовывать эндоэдральные соединения. Как упоминалось

выше, внутри молекул фуллеренов (особенно высших фуллеренов C_{74} , C_{76} , C_{78} , C_{80} , C_{82} , C_{84}) достаточно места для атомов металлов, кластеров и даже малых молекул [33–36].

Важным свойством эндодральных фуллеренов является то, что атом металла, внедрённый внутрь фуллеренового ядра, изолирован от среды и не способен проявлять токсическое действие. Основой парамагнитных контрастирующих агентов, используемых в магнитно-резонансной томографии, является гадолиний Gd^{3+} . Недостатком обычных контрастирующих веществ (хелатных комплексов $Gd(III)$ -DTPA (Omniscan) или $Gd(III)$ -DOTA (ProHance)) является их нестабильность и токсичность. В указанном соединении ион гадолиния находится внутри углеродной оболочки и не может проявлять токсичности. Но для практического использования данного класса соединений необходимо создание их водорастворимых форм [37–39]. Перспективность этих исследований обусловлена тем, что эндометаллофуллерены (ЭМФ) имеют потенциал применения в фотодинамической терапии, гипертермии, лучевой и химиотерапии, а также для противовирусной обработки препаратов крови. Фуллерены с уникальной электронной структурой обладают ярко выраженными донорно-акцепторными свойствами. При возбуждении квантом света они способны действовать как доноры электронов [40], а в основном состоянии проявляют электроноакцепторные свойства [41].

Электронная структура фуллеренов делает возможным протекание реакций радикального присоединения. Крузич и др. [41] показали, что к одной молекуле C_{60} присоединяется 34 метильных или 15 бензильных радикалов, что позволило авторам назвать эту молекулу «губкой для радикалов». Поскольку в биологических системах реакции с участием свободных радикалов являются преимущественно реакциями окисления, одним из биологических свойств фуллерена C_{60} и его аддуктов является антиоксидантная активность. На Рис. 1.3 показан пример взаимодействия фуллерена C_{60} с бензил-радикалами.

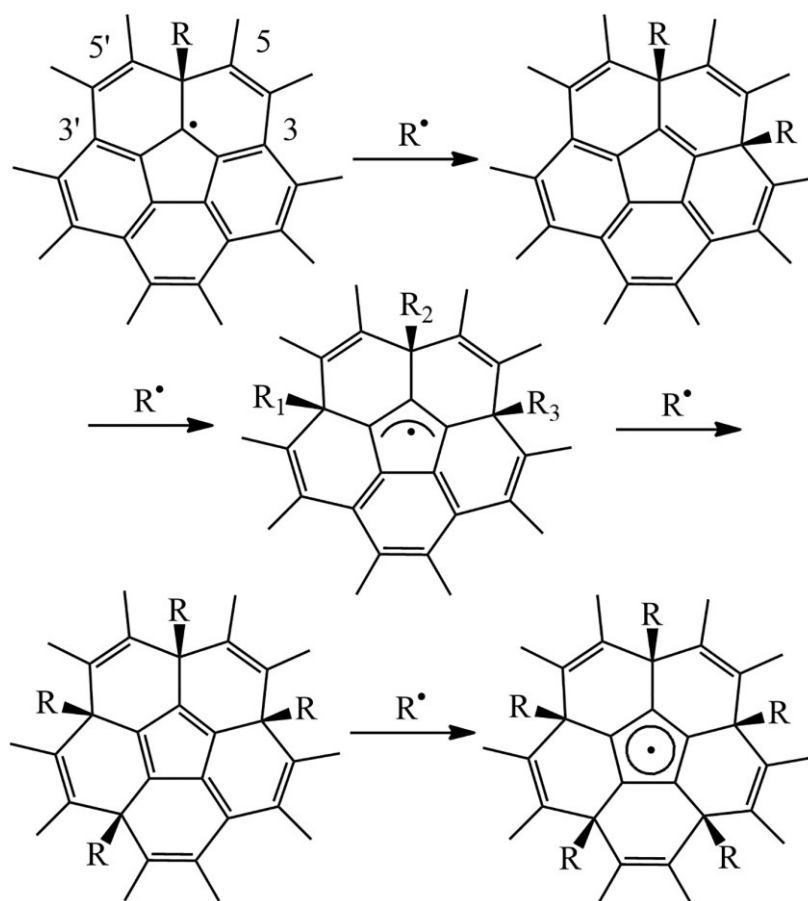


Рис. 1.3. Реакция присоединения пяти бензильных радикалов к молекуле фуллерена.

Фотофизические и химические свойства фуллерена определяются наличием в молекуле сопряжённых двойных связей, т. е. являются фундаментальными свойствами самого ядра фуллерена. Например, молекулы фуллеренов под действием видимого или УФ-облучения способствуют превращению триплетного кислорода в синглетный [42–44], выступая тем самым «генератором» синглетного кислорода. Это связано с тем, что молекула фуллерена C_{60} в основном состоянии ($^1C_{60}$) при облучении УФ и видимым светом легко переходит в возбуждённое синглетное состояние ($^1C_{60}$), которое переходит в возбуждённое триплетное состояние ($^3C_{60}^*$) с высоким квантовым выходом. В свою очередь, возбуждённое триплетное состояние ($^3C_{60}^*$) передаёт энергию молекуле обычного триплетного кислорода 3O_2 , превращая её в синглетный кислород 1O_2 [43,45,46]. Фуллерен в возбуждённом триплетном состоянии является отличным акцептором электронов, а восстановленный триплетный фуллерен ($^3C_{60}$) может легко передавать электрон молекулярному кислороду, образуя супероксидный анион-радикал ($^-\dot{O}_2$). Механизмы образования $^-\dot{O}_2$ и синглетного кислорода представлены на Рис. 1.4.

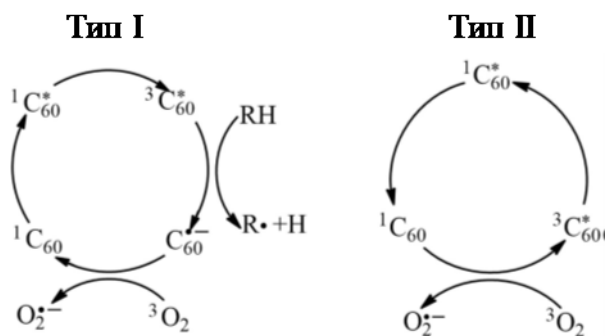


Рис. 1.4. Схемы фотохимических механизмов: тип I — передача заряда, тип II — передача энергии.

Образование синглетного кислорода при фотовозбуждении фуллеренов является примером двух сопряжённых реакций: первая — переход триплетного состояния ${}^3\text{C}_{60}^*$ в основное синглетное ${}^1\text{C}_{60}$, а вторая — превращение триплетного кислорода ${}^3\text{O}_2$ в синглетное ${}^1\text{O}_2$ с помощью энергии перехода ${}^3\text{C}_{60}^* \rightarrow {}^1\text{C}_{60}$. Существенной особенностью этого процесса является то, что в результате всех реакций молекула фуллерена не претерпевает никаких химических превращений и может многократно участвовать в этом цикле, т. е. выступает своеобразным «катализатором» реакции образования синглетного кислорода. Следует подчеркнуть, что это отличает его от многих других фотосенсибилизаторов, молекулы которых распадаются при образовании синглетного кислорода. Таким образом, способность одного соединения действовать в качестве антиоксиданта и прооксиданта является подтверждением уникальности лёгких фуллеренов.

1.2. Термодинамические свойства фуллеренов и их производных

Рассмотрим основные термодинамические свойства лёгких фуллеренов C_{60} и C_{70} . Значения энтальпий сгорания и образования фуллеренов C_{60} и C_{70} при стандартных условиях, а также значения энтропий, энергий Гиббса и логарифмов констант равновесия реакций образования фуллеренов C_{60} и C_{70} из графита приведены в Табл. 1.2.

Табл. 1.2. Энтальпии сгорания ($\Delta_c H^\circ$) и образования фуллеренов ($\Delta_f H^\circ$) C_{60} и C_{70} при стандартных условиях, а также энтропии $\Delta_f S^\circ$, энергии Гиббса $\Delta_f G^\circ$ и логарифмы констант равновесия ($\lg K_f^\circ$) реакций образования фуллеренов C_{60} и C_{70} из графита [47].

$\Delta_c H^\circ$, кДж·моль ⁻¹	$\Delta_f H^\circ$, кДж·моль ⁻¹	$\Delta_f S^\circ$, Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	$\Delta_f G^\circ$, кДж·моль ⁻¹	$\lg K_f^\circ$
Фуллерен C_{60}				
-25937 ± 17	2327 ± 16	420.8 ± 1.2	2202 ± 17	0.306

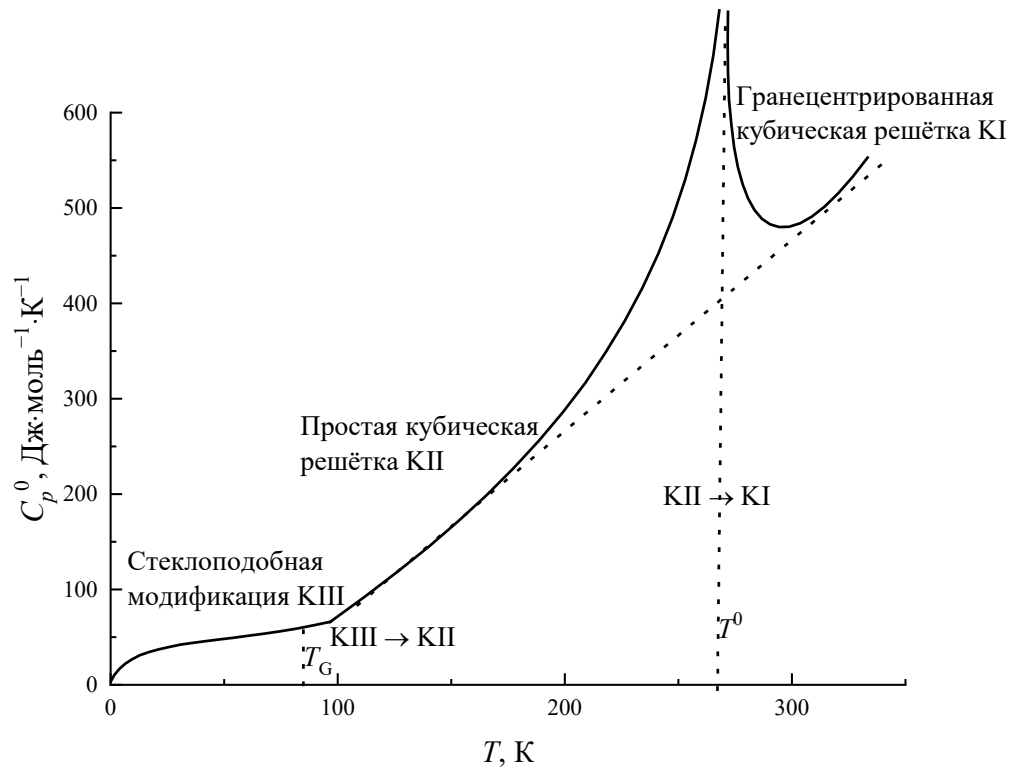
Фуллерен C₇₀

-30101 ± 10	2555 ± 12	62.94 ± 1.41	2536 ± 12	-445
-------------	-----------	--------------	-----------	------

На Рис. 1.5а представлена температурная зависимость изобарной теплоёмкости фуллерена C₆₀. Видно, что в зависимости от температуры фуллерен C₆₀ существует в следующих модификациях: (i) пластических кристаллов (КI на Рис. 1.5а), имеющих гранцентрированную кубическую решётку, в узлах которой молекулы C₆₀ совершают практически свободное вращение; (ii) кристаллов (КII на Рис. 1.5а), имеющих простую кубическую решётку; (iii) стеклоподобных кристаллов (К III на Рис. 1.5а). Видно, что в диапазоне 0–340 К наблюдается два фазовых перехода: фазовый переход второго рода КIII→КII (при 86 К) и фазовый переход первого рода КII→КI (при 260.7 К). Термодинамические функции фуллерена C₆₀ в широком интервале температур представлены в работах [47–53].

На Рис. 1.5б представлена температурная зависимость изобарной теплоёмкости фуллерена C₇₀. Видно, что в зависимости от температуры фуллерен C₇₀ существует в следующих модификациях: (i) кристаллы (КI на Рис. 1.5б), обладающие гексагональной решёткой, в узлах которой молекулы C₇₀ совершают практически свободное вращение; (ii) гексагональные кристаллы (КII на Рис. 1.5б), характеризующиеся ориентационным упорядочением молекул C₇₀ в кристаллической решётке; (iii) моноклинные кристаллы (КIII на Рис. 1.5б), в которых наблюдается полное ориентационное упорядочение молекул C₇₀. Таким образом, в изученном интервале температур наблюдаются фазовые переходы КIII→КII и КII→КI, которые трудно квалифицировать однозначно. Термодинамические функции фуллерена C₇₀ в широком интервале температур представлены в работах [54,55].

(a)



(б)

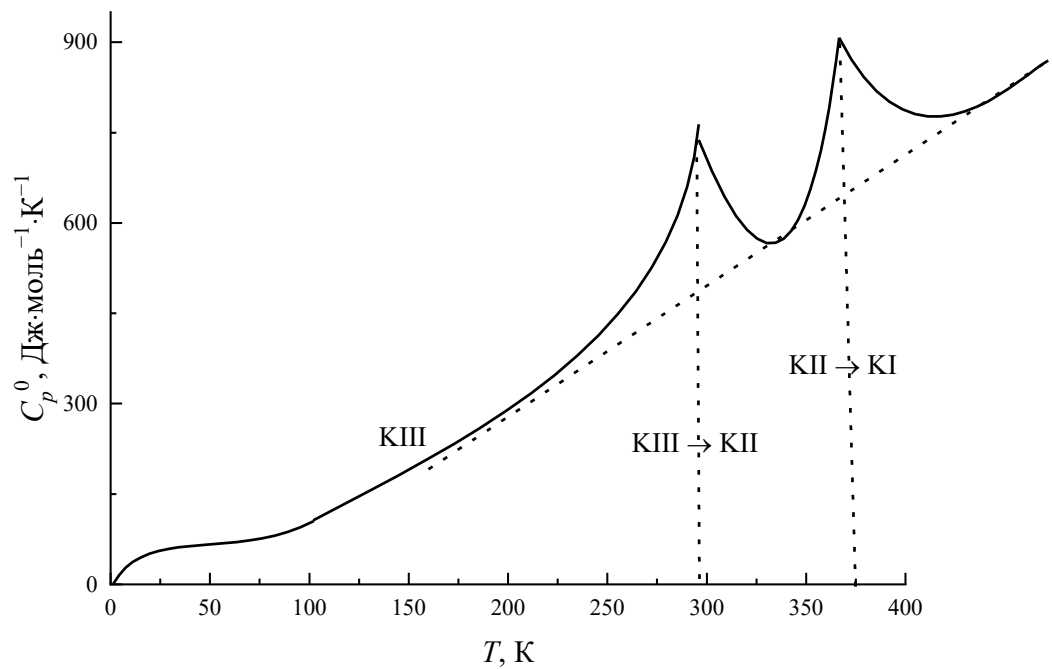


Рис. 1.5. Температурные зависимости изобарных теплоёмкостей лёгких фуллеренов C_{60} — (а) и C_{70} — (б).

Анализ литературы показывает ограниченное число работ, посвящённых термодинамическому изучению производных лёгких фуллеренов. Кратко остановимся на полученных данных:

— изучены температурные зависимости изобарной теплоёмкости кристаллосольвата $C_{60}Cl_{30} \cdot 0.09Cl_2$ [56], димерного комплекса $[(MeSi_3)_3C_{60}]_2$ [57], кристаллических комплексов бис-(η^6 -кумола) с фуллеридом хрома [58], гидрида фуллерена $C_{60}H_{36}$ [59], монокарбоксилированного фуллерена $C_{60}CHCOOH$ [60], водорастворимых аддуктов лёгких фуллеренов с L-лизином ($C_{60}(C_6H_{14}N_2O_2)_2$) [61], L-аргинином ($C_{60}(C_6H_{14}N_4O_2)_8$) [62], водорастворимых фуллеренолов $C_{60}(OH)_{40}$ [63] и $C_{70}(OH)_{12}$ [64] в широком диапазоне температур. В указанных работах рассчитаны значения стандартных термодинамических функций. В качестве примера на Рис. 1.6 представлена экспериментальная температурная зависимость изобарной теплоёмкости фуллеренола $C_{60}(OH)_{40}$, а также температурные зависимости изобарной теплоёмкости изомеров $C_{60}(OH)_{40}$ с равномерным распределением гидроксильных групп (uniform), и изомера, в котором гидроксильные группы расположены в экваториальной области (Saturn-like), рассчитанные методом DFT. Видно, что в отличие от фуллерена C_{60} , на температурной зависимости изобарной теплоёмкости не наблюдается фазовых переходов.

— авторы [65] с помощью эффузионного метода Кнудсена исследовали температурную зависимость давления насыщенных паров производного $C_{60}F_{18}$ в интервале температур $T = 591\text{--}671$ К;

— авторы [66] определили стандартную молярную энтальпию сгорания и рассчитали стандартные молярные энтальпии образования в твёрдом и газообразном состояниях производного $C_{60}F_{48}$.

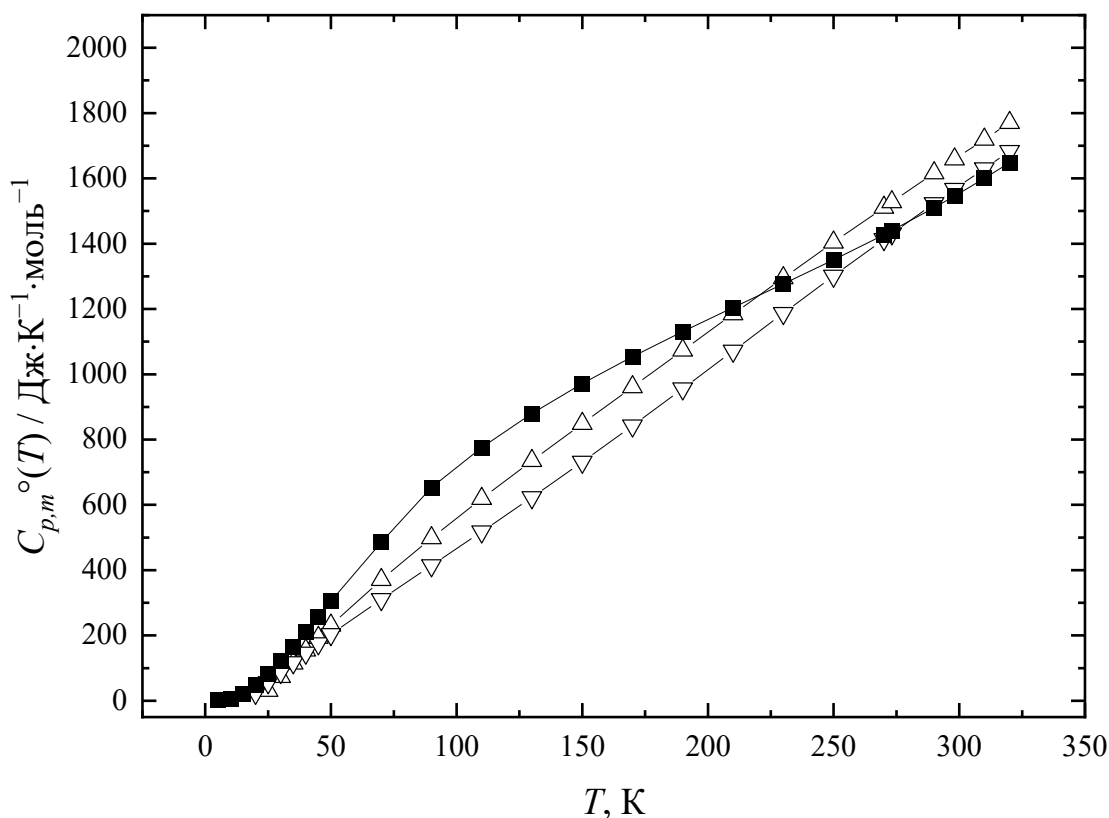


Рис. 1.6. Температурная зависимость изобарной теплоёмкости $C_{60}(\text{OH})_{40}$ в интервале температур $T = 5\text{--}326$ К [64]. ■ — экспериментальные данные, ▽ — расчёт методом DFT для фуллеренола с равномерным распределением гидроксильных групп; △ — расчёт методом DFT для фуллеренола с фуллеренола, в котором гидроксильные группы расположены в экваториальной области.

1.3. Химические свойства фуллеренов

Как было отмечено выше, молекула фуллерена C_{60} имеет два типа связей: между шестичленными и пятичленными циклами (связи 6–5) и более короткие связи между двумя шестичленными циклами (связи 6–6), которые принято рассматривать, как двойные. Причиной значительной локализации двойных связей в молекуле фуллерена C_{60} является отклонение геометрии двойных связей от нормальной планарной. Благодаря жёсткости фуллеренового каркаса циклогесатриеновые фрагменты в молекуле C_{60} остаются плоскими, несмотря на значительную пирамидализацию. Напряжение, возникающее в результате пирамидализации, является причиной относительно высокой реакционной способности фуллеренов по сравнению с другими формами углерода.

Известно, что фуллерены способны образовывать несколько типов производных: экзоэдральные (продукты, в которых лиганд присоединён к внешней сфере фуллерена), эндоэдральные (продукты, в которых лиганд содержится внутри молекулы фуллерена), гомофуллерены (образуются при разрыве одной или нескольких связей фуллеренового каркаса) и фуллексиды (комплексы с переносом заряда) [67].

Для фуллеренов характерны реакции нуклеофильного присоединения, радикального присоединения, реакции циклоприсоединения, реакции электрофильного присоединения, реакции переноса электронов и др. Схема, иллюстрирующая химические свойства фуллеренов на примере фуллерена C_{60} , представлена на Рис. 1.7.

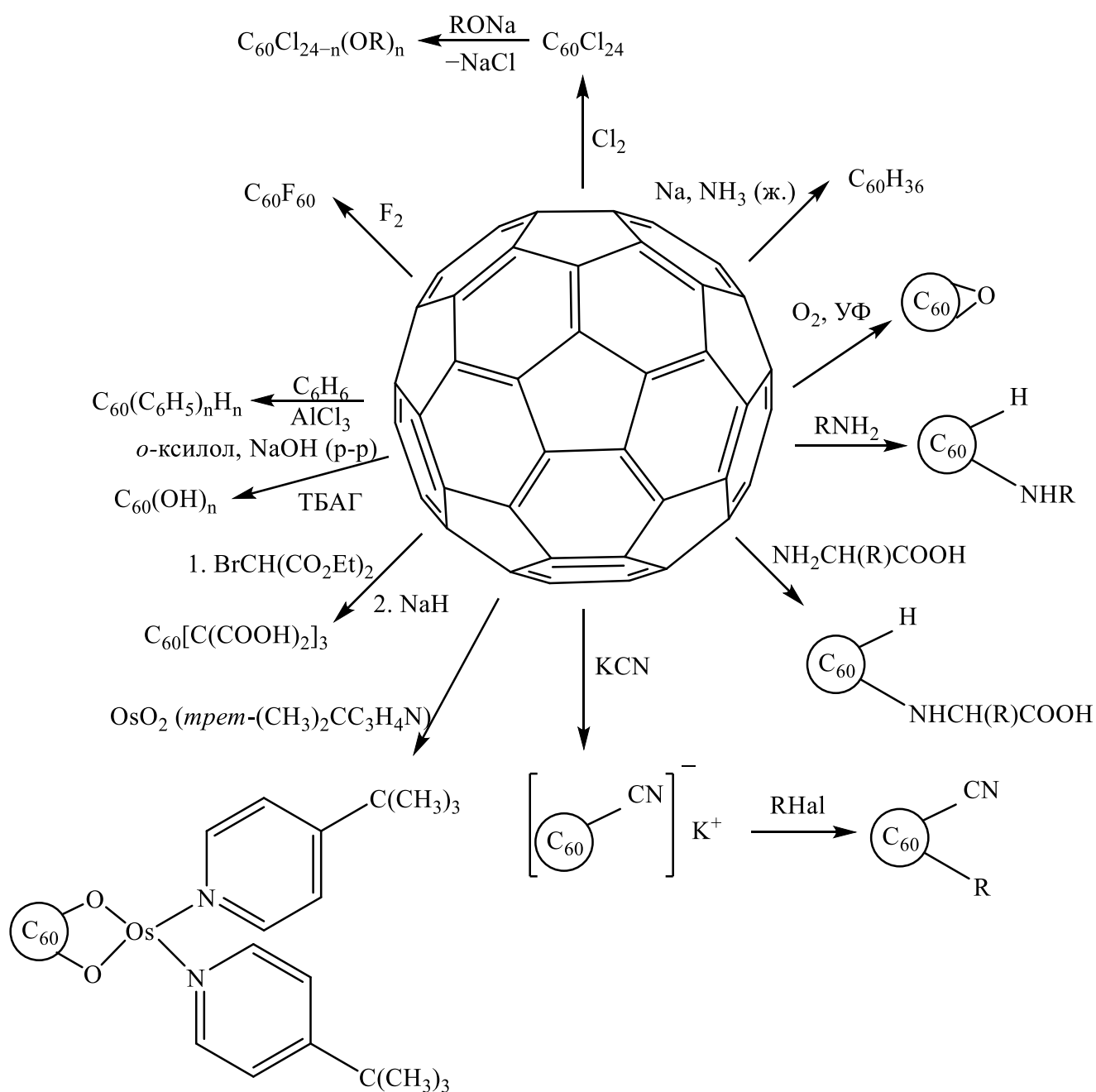
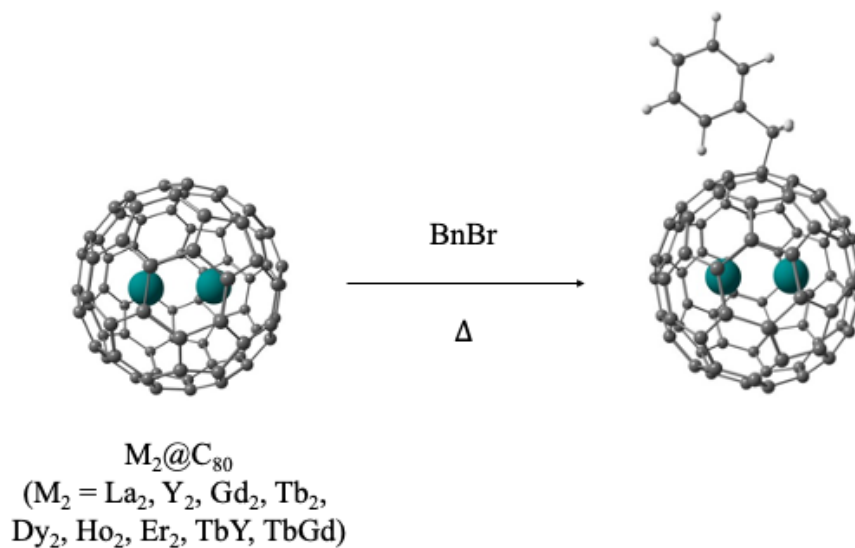


Рис. 1.7. Химические свойства фуллеренов на примере C_{60} [68,69].

Отдельным перспективным направлением является разработка методов функционализации ЭМФ, так как данные методы лежат в основе получения перспективных материалов биомедицинского назначения (тераностиков, контрастирующих агентов). Реакции ЭМФ делятся на три основных класса: реакции с открытием кока ЭМФ, избирательная бифункционализация ЭМФ и функционализация ЭМФ с одинарным связыванием (Рис. 1.8) [70].

(a)



(б)

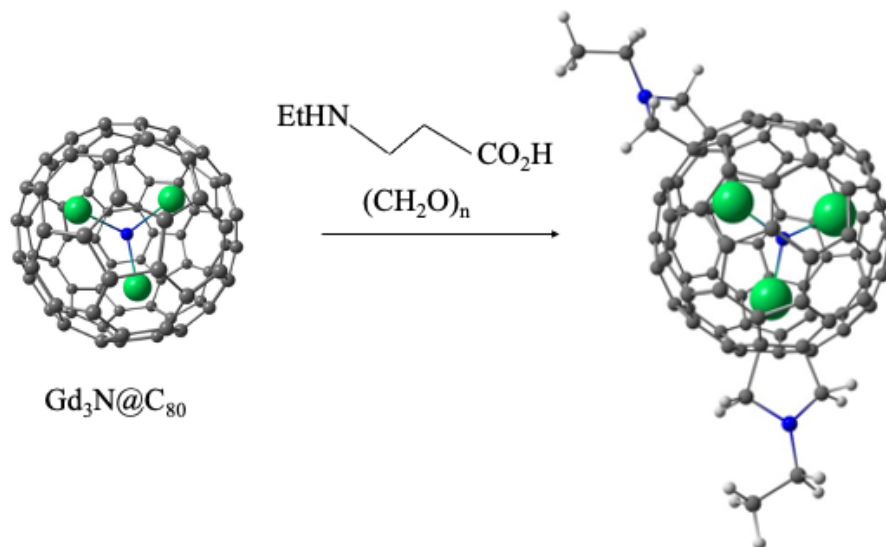


Рис. 1.8. Примеры реакций функционализации ЭМФ с одинарным связыванием (a) и избирательная бифункционализация (б) [70].

Среди различных способов функционализации фуллеренов реакции открытия кока позволяют получить доступ во внутреннее пространство «заблокированной» углеродной

сферы. Вудл и др. впервые представили концепцию создания отверстия в углеродном скелете в 1995 году (Рис. 1.9) [71].

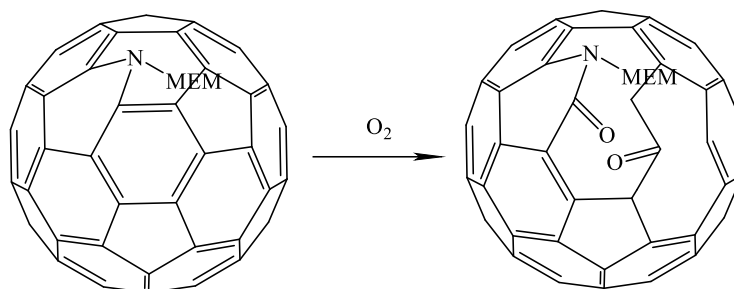


Рис. 1.9. Реакция с открытием углеродного скелета [71].

С тех пор было разработано несколько вариантов реакций с открытием кора C_{60} и C_{70} . Важным результатом является тот факт, что доступны фуллерены с открытой клеткой, которые позволяют инкапсулировать небольшие молекулы, такие как H_2 [72], H_2O [73], NF_3 [74] и даже CH_4 [75]. На Рис. 1.8а в качестве примера представлена реакция эндоэдрального металлофуллерепа $La_2@D_2C_{72}$, с 5,6-дифенил-3-(2-пиридил)-1,2,4-триазином [76].

Функционализация ЭМФ с одинарным связыванием — наиболее распространённый способ функционализации ЭМФ. Именно так получают основные классы аддуктов — фуллеренолы и карбоксипроизводные. На основе ЭМФ с гадолинием получали и идентифицировали водорастворимые сложноэфирные, $Gd@C_{2n}(C(COOC_2H_5)_2)_x$, при использовании ДМФА экстракта $Gd@C_{2n}$ [77]. Также с помощью реакции Бингеля был получен новый моноаддукт эфира малоновой кислоты ЭМФ $Gd@C_{82}[C(COOC_2H_5)_2]$, был синтезирован (Рис. 1.10). Полученный продукт очищали с помощью ВЭЖХ и далее гидролизовали в щелочной среде до водорастворимого $Gd@C_{82}[C(COONa)_2]$.

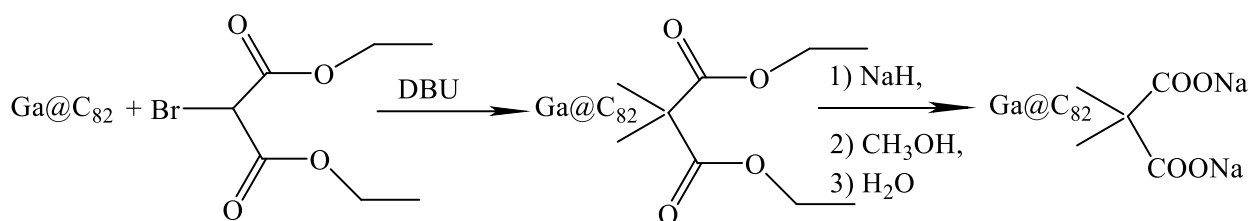


Рис. 1.10. Схема синтеза моноаддуктов Бингеля — Хирша $Gd@C_{82}$ [78].

Из множества способов функционализации фуллеренов и ЭМФ наиболее развиты методы получения фуллеренолов, содержащих от 1–4 до 40–45 гидроксильных групп на поверхности фуллерепа. Интерес к изучению фуллеренолов связан с тем, что данные

соединения проявляют антиоксидантные, антимуtagenные, противоопухолевые и другие свойства [4,64,79].

В настоящее время наиболее перспективными для дальнейшего практического применения являются аддукты лёгких фуллеренов с аминокислотами, пептидами, а также фуллеренолы и карбоксилированные фуллерены. Исследование данных соединений проводится на протяжении многих лет на кафедре химии твёрдого тела Института химии СПбГУ в научной группе профессора И. В. Мурина. Основные подходы к синтезу данных соединений обобщены в нескольких обзорах, опубликованных в нашей научной группе в журналах *Progress in Solid State Chemistry*, *Journal of Molecular Liquids* [1–4].

1.4. Физико-химические свойства растворов фуллеренов и их производных

Фуллерены и эндофуллерены растворимы в неполярных и слабо полярных органических средах, что связано со спецификой строения и взаимодействий этих объектов между собой и молекулами растворителя. Фуллерены C_{60} , связанные в решётке силами Ван-дер-Ваальса, преимущественно переходят в среды с ароматическими молекулами, родственными фуллеренам по структуре пяти- и шестичленных циклов углеродного каркаса. В ароматических углеводородах существенную роль играют π - π -взаимодействия молекул фуллерена и растворителя. Другим важным фактором является полярность растворителя. Например, переход от бензола к дихлорбензолу даёт эффект улучшения растворимости C_{60} [5]. Как правило, фуллерены организуются в кластеры, состоящие из 10^1 – 10^4 молекул, что приводит к нелинейной оптической восприимчивости [80], сольватохромному эффекту [81] в растворах. Кластеризацию C_{60} наблюдали в неполярных ароматических растворителях — бензоле [78,82] и толуоле [83], где вблизи предела растворимости агрегаты по массе растут экспоненциально во времени, но легко разрушаются при перемешивании раствора. Структурирование C_{60} происходит не только в ароматических растворителях, таких как *o*-ксилол [84,85], но и в неполярном растворителе CS_2 [85]. Данные рассеяния нейтронов показали, что сольватация фуллеренов идёт путём наращивания одинарного слоя молекул растворителя на их поверхности [85]. Поэтому наблюдаемый радиус инерции фуллерена C_{60} в CS_2 , $r_G = 0.391$ нм, больше его геометрического радиуса $r = 0.348$ нм. Это согласуется со снижением скорости диффузии фуллеренов, тормозящейся сольватной оболочкой. Образование кластеров фуллеренов носит пороговый характер в зависимости от их концентрации и полярности растворителей (смесей), определяемой диэлектрической

постоянной ε [86]. Кластеризацию фуллеренов анализировали методами рассеяния света, рентгеновских лучей и нейтронов, оптического поглощения [87–90], изучая кинетику роста агрегатов и связь между их массой и размером (фрактальную размерность). Например, для C_{60} в бензоле фиксировали рост кластеров с фрактальной размерностью ~ 2.1 за времена ≤ 100 суток [91]. Таким образом, самоорганизация фуллеренов в растворах — их фундаментальное свойство, которое распространяется и на ЭМФ и их производные.

Изучение фазовых равновесий в системах, содержащих фуллерены, имеет большое значение для разработки методов их выделения из фуллереновой сажи или фуллереновой смеси, для изучения химических реакций с их участием, а также оптимизации способов их применения. Следует отметить, что из-за несовместимости индивидуальных фуллеренов с водой и водными растворами возможности их практического применения значительно ограничены. Следовательно, актуальным является создание новых методов функционализации фуллеренов, приводящих к получению водорастворимых аддуктов. В свою очередь, изучение их физико-химических свойств позволит прогнозировать возможности практического использования в различных областях науки техники [92,93].

Анализ литературы показывает ограниченное число данных, посвящённых физико-химическим свойствам растворов водорастворимых производных фуллеренов, при этом можно выделить несколько направлений исследований:

— авторы [1–3,60,61,63,64,83,97–107] исследовали физико-химические свойства таких производных фуллеренов, как фуллеренолы, карбоксилированные фуллерены, производные лёгких фуллеренов с L-аминокислотами и получили экспериментальные данные по концентрационным зависимостям избыточных термодинамических функций, теплоёмкостей, плотностей, показателей преломления, электропроводностей, констант диссоциации, кажущейся степени диссоциации, распределения частиц по размерам, коэффициентов диффузии, вязкости и др., а также изучили диаграммы растворимости в бинарных и тройных системах, содержащих водорастворимые производные фуллеренов. Отдельного внимания заслуживает применение полуэмпирической модели VD-AS (Virial Decomposition Asymmetric Model) для описания термодинамического поведения водорастворимых производных фуллеренов в бинарных системах аддукт фуллерена-вода. Данная модель основана на вириальном разложении избыточной молярной энергии Гиббса раствора по мольным долям компонентов [93]:

$$\frac{G^{ex}}{RT} = (n_1 + n_2) \sum_{i=1} \sum_{j=1} x_1^i x_2^j \cdot \lambda_{ij} = \frac{\sum_{i=1} \sum_{j=1} n_1^i n_2^j \cdot \lambda_{ij}}{(n_1 + n_2)^{i+j-1}} \quad (1),$$

где G^{ex} — полная молярная избыточная энергия Гиббса раствора, $R = 8.31$ Дж·К⁻¹, T — температура (К), n_i и x_i — число молей и мольная доля i -го компонента, соответственно, λ_{ij} — ij -ый вириальный коэффициент в разложении $\frac{G^{ex}}{RT}$ по числам молей компонентов, верхние пределы суммирования в общем случае не лимитированы и могут быть произвольными.

На основании данной модели были рассчитаны избыточные термодинамические функции и границы потери диффузионной устойчивости для бинарных систем, содержащих фуллеренолы и аддукты лёгких фуллеренов с L-аминокислотами [94,96,99,104,105].

— несколько работ посвящено компьютерному моделированию систем, содержащих производные лёгких фуллеренов с аминокислотами, а именно: изучению реакций C₆₀ с аминокислотами, расчёту констант диссоциации (рK_a) производных фуллеренов с аминокислотами, изучению структуры, спектральных и термодинамических характеристик, механизмов сольватации, оптических свойств и др. [99,106,107].

1.5. Биологическая активность и перспективы использования водорастворимых аддуктов фуллеренов

1.5.1. Антиоксидантные и цитопротекторные свойства

В последнее десятилетие биологические свойства фуллеренолов стали предметом интенсивных исследований. Остановимся сначала на антиоксидантных и цитопротекторных свойствах одного из наиболее изученных аддуктов фуллеренов — полигидроксилированных фуллеренов (фуллеренол). Фуллереновые аддукты можно считать перспективными соединениями для профилактики и коррекции ишемического повреждения. Известно, что радикалы кислорода играют важную роль в патогенезе ишемического и реперфузионного повреждения [108]. Именно поэтому большое количество исследований антиоксидантного действия различных функционализированных фуллеренов, в том числе и фуллеренолов, было проведено на модели ишемии-реперфузии. Например, антиоксидантная активность фуллеренола C₆₀(OH)₁₈₋₂₀, полученного согласно [109], была продемонстрирована в экспериментах по трансплантации тонкой кишки у собак [110]. Установлено, что как при

профилактических, так и при лечебных инъекциях он снижал уровень свободных радикалов, образующихся в результате постишемического реперфузионного повреждения. Такой же эффект фуллеренола $C_{60}(OH)_{18-20}$ был продемонстрирован и при ишемически-реперфузионном повреждении кишечника [110].

Цай и др. [111] показали, что фуллеренол блокирует вызванное перекисью водорода ингибирование передачи сигналов нейронами гиппокампа крысы *in vitro*. Способность $C_{60}(OH)_{24}$ захватывать нитроксильный радикал была продемонстрирована Мирковым и др. [112]. Предварительное введение крысам $C_{60}(OH)_{24}$ предотвращало вызванное нитроксильным радикалом снижение активности ферментов, таких как каталаза, глутатионтрансфераза и глутатионпероксидаза. Также фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ снижал образование реакционноспособных форм тиобарбитуровой кислоты, проявляя тем самым свойства антиоксиданта. По эффективности оно было сравнимо с действием такого известного антиоксиданта, как бутилгидрокситолуол. Имеются данные о том, что в тесте с использованием ксантин-ксантинооксидазной системы фуллеренол способен захватывать супероксидный анион-радикал [112]. В работе Жа и др. [113] было показано, что направленное биологическое действие и возможная токсичность фуллеренола связаны с его локальной концентрацией. Эти данные были получены при изучении влияния различных концентраций фуллеренола на культивируемые нейроны гиппокампа крысы. При этом фуллеренол в зависимости от концентрации либо способствовал гибели клеток, либо защищал их от повреждения. Одним из возможных механизмов антиоксидантного действия фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ является его стимулирующее влияние на транскрипционный фактор NRF2. NRF2 представляет собой фактор транскрипции, контролирующей экспрессию антиоксидантных ферментов. Например, авторы работы [114] представили данные, свидетельствующие о цитопротекторных и антиапоптотических свойствах фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$, обусловленных его способностью индуцировать NRF2-зависимую экспрессию генов, кодирующих ферменты гемоксигеназу-1, НАДФН: хининоксидоредуктазу 1 и γ -глутамилцистеин лигазу. Несмотря на то, что к настоящему времени установлены различные биологические эффекты фуллеренолов, мало что известно об их возможном генотоксическом действии. Анализ хромосомных aberrаций и блокирования цитокинеза показал, что фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ в концентрациях 11–221 мкМ не оказывает генотоксического действия на клетки яичников китайского хомячка [115].

Эффект захвата свободных радикалов и цитопротекторное действие трех образцов фуллеренолов ($C_{60}(OH)_{6-12}$, $C_{60}(OH)_{32-34} \cdot 7H_2O$ и $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$) изучали на кератиноцитах человека (NaCaT), подвергшихся воздействию УФ-излучения [116]. Установлено, что повреждения NaCaT, вызванные действием УФБ (280–315 нм) или УФА (315–400 нм) сильнее подавлялись фуллеренолом с самым высоким содержанием гидроксильных групп: $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$. В результате УФВ-облучения в клетках NaCaT быстро повышался уровень внутриклеточного окислительного стресса, происходило образование циклобутанпиримидиновых димеров и конденсация хроматина. Все эти эффекты подавлялись в присутствии $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$. Таким образом, повреждающее действие УФВ-облучения на кератиноциты можно предотвратить с помощью фуллеренола $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$, цитопротекторный эффект которого связан с поглощением АФК.

При сравнении эффектов фуллеренола $C_{60}(OH)_{18-20}$ с эффектами аскорбиновой кислоты с целью выяснения механизма её антиоксидантного действия установлено, что оба соединения ингибируют пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов крыс, гладкомышечных клеток коронарной артерии человека и некоторых других типов клеток. Примечательно, что фуллеренол (в большей степени, чем аскорбиновая кислота) ингибировал аллоксан-индуцированное образование супероксидных анион-радикалов и дозозависимо снижал активность цитозольной протеинкиназы С и тирозиновой протеинкиназы [117]. Возможно, что подавление пролиферации сосудистых клеток фуллеренолом может быть, по крайней мере частично, связано с его способностью непосредственно ингибировать тирозиновую протеинкиназу. Известно, что полифенолы куркумин, эскулетин, скопарон и байкалеин ингибируют пролиферацию гладкомышечных и моноклеарных клеток сосудов *in vitro* [118–123]. Это указывает на сходство биологической активности фенолов и фуллеренола, который, в принципе, является полигидроксилированным олефином.

Особый интерес представляют ярко выраженные прооксидантные свойства фуллеренов, позволяющие использовать фуллерены в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ. Благодаря фотодинамической активности фуллерены являются потенциальными противоопухолевыми агентами. ФДТ — метод локальной световой активации фотосенсибилизатора, накапливающегося в опухоли, который в присутствии тканевого кислорода приводит к развитию фотохимических реакций, разрушающих

опухолевые клетки. При дефиците кислорода фуллерен способен продуцировать свободные радикалы, что также приводит к гибели клеточной линии аденокарциномы гортани человека (Нер-2) через каспаза-3-зависимый механизм [124].

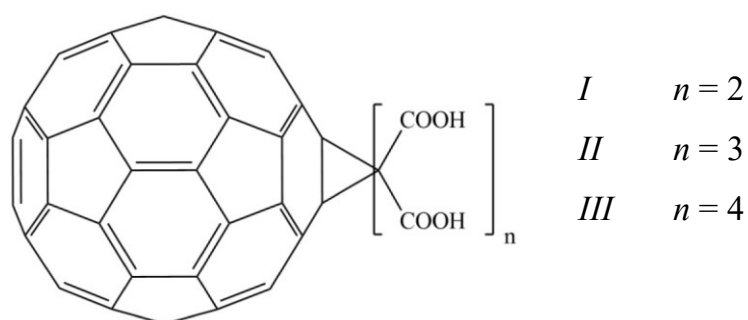
В результате изучения механизмов противоопухолевого действия фуллеренов были получены данные о способности фуллеренов и их аддуктов вызывать повреждение нуклеиновых кислот. При этом как нативные фуллерены, солюбилизированные циклодекстрином [125], поливинилпирролидоном [126] и липосомами [127], так и химически модифицированные аддукты фуллерена [128], вызывали повреждение ДНК. Показано, что фуллерены могут вызывать разрыв цепи ДНК только при облучении УФ или видимым светом и в присутствии доноров электронов. В темноте повреждения ДНК не происходит, а в отсутствие донора электронов фотодинамическая эффективность фуллерена резко падает. Следует отметить, что повреждение ДНК происходит именно по остаткам гуанозина [129], причём повреждение может происходить как через синглетный кислород, так и через супероксидные анион-радикалы; в отсутствие кислорода повреждения не происходит [130]. Установлено, что механизм фотодинамического кислородопосредованного повреждения ДНК реализуется за счёт реакции циклоприсоединения молекулы кислорода к пуриновому основанию гуанозина с образованием нестабильного эндопероксида [131]. Протекание последующих реакций, а также состав конечных продуктов зависят от положения гуанозина в двойной цепи ДНК. Предпринимались попытки создать гибридную фуллеренол-олигонуклеотидную молекулу для адресной доставки и повреждения определённых участков ДНК за счёт фотодинамического действия фуллереновой части.

Авторы [132] синтезировали тройные гибридные соединения олигонуклеотид- C_{60} -триметоксииндол (антибиотик и противоопухолевый препарат дуокармицинового ряда) с целью специфического связывания с сайтами ДНК и образования устойчивых тройных спиралей. Показано, что эти соединения образуют с ДНК тройные спирали, но образующиеся при этом комплексы обладают низкой стабильностью. В результате фотовозбуждения фуллерен C_{60} и фуллеренол $C_{60}(OH)_{18}$ могут генерировать активный кислород и вызывать значительное перекисное окисление липидов и окисление белков в мембранах. Помимо повреждения ароматических аминокислот в белках за счёт реакции циклоприсоединения, синглетный кислород способен избирательно реагировать с

аминокислотами цистеином и метионином, так как атомы серы в их составе имеют относительно высокую электронную плотность [133].

На микросомах печени крыс [134] показано, что фотоиндуцированное действие фуллеренола превосходит действие фуллерена C_{60} , при этом повреждающим агентом в фотодинамическом эффекте C_{60} является синглетный кислород, а в случае фуллеренола $C_{60}(OH)_{18}$ — супероксидный анион-радикал. Эти явления можно предотвратить путём добавления в исследуемую систему эндогенных природных антиоксидантов (глутатиона, аскорбиновой кислоты и токоферола). Антиоксидантная активность обнаружена и у не менее перспективных аддуктов лёгких фуллеренов — карбоксилированных фуллеренов.

Ранее считалось, что C_3 проявляет свойства ловушки радикалов [12,13]. В работе [135] изучали фотоиндуцированную цитотоксичность дималоновой кислоты C_{60} (*I*), трималоновой кислоты C_{60} (*II*) и квадромалоновой кислоты C_{60} (*III*). В культуре клеток HeLa все эти аддукты ($C = 40$ мкМ) проявляли фотоиндуцированную цитотоксичность, уменьшающуюся с увеличением количества остатков малоновой кислоты. При отсутствии освещения никаких эффектов не наблюдалось. Дималоновая кислота C_{60} проявляла цитотоксический эффект на клетки HeLa при освещении, и этот эффект дозозависимо усиливался с увеличением концентрации. Отмечено, что в результате фотоиндуцированного действия соединения *I* происходило значительное повреждение клеток. В отсутствие освещения цитотоксический эффект соединения *I* не наблюдался даже при концентрации 60 мкМ.



С помощью тех же соединений изучено цитопротекторное действие карбоксифуллеренов на клетки миобластов (C2C12). Среди этих соединений квадромалонат C_{70} эффективно защищал клетки C2C12 от окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 [136].

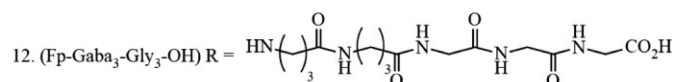
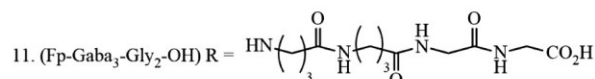
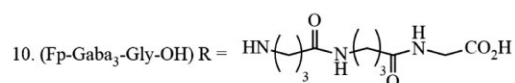
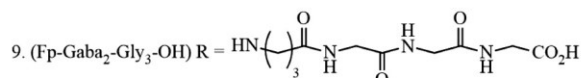
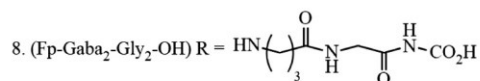
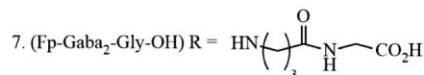
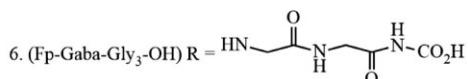
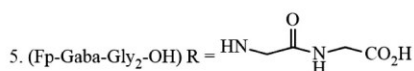
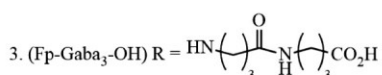
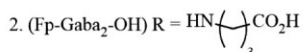
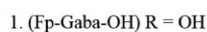
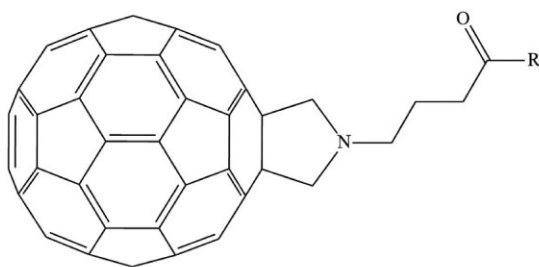
Авторы работы [137] сравнили цитопротекторную активность двенадцати водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} на эмбрионах рыб *Danio rerio*. Эта серия

включала C₃, серию монозамещенных дендрофуллеренов, серию C₃-подобных фуллеренов и два оксоаминофуллерена. Отмечено, что C₃ обладал наиболее сильным защитным действием на модели гентамицин-индуцированной цитотоксичности.

Следующий класс соединений с антиоксидантными свойствами — это фуллерены, функционализированные различными аминокислотами, пептидами и белками. Существует множество подходов к получению аминокислотных аддуктов фуллерена, включая прямое аминирование фуллерена аминокислотами [32,138,139].

Аддукты фуллеренов с пептидами благодаря наличию фуллеренового ядра обладают следующим набором свойств: трёхмерная архитектура молекул; высокая липофильность; уникальные электронные свойства. И, наоборот, пептидная составляющая обеспечивает структурное разнообразие в зависимости от длины и аминокислотного состава; реализация различных зарядовых состояний; способность к молекулярному распознаванию. В настоящее время остаётся малоизученным вопрос о влиянии фуллеренового ядра на трансмембранный транспорт аддуктов, а также их влиянии на жизнеспособность клеток и антимикробную активность.

Белакович и др. [140] провели сравнительную оценку антиоксидантной активности *N*-замещённых фуллеропирролидинов, содержащих боковую пептидную цепь (IV), с помощью антиоксидантного анализа FOX. Показано, что все соединения обладают более выраженной антиоксидантной активностью, чем витамин С.



IV

Как известно, оксидативный стресс играет важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Исходя из этого, соединения, обладающие антиоксидантной активностью, привлекают внимание исследователей как потенциальные лекарственные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний. В исследованиях [141,142] показано, что нейропротекторная активность функционализированных фуллеренов обусловлена их способностью действовать как ловушки АФК. Имеются данные о корреляции между нейропротекторной эффективностью различных карбоксифуллеренов и их антиоксидантной активностью [143]. Были исследованы шесть различных карбоксифуллеренов, миметиков супероксиддисмутазы. В качестве модели для оценки структурно-функциональной взаимосвязи между реакционной способностью с супероксидами и защитой нейронов авторы рассматривали нейротоксичность, опосредованную NMDA-рецепторами, в которых участвует внутриклеточные супероксиды. Установлена также корреляция между нейропротекторной активностью функционализированных фуллеренов и их дипольным моментом. В работе [144] утверждается, что карбоксифуллерен является перспективным терапевтическим средством для лечения болезни Паркинсона благодаря своим

антиоксидантным свойствам, что было подтверждено в исследованиях *in vivo* на модели болезни Паркинсона у приматов (*Macaque fascicularis*).

Нейропротекторная активность аддуктов фуллеренов включает также антиамилоидное действие. Согласно «амилоидной гипотезе» возникновения и развития болезни Альцгеймера полимеризация и отложение β -амилоида является одной из основных причин, нарушающих функционирование, а впоследствии и целостность нейронов.

1.5.2. Токсичность фуллеренов

Первые исследования токсичности фуллерена появились в 1995–1996 гг. [145,146]. При изучении острой токсичности показано, что при введении мышам фуллерена в дозе 2.5 г/кг он не вызывал гибели и нарушений поведения подопытных животных в течение восьми недель. Многочисленные дальнейшие исследования также не выявили каких-либо нежелательных или токсических проявлений при действии фуллерена на организм. По токсикологической классификации вещества, проявляющие токсичность в дозах выше 1 г/кг, относятся к классу нетоксичных веществ. Таким образом, данные о введении кристаллического фуллерена в дозе 2.5 г/кг свидетельствуют о том, что это нетоксичное соединение [147].

В работе [148] показано, что фуллерены не раздражают кожу и слизистые оболочки глаз, не проявляют сенсibiliзирующих свойств и не проникают в более глубокие слои кожи. Значимых токсических эффектов при пероральном введении фуллерена не наблюдается, что свидетельствует о низкой степени всасывания фуллерена из желудочно-кишечного тракта и его эффективного выведения.

При взаимодействии с водой фуллерен способен образовывать ассоциаты различного размера и, соответственно, различной степени токсичности. Поэтому, наряду с повышением привлекательности фуллеренов для медицинского применения, существует также некоторая неопределённость в отношении их токсичности и последствий их использования. Функционализация C_{60} со снижением кажущейся токсичности может существенно повлиять на характер взаимодействия фуллеренов с биологическими системами [149]. При определённых условиях C_{60} может вызывать лизис эритроцитов человека в зависимости от дозы и времени, который можно было купировать введением *N*-ацетил-L-цистеина, что указывает на роль АФК в этом процессе [150]. Показано, что фуллерен C_{60} в виде водной коллоидной дисперсии не проявляет

токсических свойств, а проявляет только антиоксидантные свойства [151]. Этот вывод основан на более чем десятилетних биологических испытаниях дисперсии фуллеренов в различных экспериментах *in vitro* и *in vivo*, не выявивших каких-либо токсических эффектов (при концентрациях $C = 10^{-9}$ – 10^{-4} моль·л⁻¹ и при суммарных дозах до 25 мг/кг). Таким образом, приведённые выше данные, полученные разными исследователями на разных моделях *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о том, что C₆₀ при местном применении и внутривнутрибрюшинном введении не проявляет острой токсичности.

Для изучения хронической токсичности был проведён длительный эксперимент на крысах [152], в рацион которых добавляли фуллерен в виде раствора в оливковом масле. В качестве контроля использовались диеты с добавлением только оливкового масла и воды. Фуллерен почти удвоил продолжительность жизни крыс (Рис. 1.11).

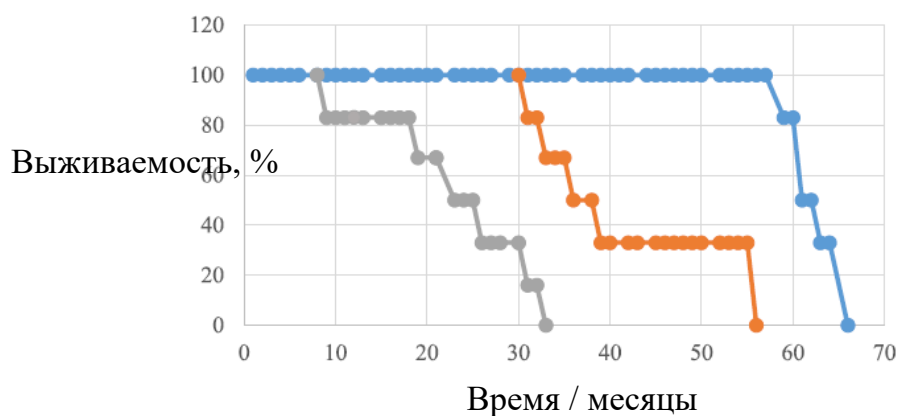


Рис. 1.11. Выживаемость крыс при кормлении водой (контрольная группа) (●), оливковым маслом (●) и раствором фуллерена C₆₀ в оливковом масле (●).

Различные рационы не влияли на динамику массы животных, что также свидетельствует об отсутствии токсических эффектов у C₆₀. Анализ механизмов действия растворов C₆₀ в оливковом масле на экспериментальной модели крыс с четырёххлористым углеродом показал, что влияние на продолжительность жизни связано в основном с подавлением окислительного стресса. Аналогичным действием обладает фуллеренол C₆₀(ОН)_{22–24}. Крысам предварительно вводили C₆₀(ОН)_{22–24}, а затем также подвергали воздействию четырёххлористого углерода, что приводило к образованию трихлорметильного радикала CCl₃• [153]. Известно, что CCl₃• в присутствии кислорода образует трихлорметилпероксирадикалы типа CCl₃OO•, которые приводят к быстрому окислению жиров в клетках. Установлено, что предварительное введение фуллеренола C₆₀(ОН)_{22–24} останавливало накопление сывороточных маркеров поражения этих органов

и, соответственно, развитие гистологических признаков поражения печени и почек. Кроме того, предварительная обработка фуллеренолом приводила к увеличению соотношения восстановленный/окисленный глутатион. Таким образом, фуллеренол $C_{60}(OH)_{22-24}$, являясь ловушкой для свободных радикалов, оказывает нефро- и гепатопротекторное действие, защищая клетки печени и почек от токсического действия четырёххлористого углерода.

Авторы [154] исследовали действие фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на модели изолированной матки крысы. Также при использовании раствора фуллеренола он снижал активность Cu/Zn-супероксиддисмутазы и предотвращал индуцированное повышение активности глутатионредуктазы в присутствии диметилсульфоксида.

Авторы [155] охарактеризовали механизмы цитотоксичности фуллерена C_{60} и его полигидроксилированного аддукта фуллеренола в отношении различных клеточных культур: клеток фибросаркомы мыши L929, клеток глиомы крысы C6, клеток глиомы человека U251. Цитотоксичность фуллерена была выше, чем у фуллеренола, при этом C_{60} вызывал быстрый некроз (по механизму фотореактивного окисления) клеток без фрагментации ДНК, а фуллеренол индуцировал апоптоз, фрагментацию ДНК и повреждение клеточных мембран. Можно предположить, что в отличие от фуллерена, для которого фотоиндуцированная продукция свободных радикалов является основным механизмом действия на клетки, гидроксилированный аддукт в высоких дозах, по-видимому, влияет на внутриклеточные молекулярные механизмы апоптоза, связанные с ограниченными процессами протеолиза, запускаемыми активацией каспаз.

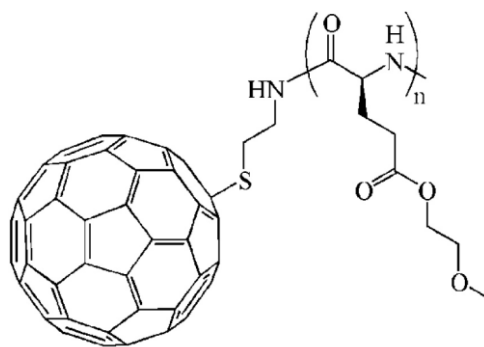
В экспериментах *in vivo* была показана потенциальная защитная функция фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ при токсическом воздействии доксорубина на клетки печени, почек и сердца [156–159]. Авторы установили, что фуллеренол проявляет свойства гепато-, кардио- и нефропротекторов.

Известно, что доксорубин является распространённым противоопухолевым препаратом, но его применение ограничено из-за его низкой селективности и кардиотоксичности. Показано, что конъюгат доксорубина с фуллереном C_{60} накапливается в ядрах опухолевых клеток значительно быстрее, чем доксорубин без вектора. Проникновение комплекса доксорубина с фуллереном в клетки увеличивается на 20–30 % по сравнению с таковым без фуллерена. В экспериментах *in vivo* на мышях с перевитыми опухолями комплекс доксорубина с фуллереном C_{60} приводил к

увеличению продолжительности жизни в 2.5 раза и уменьшению объёма опухоли на 63 % по сравнению с индивидуальным доксорубицином. Важно отметить, что повышение эффективности препарата не приводило к усилению побочных эффектов, что было показано морфологическим анализом.

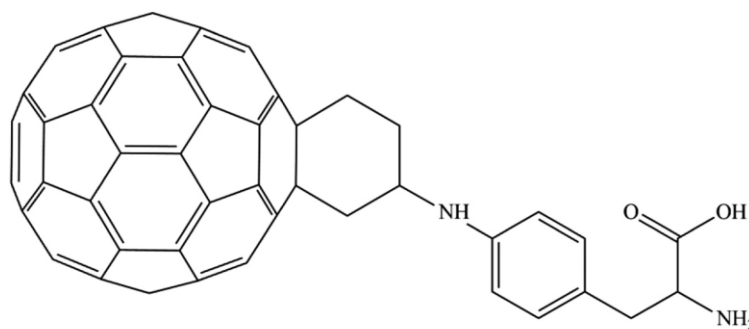
Для определения потенциальной токсичности фуллеренолов остановимся на результатах работы [160], в которой эпидермальные кератиноциты человека подвергались воздействию фуллеренолов с низким ($C_{60}(OH)_{20}$), средним ($C_{60}(OH)_{24}$) и высоким ($C_{60}(OH)_{32}$) содержанием гидроксильных групп в интервале концентраций $C = 0.0005\text{--}42.5$ мкг/мл в течение 24 и 48 ч. Статистически значимое снижение жизнеспособности клеток наблюдали только при использовании фуллеренола с высоким содержанием гидроксильных групп $C_{60}(OH)_{32}$ при концентрации водного раствора $C = 42.5$ мкг/мл через 24 ч. Авторы пришли к выводу, что различные аддукты гидроксильных фуллеренолов не вызывают воспалительного или цитотоксического действия при использовании растворов с концентрацией не более 8.55 мкг/мл.

Сюй и др. [161] изучали влияние аддукта C_{60} -GluEG (*V*) при различных концентрациях и инкубации в течение 12 и 24 ч на клеточную линию HeLa и показали, что C_{60} -GluEG также обладает низкой цитотоксичностью и высокой биосовместимостью.



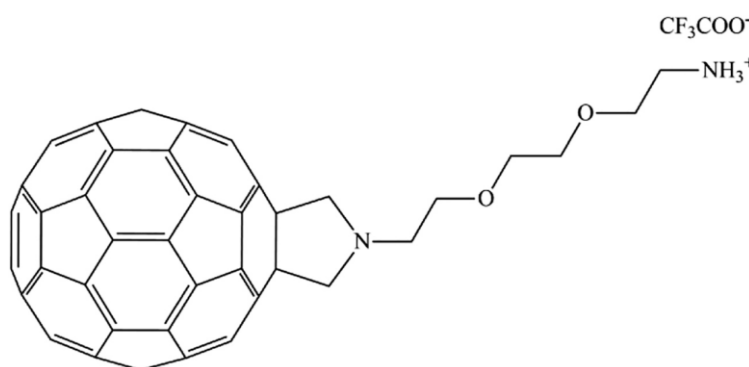
V

Роуз и др. [162] исследовали влияние фуллеренового пептида (Вaa-Lys (FITC)-NLS) (*VI*) на клеточную линию НЕК-293 в диапазоне концентраций $C = 0.00004\text{--}0.4$ мг/мл. Обнаружено, что жизнеспособность клеток, измеренная методом МТТ через 48 ч инкубации, значительно снижается ($p < 0.05$) при концентрациях Вaa-Lys (FITC)-NLS 0,04 и 0.4 мг/мл.



VI

Лукафо и др. [163] провели *in vitro* исследование биологических свойств катионного аддукта фуллерена (VII), относящегося к классу аминфуллеренов, на модели клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека (MCF7). При изучении цитотоксичности данный аддукт не вызывал клеточного смерти. Показано, что благодаря наличию гидрофильной цепи VII проникает в клетки MCF7 путём пассивной диффузии и равномерно распределяется в цитоплазме клеток. Он также не накапливается в ядре и органеллах независимо от времени экспозиции клеток. Катионный фуллерен не проникает в лизосомы и митохондрии клеток, что позволяет ограничить, а в некоторых случаях даже избежать его ферментативной деградации. В связи с этим функционализированные фуллерены имеют широкие перспективы использования в качестве носителей для адресной доставки противоопухолевых препаратов к опухолевым клеткам.



VII

Таким образом, при оценке токсичности фуллереновых аддуктов следует учитывать не только введённую дозу, но и ряд других параметров: степень агрегации, способ солубилизации, наличие соразтворителей, количество и структуру лигандов.

1.5.3. Биодegradация фуллеренов

Известно, что углеродные наноструктуры, а именно нанотрубки и графен, подвергаются биодegradации [164]. Например, окисленные углеродные нанотрубки могут быть полностью разрушены растительными ферментами, такими как пероксидаза хрена и др. [165,166]. В продуктах разложения были идентифицированы ароматические молекулы, такие как бензальдегид, бензиловый спирт, пирокатехин (1,2-дигидроксибензол) и флороглюцин (флороглюцин, 1,3,5-тригидроксибензол). В свою очередь, при изучении дegradации фуллерена разные авторы отмечают стабильность фуллеренового ядра [167–175]. Даже использование фуллерена C_{60} , меченного атомами ^{14}C , не позволило установить его детектируемую трансформацию в почве или в организме червей, а было отмечено, что захвату фуллерена и его биоаккумуляции препятствует размер самой молекулы [167]. Чрезвычайно медленная минерализация $^{14}C-C_{60}$ в почве показана в работе [168], в которой также отмечено, что фуллерен C_{60} может накапливаться в растениях, особенно в корнях. При биодegradации фуллеренов преимущественно происходит промежуточное образование фуллеренолов [169–171]. Перечисленные работы свидетельствуют об устойчивости фуллерена C_{60} к действию биологических факторов. В ряде исследований отмечено, что в биологических системах фуллерен претерпевает изменения под действием различных веществ, при этом реакции протекают преимущественно на поверхности ядра с образованием эпоксидов, полуацеталей и гидроксильных аддуктов и не приводят к нарушению топологии молекулы [172–175].

Ранее было показано, что под влиянием миелопероксидазы, фермента нейтрофилов млекопитающих, происходит глубокая дegradация молекул фуллерена C_{60} [176]. Наноразмерные молекулярные коллоидные дисперсии C_{60} , полученные путём смешивания C_{60} в растворе толуола с водой с использованием ультразвука, подвергались биодegradации [177]. Эта биодegradация, вызванная реакцией фуллерена с гипохлоритом, генерируемым ферментом, приводит к разрушению ядра фуллерена, признаками которого являются изменение окраски раствора, исчезновение поглощения в области выше 300 нм электронного (УФ/видимого) спектра и исчезновение «фуллереновых» полос в ИК-спектрах [176].

Фотодegradация нанотрубок и фуллеренов под действием реактива Фентона изучалась в работах [178,179]. В обоих случаях первыми стадиями процесса было гидроксильное окисление как фуллерена C_{60} , так и углеродных нанотрубок. Поэтому

неудивительно, что последующие превращения приводят к полициклическим насыщенным аддуктам. В случае нанотрубок в качестве конечных продуктов отмечают 2-гидроксиэтан-1,1,2-трикарбоновую кислоту, щавелевую кислоту и продукты полного окисления — CO_2 и H_2O [178]. В случае фуллерена C_{60} образующиеся полициклические фрагменты при раскрытии кольца, приводят к образованию различных гидроксилзамещённых α,ω -дикислот, дальнейшее окисление которых приводит к образованию уксусной кислоты, этанола и пропилена, а также продуктов окисления [179].

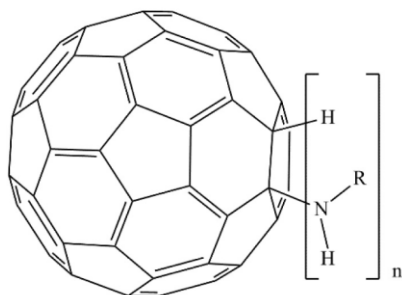
1.5.4. Радиопротекторные свойства

Фуллеренолы могут быть использованы в качестве радиопротекторов. В работе [180] сравнивали эффективность фуллеренола $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 10$ и 100 мг/кг) и стандартного радиопротектора амифостина ($C = 300$ мг/кг) в защите крыс от воздействия ионизирующего излучения. Установлено, что фуллеренол лучше, чем амифостин, предотвращает радиационно-индуцированное снижение уровня лейкоцитов (гранулоцитов и лимфоцитов), особенно в течение первых 7 дней после облучения. При патоморфологическом исследовании выявлено, что радиозащитное действие фуллеренола (по сравнению с амифостином) более выражено в селезёнке, тонкой кишке и лёгких, при этом амифостин превосходит фуллеренол по радиозащитным свойствам при защите сердца, печени и почек.

Авторы [181] изучали способность фуллеренола $\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$ уменьшать повреждения, вызванные высокоэнергетическими электронами (6 МэВ) в мембранах эритроцитов человека. В результате проведённых исследований авторы обнаружили следующие эффекты: снижение пострadiационного гемолиза, оттока калия и окисления тиоловых групп, предотвращение радиационно-индуцированного повышения текучести мембран и изменения конформации белков. Сделан вывод, что радиозащитные свойства фуллеренола связаны с его способностью поглощать АФК.

Как отмечалось ранее, при определённых условиях аддукты фуллеренов способны защищать клетки от действия ультрафиолетового излучения и других видов излучения [182,183]. Ху и др. [135] изучали биологические эффекты аддуктов фуллерена C_{60} с фолацином (*VIII*) и аминокислотами L-фенилаланином (*VIII*) и L-аргинином (*VIII*) на опухолевой клеточной линии HeLa. Показано, что при облучении клеток HeLa видимым светом наблюдается снижение митохондриального мембранного потенциала, жизнеспособности клеток, активности ферментов СОД, каталазы, глутатионпероксидазы,

что в совокупности приводит к активации каспазы-3 и, соответственно, к запуску программы апоптоза клеток.



1. $R = \text{CH}_2\text{COOH}$ $n = 1$
2. $R = p\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$ $n = 1$
3. $R = (\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ $n = 1$
4. $R = (\text{CH}_2)_5\text{COONa}$
5. $R = (\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ $n = 1$
6. $R = (\text{CH}_2)_5\text{COONa}$
7. $R = \text{C}_4\text{H}_6\text{COOH}$
8. $R = (\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ $n = 1$
9. $R = L, D\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$ $n = 1$
10. $R = L, D\text{-C}(\text{CH}_2\text{OH})\text{COOH}$ $n = 1$
11. $R = L, D\text{-C}(=\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ $n = 1$
12. $R = \text{CH}_3\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CHCOOH}$ $n = 1$
13. $R = \text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}_2\text{COOH}$ $n = 1$
14. $R = \text{C}_8\text{H}_8\text{COOH}$ $n = 1$
15. $R = \text{C}_8\text{H}_5\text{OSCOOH}$ $n = 4$
16. $R = \text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4\text{SCOOH}$ $n = 3$

VIII

Цзян и др. [184] изучали биологическое действие аддукта фуллерен-глицин (VIII) на клеточных линиях HeLa и Lm8. В результате исследований установлено, что аддукт фуллерена с глицином при облучении ($\lambda = 500\text{--}600$ нм) вызывает дозозависимую гибель клеточной линии Lm8 и индуцирует апоптоз в клеточной линии HeLa. По мнению авторов, гибель клеток происходит в основном за счёт повреждения фосфолипидов и белков клеточных мембран. Под действием света аддукт фуллерена с глицином переходит из возбуждённого синглетного состояния в возбуждённое триплетное по механизму, подобному для немодифицированного фуллерена. Затем синглетный кислород мгновенно вступает в реакцию с белками, нуклеиновыми кислотами и фосфолипидами мембран, что приводит к повреждению и гибели клеток.

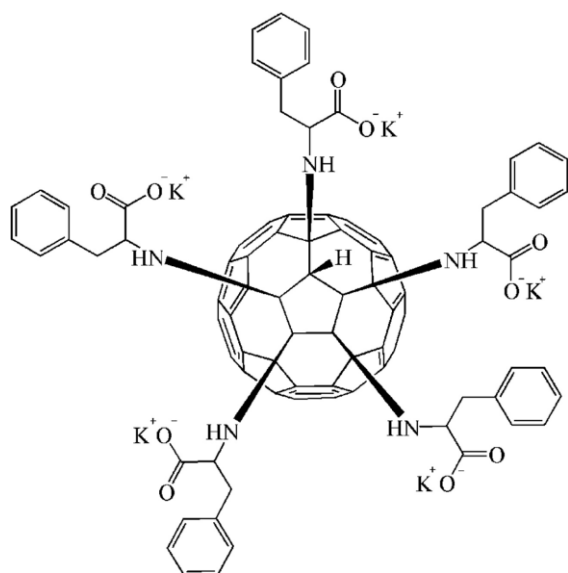
1.5.5. Доставка лекарств

Одним из важнейших направлений современной медицинской химии и фармакологии является адресная доставка лекарств. Уникальные свойства наноматериалов на основе лёгких фуллеренов и их биологическая активность могут быть использованы для адресной доставки лекарств и вакцин в центральную нервную систему, для борьбы с онкологическими, кардиологическими и другими заболеваниями.

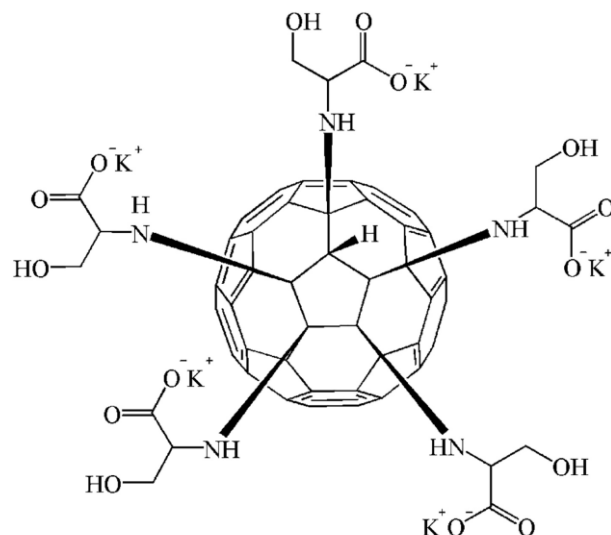
Аддукты фуллерена с аминокислотами эффективно проникают через гематоэнцефалический барьер и выступают переносчиками лекарственных препаратов к нервной ткани. В исследовании [185] *in vivo* на мышах и крысах показали, что комплекс фуллерена C_{60} с гексаметонием блокирует эффекты центрального *H*-холиномиметика

никотина, проявляя противосудорожную активность и влияя на двигательную активность, вызванную введением никотина. Баланс гидрофильных и липофильных свойств надмолекулярного комплекса гексаметония с функционализированными фуллеренами предполагает возможность создания систем доставки полярных веществ в ЦНС на основе функционализированных молекул фуллерена C₆₀.

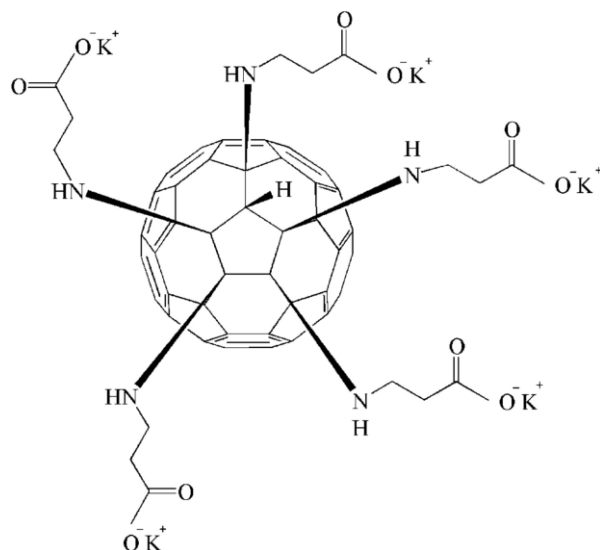
Способность аддуктов фуллерена с аминокислотами проникать через гематоэнцефалический барьер и выступать переносчиками лекарственных средств в нервную ткань описана также в работе [186]. Авторы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* установили, что аддукты фуллерена C₆₀ с различными аминокислотами: — L-фенилаланином (IX), L-серином (X) и β-аланином (XI) и с остатками γ-фенилмасляной кислоты (XII), подавляют пролиферацию клеток глиобластомы и снижают скорость их роста на модели рыб вида *Danio rerio*. Выявлено также, что аддукт фуллерена C₆₀ с L-фенилаланином ингибирует рост глиобластомы, не замедляя восстановление нейронов и не влияя на нейральные стволовые клетки. Предположительно, противоопухолевый механизм действия аддуктов фуллерена C₆₀ с аминокислотами объясняется их участием в регуляции свободнорадикальных процессов. В частности, аддукт фуллерена C₆₀ с γ-фенилмасляной кислотой оказывал существенное влияние на пролиферацию нервных стволовых клеток и их восстановление, не влияя на опухолевый рост. Стоит отметить, что поверхностные функциональные группы определяют свойства, а также взаимодействия аддуктов C₆₀ с нейральными стволовыми клетками и клетками глиомы. Авторы предположили, что различные концевые солибилизирующие группы могут влиять на растворимость, размер и самосборку водорастворимых аддуктов фуллерена с аминокислотами [186].



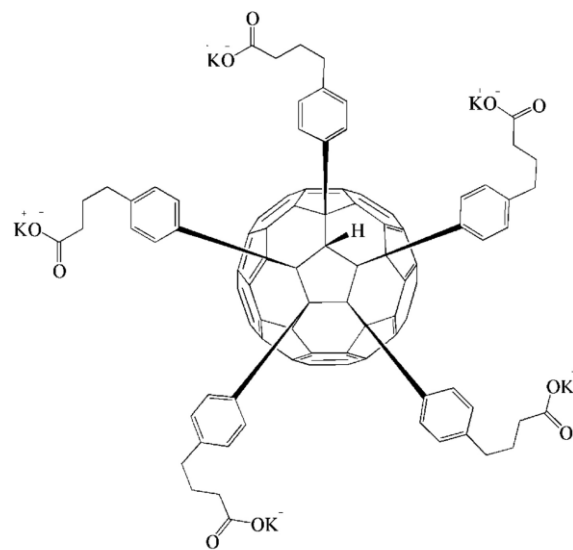
IX



X



XI



XII

Фуллерены, функционализированные порфиринами, также обладают способностью доставлять лекарственные вещества. В [187,188] были исследованы кардиопротекторные свойства ^{25}Mg -PMC16. Эта наночастица, обладая низкой токсичностью, пригодна для адресной доставки в сердечную мышцу катионов $^{25}\text{Mg}^{2+}$, необходимых для активации синтеза АТФ.

1.5.6. Антиоксидантные свойства при облучении

Авторы [189] синтезировали аддукты фуллерена C_{84} с двумя, тремя и четырьмя остатками малоновой кислоты и протестировали их в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ на клеточной линии HeLa. Из всех исследованных аддуктов наибольшую эффективность показал фуллерен C_{84} , модифицированный четырьмя остатками

малоновой кислоты (квадромалонат). Это соединение было способно снижать пролиферацию клеток HeLa до 80 % под действием видимого света (400–700 нм) в присутствии кислорода. В связи с этим авторы пришли к выводу, что синтезированный квадромалонат фуллерена имеет перспективы в качестве фототерапевтического агента.

При изучении эффективности различных водорастворимых карбоксифуллеренов в качестве фотосенсибилизаторов использовали шесть соединений: дималонаты C_{60} и C_{70} (ДМ), трисмалонаты C_{60} и C_{70} (ТМ) и квадромалонаты C_{60} и C_{70} (КМ) (Рис. 1.12). Оценку проводили по их фотодинамическому действию на клетки линии HeLa [190]. Оказалось, что из шести карбоксифуллеренов наиболее эффективным оказался ТМ70, а общий ряд по способности вызывать фотодинамические повреждения выглядит следующим образом: ТМ70 > ДМ70 > КМ70 > ТМ60 \approx ДМ60 > КМ60.

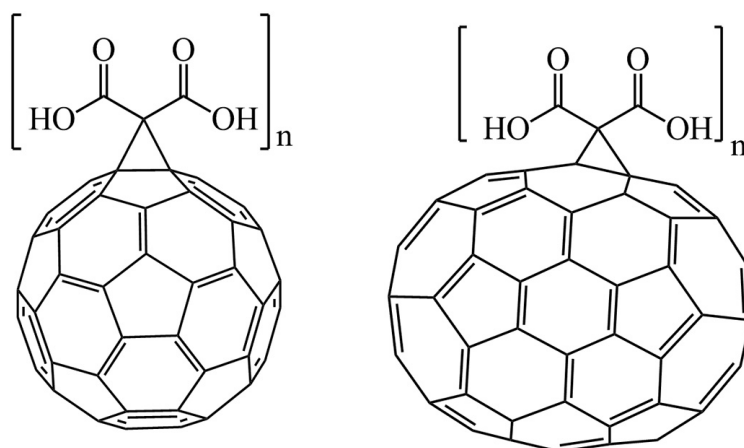
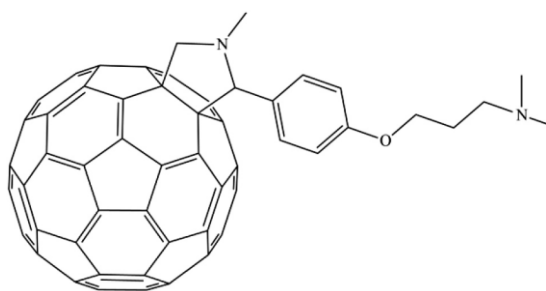


Рис. 1.12. Структуры карбоксифуллеренов C_{60} (слева) и карбоксифуллеренов C_{70} (справа) с разным количеством аддуктов ($n=2-4$).

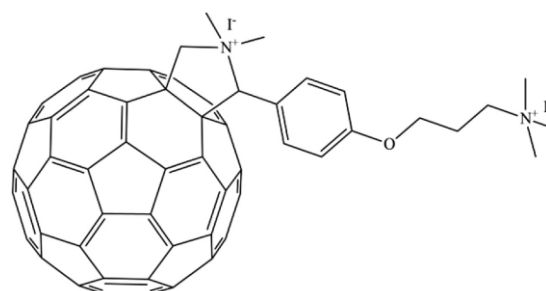
Поэтому, учитывая высокий потенциал этих соединений для фотодинамической терапии, был изучен механизм их фототоксичности. Эксперименты показали, что ТМ70 фагоцитируется клетками линии HeLa в виде небольших кластеров, которые накапливаются преимущественно в эндосомоподобных органеллах. Наблюдаемый в этих исследованиях высокий ФДТ-эффект ТМ70, вероятно, связан с кислотностью окружающей среды в этих органеллах (например, лизосомах), что способствует дезагрегации наночастиц с образованием более мелких ассоциатов, вплоть до отдельных молекул [191]. Прямые измерения размеров частиц трёх карбоксифуллеренов C_{70} методом динамического светорассеяния в концентрации 2.5 мкМ в питательной среде показали, что ТМ70 образует частицы с гидродинамическим диаметром около 52 нм, т. е. меньше, чем ДМ70 и КМ70. Таким образом, получается, что именно выраженный

«размерный эффект» для ТМ70 может способствовать образованию АФК и ускорять фотоиндуцированную гибель клеток по сравнению с ДМ70 и КМ70. Однако в указанных работах подробное изучение строения изучаемых соединений не проводилось. Поэтому нельзя исключать того, что работа велась не с отдельными веществами, а со смесью региоизомеров.

Агацци и др. [192] исследовали фотосенсибилизирующую способность инактивации *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) водорастворимыми аминокислотными фуллеренами. Соединение МРС₆₀ (XIII) получено 1,3-диполярным циклоприсоединением азидамин к молекуле фуллерена C₆₀. Соединение DPC₆₀²⁺ (XIV) было синтезировано по реакции метилирования с использованием ДМСО. Показано, что катионная форма XIV является эффективным фотосенсибилизатором при разложении триптофана. В результате исследования *in vitro* наблюдалась фотоиндуцированная гибель клеток *S. aureus* в присутствии 0.5 мкМ МРС₆₀ и DPC₆₀²⁺. Результаты данной работы указывают на возможность использования этих аминокислотных фуллеренов C₆₀ для фотоинактивации микробных клеток.

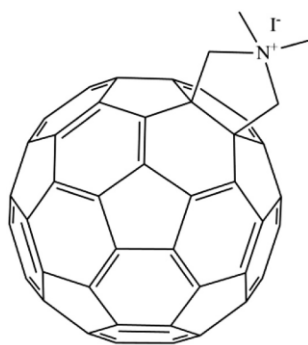


XIII

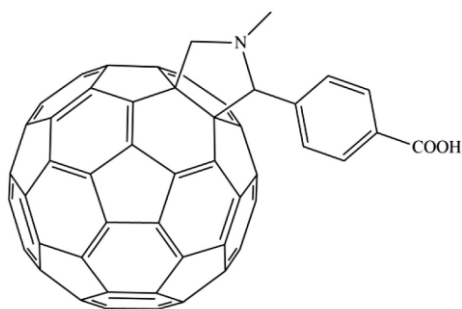


XIV

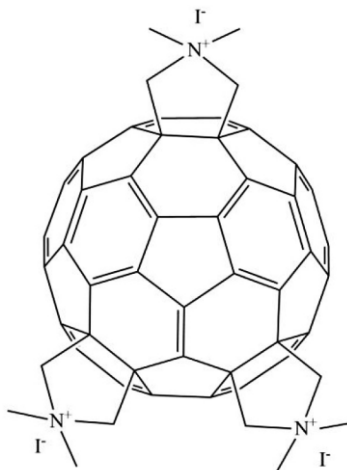
Хуанг и др. и Тегос и др. изучали возможность использования водорастворимых катионных фуллеренов ВВ4 (XV), ВВ4-ППБК (XVI) и ВВ6 (XVII) в качестве фотосенсибилизаторов для антимикробной ФДТ для уничтожения возбудителей инфекций: бактерий, простейших, грибов и вирусов [193,194]. Антимикробное действие катионных фуллеренов *in vitro* методом ФДТ оценивали путём добавления к клеточным суспензиям грамположительных метициллинрезистентных *S. aureus*, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*) и гриба *Candida albicans* (*C. albicans*). На примере *S. aureus* установлено, что соединения XV и XVI обладают высокой активностью, причём соединение XV проявляет большую активность за счёт его более высокой растворимости и меньшей склонности к образованию ассоциатов. Более того, соединения XV и XVI не ингибируют рост *E. coli* и *C. albicans*.



XV



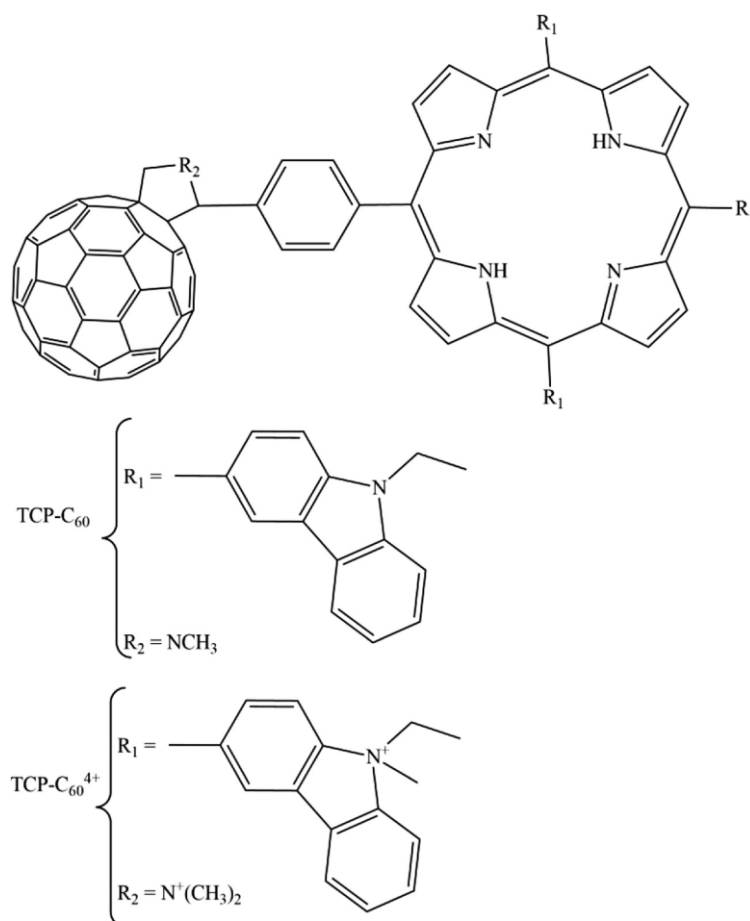
XVI



XVII

Развитие концепции использования фуллереновых аддуктов в качестве перспективных фотодинамических агентов, вызывающих расщепление ДНК и оказывающих цитостатическое действие, связано в том числе с разработкой систем адресной доставки фотосенсибилизатора (с помощью фуллеренового ядра) к ДНК [147].

Авторы [195] исследовали фуллерен-порфириновые диады: ТСП-С₆₀ и ТСП-С₆₀⁴⁺ (XVIII) в качестве фотосенсибилизаторов для фотоинактивации *S. aureus*. Исследования *in vitro* показали, что обе диады оказывают фототоксическое действие *in vitro*, причём для ТСП-С₆₀⁴⁺ оно было больше, чем для ТСП-С₆₀.



XVIII

1.5.7. Взаимодействие с белками

Взаимодействие фуллеренола $C_{60}(OH)_{44}$ с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и γ -глобулином исследовано в работе [196]. Было обнаружено, что $C_{60}(OH)_{44}$ способен эффективно тушить внутреннюю флуоресценцию белков по динамическому механизму. Из данных по тушению флуоресценции рассчитаны константы связывания (значения имеют порядок 10^4). Установлено, что связывание фуллеренола с белками является экзотермическим процессом. Также была изучена цитотоксичность исследуемого фуллеренола на клеточной линии желудочного эпителия ГЭС-1 и установили, что он может оказывать токсическое действие в отсутствие в среде культивирования бычьей сыворотки. Авторы отмечают, что добавление γ -глобулинов способствовало снижению токсического действия фуллеренола.

Имеются прямые доказательства образования надмолекулярных комплексов белков и фуллеренов [197]. В частности, в работе [198] был проведён докинг карбоксифуллерена C_{30} с четырьмя белками (ВИЧ-протеаза, фуллерен-специфические

антитела, ЧСА и БСА). Основной вывод из работы заключался в том, что обнаружена высокая степень гомологии сайтов связывания у протеаз ВИЧ, ЧСА и БСА.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Реактивы и их характеристики

Химические реактивы, использованные для синтеза аддуктов фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами, фуллеренола, карбоксилированного фуллерена, а также реактивы, использованные для изучения биосовместимости синтезированных веществ, представлены в Табл. 2.1.

Табл. 2.1. Характеристика использованных реактивов.

Реактив	Поставщик/производитель	Чистота/квалификация
Фуллерен C ₆₀	НПК «НеоТекПродакт»	99.9 %
o-Ксилол	АО «ВЕКТОН»	ХЧ
Гидроксид натрия	АО «ВЕКТОН»	ХЧ
Глицин	Sigma-Aldrich	98 %
L-Гидроксипролин	Sigma-Aldrich	98 %
L-Метионин	Sigma-Aldrich	98 %
L-Цистеин	Sigma-Aldrich	98 %
Аргон	ООО «Ленспецгаз»	99.999 %
2,2-Дифенил-1-пикрилгидразил	Sigma-Aldrich	99 %
Диэтилброммалонат	Sigma-Aldrich	92 %
Бром	АО «ВЕКТОН»	Ч
Бромид железа(III)	Sigma-Aldrich	98 %
Гидрид натрия	Sigma-Aldrich	90 %
Серная кислота	АО «ВЕКТОН»	ОСЧ
АДФ	Sigma-Aldrich	95 %
Диазабициклоундецен (ДБУ)	Sigma-Aldrich	99 %
Варфарин	Sigma-Aldrich	>97 %
Ибупрофен	Sigma-Aldrich	>98 %
Дигитонин	Sigma-Aldrich	>97 %
D-Глюкоза	АО «ВЕКТОН»	Ч
Лимонная кислота	АО «ВЕКТОН»	ЧДА
Цитрат натрия	АО «ВЕКТОН»	Ч
n-Нитрофенилацетат	АО «ВЕКТОН»	99.5 %
ЧСА	Sigma-Aldrich	>98 %

ДНК из спермы лосося со
средней массой 350 кДа

ООО «ТехноМедСервис»

>98 %

(методом гель-электрофореза)

Коллаген

ООО «БиолоТ»

—

2.2. Синтез водорастворимых аддуктов фуллерена C₆₀

2.2.1. Синтез аминокислотных аддуктов фуллерена C₆₀

Синтез аддуктов фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами проводился в соответствии с разработанной методикой. Для проведения синтеза гидроксид натрия (14.75 г) растворяли в воде (54 мл), после охлаждения раствора добавляли L-аминокислоту (26.7 ммоль) и этанол (270 мл). Затем к полученному раствору добавляли насыщенный раствор фуллерена C₆₀ (1 г) в *o*-ксилоле (131.5 мл) и реакционную смесь в атмосфере аргона перемешивали при комнатной температуре в течение семи дней. Схема реакции взаимодействия фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами представлена на Рис. 2.1.

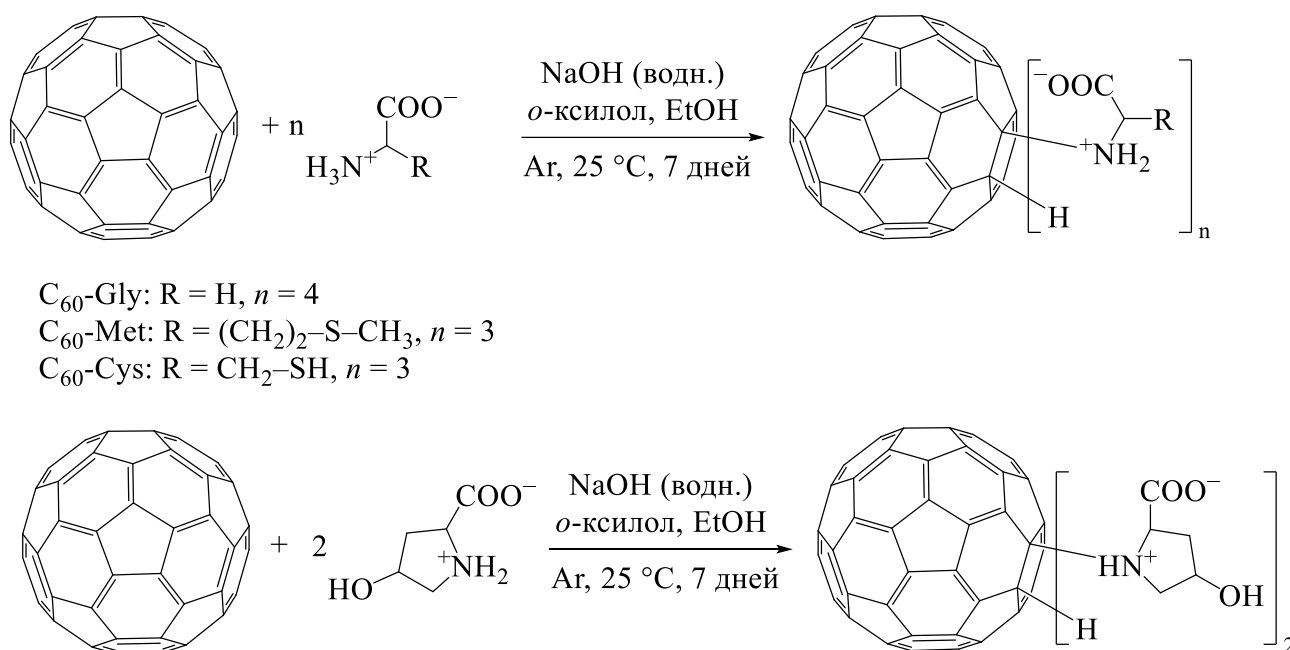


Рис. 2.1. Схема реакции синтеза аддуктов фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами (глицином, L-гидроксипролином, L-метионином и L-цистеином).

Далее из реакционной смеси удаляли растворители (вода, этанол, *o*-ксилол) с использованием роторного испарителя RV3V (ИКА, Германия), при этом температуру не поднимали выше 65 °С. Для удаления непрореагировавшего фуллерена осадок растворяли в воде и полученную гетерогенную систему фильтровали (фильтр «синяя лента»). Затем раствор был нейтрализован с помощью соляной кислоты до pH = 7 и очищен диализом с использованием диализных мембран (Viscase, США, отсечение по

массе 1 кДа) против деионизированной воды. Далее удаляли воду из полученного раствора на роторном испарителе. Полученный осадок высушивали при 65 °С в течение 4 ч. Выход продуктов реакции представлен в Табл. 2.2.

Табл. 2.2. Выходы продуктов реакций синтеза различных аддуктов фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами.

Наименование вещества	Выход, %
C ₆₀ -Gly	91
C ₆₀ -Нур	85
C ₆₀ -Cys	87
C ₆₀ -Met	85

2.2.2. Синтез полигидроксиллированного фуллерена C₆₀(OH)₂₄

Синтез фуллеренола C₆₀(OH)₂₄ осуществлялся в два этапа по методике, предложенной в работе [199]. Сначала получали бромпроизводное C₆₀Br₂₄ реакцией между C₆₀ и бромом в присутствии катализатора FeBr₃ [200], после чего проводили гидролиз полученного продукта водным раствором NaOH, схема реакции представлена на Рис. 2.2. Избыток щелочи удаляли диализом с использованием диализных мембран (Viscase, США, отсечение по массе 1 кДа) против деионизированной воды. Выход конечного продукта составил 95 %.

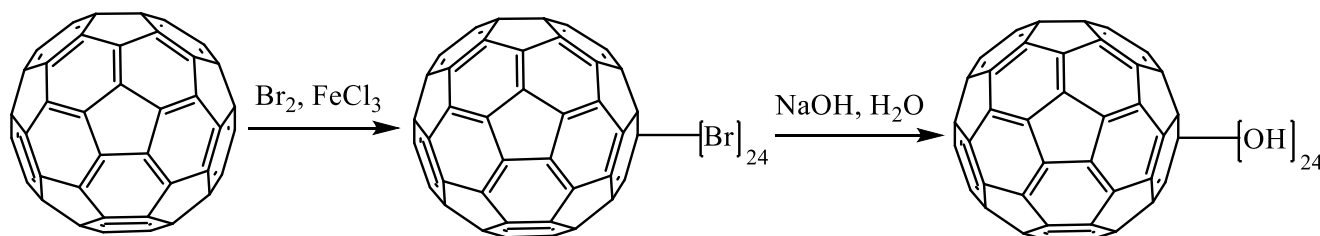


Рис. 2.2. Схема реакции синтеза фуллеренола C₆₀(OH)₂₄.

2.2.3. Синтез карбоксилированного фуллерена C₆₀[C(COOH)₂]₃

Синтез C₆₀[C(COOH)₂]₃ проходил в две стадии по методикам, описанным в работах [201,202]. Сначала проводили реакцию циклопропанирования путём обработки фуллерена C₆₀ диэтилброммалонатом в присутствии основания (ДБУ), в результате чего получали сложноэфирное производное, которое затем подвергали гидролизу и получали конечный продукт. Выход конечного продукта составил 65 %. Схема синтеза C₆₀[C(COOH)₂]₃ представлена на Рис. 2.3.

(a)

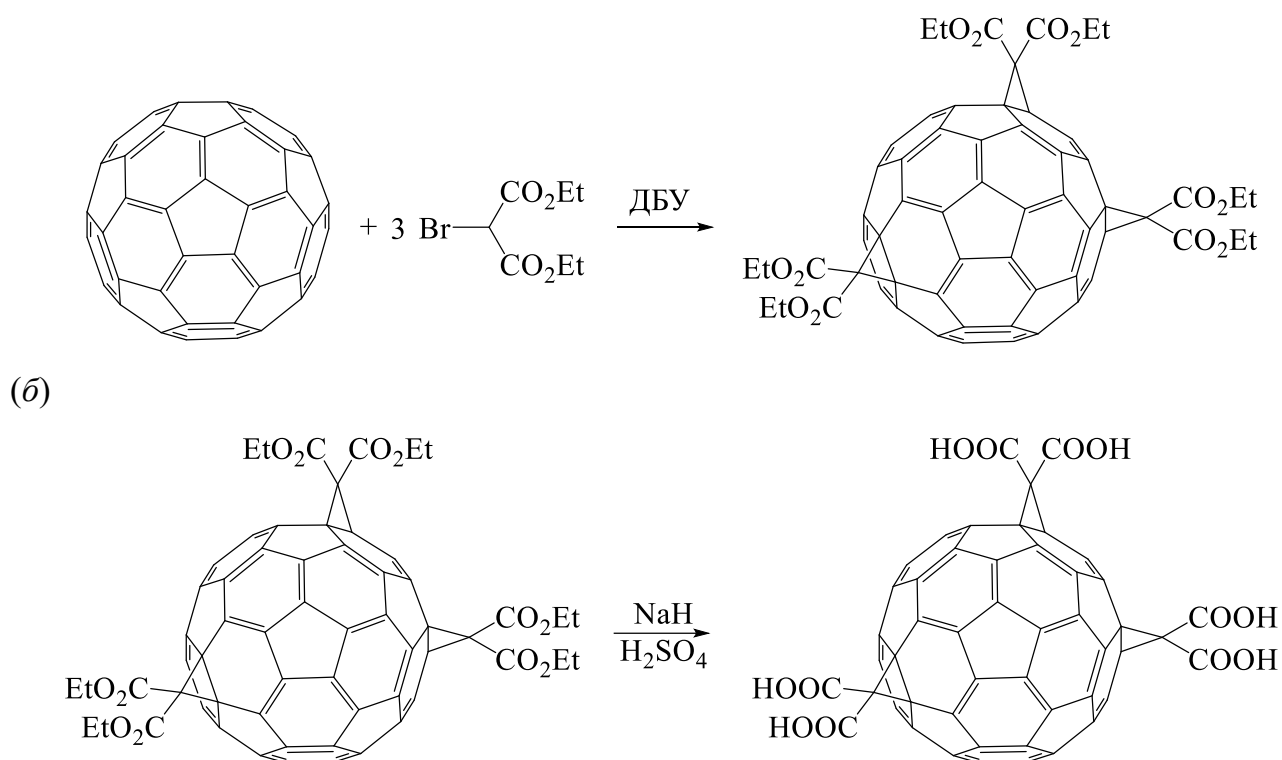


Рис. 2.3. Схема реакций синтеза $C_{60}[C(COOH)_2]_3$: циклопропанирование C_{60} — (а); гидролиз сложноэфирного производного фуллерена C_{60} — (б).

2.3. Идентификация водорастворимых производных фуллерена C_{60}

Для определения содержания С, Н, N в полученных образцах был использован элементный анализатор EuroEA3028-НТ (Eurovector SpA, Италия).

Для регистрации спектров ^{13}C использовали кросс-поляризационную последовательность импульса возбуждения (метод CP/MAS), а также метод прямого возбуждения (метод DE). Выбор твердотельного варианта ЯМР-спектроскопии обусловлен тем, что производные образуют крупные ассоциаты в водных растворах, что делает невозможным получение спектров высокого разрешения в жидкой фазе. Измерение ЯМР-спектров проводилось на спектрометре Avance III 400 WB, Bruker США (рабочая частота 100.64 МГц для ^{13}C). Исследуемый образец помещался в ротор диаметром 4 мм, изготовленный из оксида циркония, и вращался с частотой 12.5 кГц под магическим углом к направлению постоянного магнитного поля, что позволило усреднить анизотропную часть тензора экранирования, тем самым обеспечивая высокое разрешение ЯМР-спектров даже аморфных образцов.

ИК-спектры аддуктов фуллерена C_{60} в таблетках KBr были получены на спектрометре Shimadzu FTIR-8400S (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 400–4000 cm^{-1} .

Электронные спектры поглощения получали на спектрофотометре SPECORD M-32 (Германия) в диапазоне длин волн $\lambda = 200\text{--}900$ нм.

Термогравиметрический анализ аддуктов фуллерена C_{60} проводили на анализаторе NETZSCH TG 209 F1 Libra (Германия) в диапазоне температур $30\text{--}1100$ °С в атмосфере азота (марка «6.0») и со скоростью нагрева 5 °С·мин⁻¹.

Для ВЭЖХ использовался прибор Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с УФ-детектированием при 300 нм, оснащённый колонкой «Phenomenex® NH2» (150 мм × 2.0 мм, 5 мкм, 100 А), объём ввода $2 \cdot 10^{-8}$ м³, скорость ввода 0.2 мл·мин⁻¹, элюент — ацетонитрил / 0.1 % водный раствор уксусной кислоты ($5/95$).

2.4. Изучение физико-химических свойств аддуктов фуллерена C_{60}

Для проведения физико-химических исследований использовали деионизированную воду (электропроводность $5.5 \cdot 10^{-6}$ См·м⁻¹). Очистку воды проводили на УФ-аппарате Millipore Simplicity (Merck KGaA, США). Значения плотности и скорости звука были получены с помощью аппарата Anton Paar DSA 5000. Значения вязкости бинарных систем производное фуллерена–вода в интервале температур $T = 293.15\text{--}333.15$ К получены с использованием микровискозиметра Lovis 2000 M Anton Paar (Австрия). Значения изобарной теплоёмкости измеряли с помощью дифференциального сканирующего калориметра Q2000 (США). Измерение распределения наночастиц аддуктов фуллерена C_{60} по размерам в водных растворах проводили методом динамического светорассеяния, расчёт электрокинетического потенциала проводился на основании данных по электрофоретической подвижности (прибор Malvern Zetasizer, Великобритания). Подробное описание методик экспериментов, а также погрешностей измерения представлено в работах [104,203,204].

2.5. Биосовместимость аддуктов фуллерена C_{60}

2.5.1. Спонтанный гемолиз

После получения информированного согласия кровь для исследования брали у доноров ($n = 8$), в возрасте $20\text{--}30$ лет, не получавших в течение $7\text{--}10$ дней препаратов, влияющих на функцию эритроцитов. Исследование гемолиза эритроцитов проводили путём измерения оптической плотности супернатантов при длине волны $\lambda = 540$ нм на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ СПЕКТР, Россия) по методикам, описанным в работе [205]. Исследуемую смесь объёмом 1.5 мл готовили из 750 мкл водного раствора аддукта фуллерена C_{60} с различной концентрацией ($C = 2\text{--}200$ мкМ) и 750 мкл суспензии

эритроцитов в физиологическом растворе. После приготовления смеси, пробирки инкубировали при $T = 310 \pm 0.2$ К в течение 1 и 3 ч, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об/мин. В качестве положительного и отрицательного контроля использовали суспензии эритроцитов с добавлением эквивалентных объёмов дистиллированной воды и физиологического раствора, соответственно [206].

2.5.2. Агрегация тромбоцитов

После получения информированного согласия кровь для исследования брали у доноров ($n = 8$), в возрасте 20–30 лет, не получавших в течение 7–10 дней препаратов, влияющих на функцию тромбоцитов. Кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие в качестве стабилизатора цитрат натрия ($C = 0.129$ М) в соотношении цитрат натрия:кровь — 1:9. Стабилизированную кровь центрифугировали в течение 7 мин при комнатной температуре и 1000 об/мин (150g). Часть обогащённой тромбоцитами плазмы отбирали в пластиковую пробирку в количестве, необходимом для выполнения анализа. Из оставшейся крови получали бедную тромбоцитами плазму центрифугированием в течение 30 мин при 3600 об/мин (2500g). Бедная тромбоцитами плазма использовалась для калибровки агрегометра SolarAP 2110 (Беларусь). Плазму стандартизировали до получения концентрации тромбоцитов $200\text{--}250 \cdot 10^9/\text{л}$ с учётом добавления тестируемого вещества.

Агрегацию тромбоцитов в обогащённой тромбоцитами плазме исследовали с использованием индукторов агрегации АДФ (конечная концентрация $C = 10$ мкМ), (CHRONO-PAR[®] Reagents, CHRONO-LOG[®] Corporation, США). Влияние аддукта фуллерена C_{60} на индуцированную агрегацию тромбоцитов определяли, смешивая в кюветах 270 мкл плазмы и 30 мкл раствора исследуемого вещества при конечной концентрации 5, 10, 75 и 100 мкМ, соответственно. АДФ вносили в кюветы через 5 мин после инкубации смеси. Агрегацию регистрировали до выхода кривой на плато [206].

2.5.3. Плазмо-коагуляционный гемостаз

К «клоттинговым» тестам относятся методы измерения частичного активированного тромбопластинового времени (аРТТ), протромбинового времени (РТ), тромбинового времени (ТТ). Эти методы позволяют измерить промежуток времени с момента добавления реагента (активатора, запускающего процесс свёртывания) до формирования фибринового сгустка в исследуемой плазме. Влияние $C_{60}(\text{ОН})_{24}$ на плазмо-

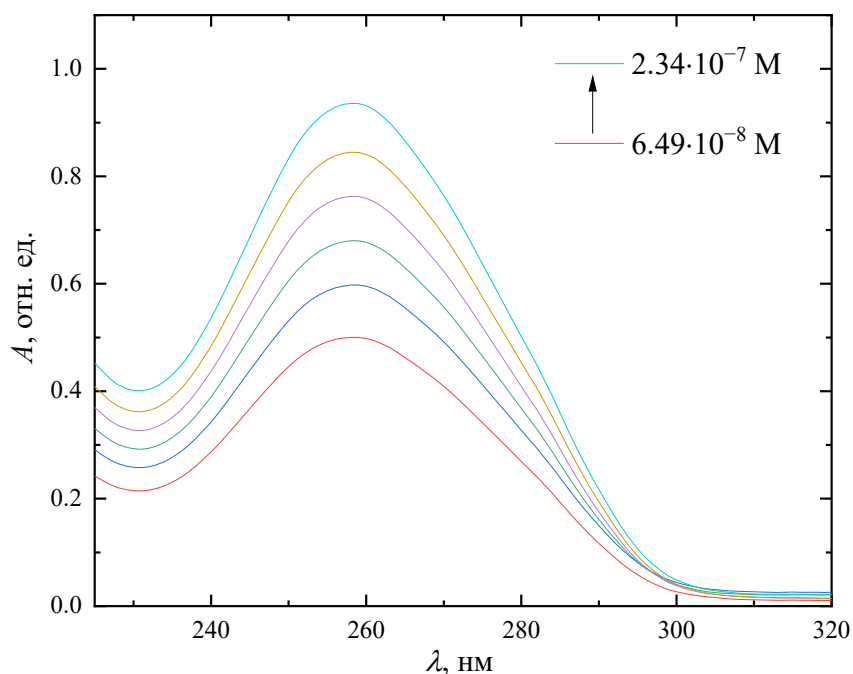
коагуляционный гемостаз оценивали при добавлении его в плазму в тестах аРТТ, РТ, ТТ согласно методике [207].

Образцы исследовали на коагулометре АПГ2-02-П (Россия). Для проведения исследования получали стоковые растворы $C_{60}(OH)_{24}$ ($C = 10\text{--}100$ мкмоль·дм³). Далее растворы инкубировали при 37 °С в течение 60 с и в соответствии с протоколом исследования определяли время свёртывания на анализаторе в тестах АРТТ, РТ, ТТ [207].

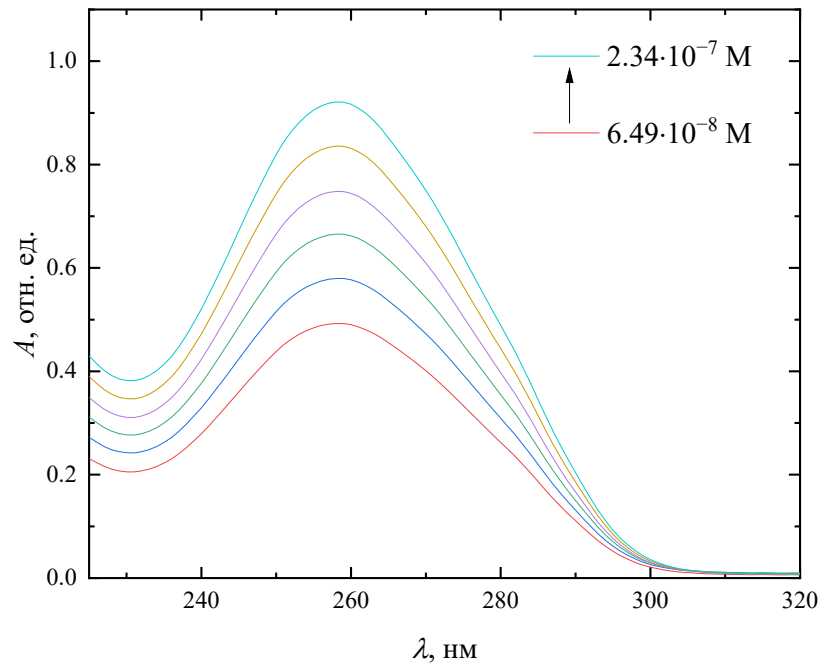
2.5.4. Взаимодействие с ДНК

УФ-спектры поглощения растворов аддуктов фуллерена C_{60} и ДНК в диапазоне 225–320 нм регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) относительно 0.9 % водного раствора NaCl в кварцевых кюветках ($l = 1$ см). Рабочие растворы получали смешиванием растворов ДНК и соответствующих аддуктов фуллерена C_{60} при комнатной температуре [207]. Спектры поглощения растворов ДНК в присутствии аддуктов фуллерена C_{60} приведены на **Ошибка! Источник ссылки не найден**. Рис. 2.4.

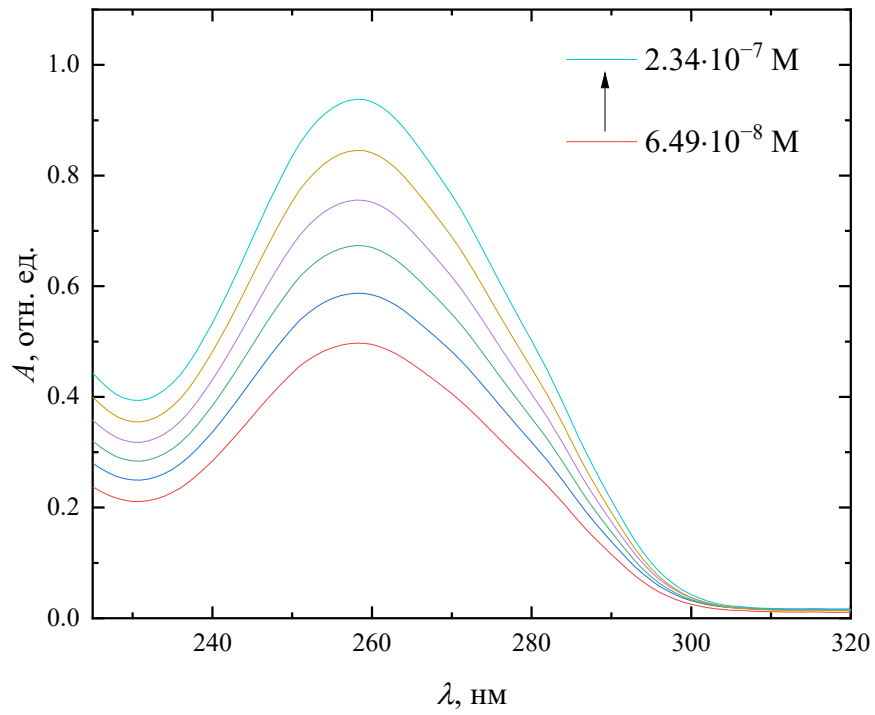
(а)



(б)



(б)



(в)

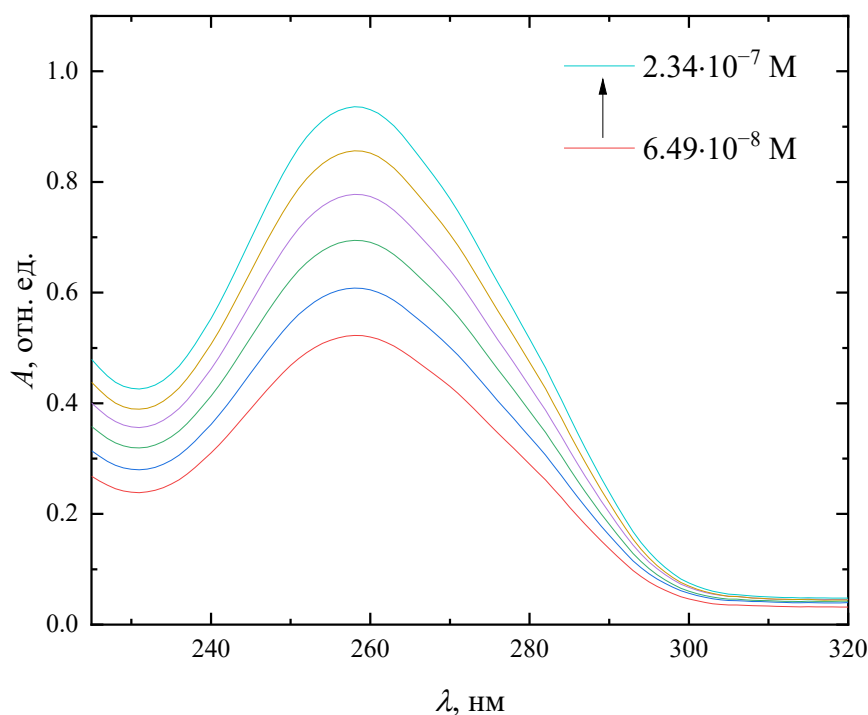


Рис. 2.4. Спектры поглощения ДНК с концентрацией $6.49 \cdot 10^{-8}$ – $2.34 \cdot 10^{-7}$ М в присутствии $6.43 \cdot 10^{-8}$ М аддуктов фуллерена C_{60} : C_{60} -Gly — (а); C_{60} -Нур — (б); C_{60} -Cys — (в); C_{60} -Met — (г).

2.5.5. Антирадикальная активность

Исследование антирадикальной активности аддуктов фуллерена C_{60} со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) проводили на спектрофотометре Thermo Scientific Evolution 300 (США). Для этого был приготовлен раствор ДФПГ в этаноле с концентрацией (130 мкМ), раствор аддукта фуллерена C_{60} в воде с концентрацией 200 мкМ. В кварцевую кювету добавляли раствор ДФПГ (1 мл) и раствор аддукта фуллерена C_{60} (1 мл). В кювету сравнения помещали смесь этанола с водой (1:1). Для получения кинетической кривой восстановления ДФПГ регистрировали оптическую плотность при длине волны 515 нм в температурном диапазоне $T = 298.15$ – 318.15 К в темноте через каждую минуту в течение 30 мин, а также через шесть дней после начала реакции. Точность термостатирования составляла $\Delta T = 0.1$ К [206].

2.5.6. Цитотоксичность

Изучение цитотоксичности аддуктов C_{60} проводили с помощью МТТ-теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) на клетках почки эмбриона

человека (НЕК 293). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при $+37\text{ }^\circ\text{C}$ в увлажнённой атмосфере, содержащей воздух и 5% CO_2 в питательной среде DMEM-F12, содержащей 10 % термически инактивированную фетальную бычью сыворотку, 1% L-глутамина, 50 Ед·мл⁻¹ пенициллина и 50 мкг·мл⁻¹ стрептомицина.

В результате взаимодействия МТТ с НАД(Ф)Н-зависимыми клеточными оксидоредуктазами образуется окрашенный продукт — формаза, с максимумом поглощения при длине волны 540 нм, содержание которого пропорционально количеству жизнеспособных клеток.

Для проведения эксперимента клетки высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи в CO_2 -инкубаторе: за это время происходило прикрепление клеток к поверхности лунок (в каждую лунку вносили 5000 клеток в 200 мкл среды DMEM-F12). Подсчёт числа клеток проводили на анализаторе жизнеспособности клеток BioRad TC10 (Bio-Rad Laboratories, США). После чего в лунки добавляли раствор, содержащий аддукт фуллерена C_{60} . Инкубация клеток в планшетах продолжалась 48 ч в CO_2 -инкубаторе при $+37\text{ }^\circ\text{C}$. По окончании инкубационного периода, культуральную среду DMEM-F12 удаляли путём инвертирования планшета. Далее в лунки вносили 100 мкл среды DMEM-F12 и 20 мкл МТТ-реагента и планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе при $+37\text{ }^\circ\text{C}$. После удаления надосадочной жидкости кристаллы формаза растворяли в течение 15 мин при перемешивании в 200 мкл/лунку ДМСО и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре BioRadxMarx (Bio-Rad Laboratories, США) при длине волны 540 нм и 690 нм. Для коррекции фона из значений оптической плотности при 540 нм вычитали значения оптической плотности при 690 нм для соответствующих лунок. Данные нормировали в процентах по отношению к контрольным клеткам [206].

2.5.7. Взаимодействие с ЧСА

Связывание аддуктов фуллерена C_{60} с ЧСА проводили на спектрофлуориметре SM 2203 (Солар, Беларусь). Спектры излучения регистрировали в диапазоне длин волн 310–450 нм и диапазоне температур 298.15–31.15 К; длина волны возбуждения — 290 нм. Концентрация ЧСА составляла 3 мкМ, концентрацию аддукта фуллерена C_{60} варьировали в диапазоне $C = 0.3\text{--}1.5$ мкМ с шагом 0.3 мкМ и в диапазоне $C = 6.0\text{--}24.0$ мкМ с шагом 3.0 мкМ. Измерения проводились в отсутствие и в присутствии маркеров сайтов

связывания (варфарин, ибупрофен, дигитонин с конечной концентрацией $C = 3$ мкМ) [206].

2.5.8. Эстеразная активность ЧСА

Для оценки влияния аддуктов фуллерена C_{60} на эстеразную активность ЧСА были приготовлены растворы: *n*-нитрофенилацетат в этаноле, ЧСА и аддукт фуллерена C_{60} в буфере Дульбекко с $pH = 7.02$. После смешения растворов итоговая концентрация *n*-нитрофенилацетата составила 100 мкМ, ЧСА 3 мкМ, концентрация аддукта фуллерена C_{60} варьировалась от 0 до 24 мкМ. Скорость гидролиза *n*-нитрофенилацетата оценивали по образованию продукта реакции – нитрофенола, концентрацию которого в течение первых 10 мин реакции определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм с использованием спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ СПЕКТР, Россия). В результате были получены кинетические зависимости реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата ЧСА в отсутствие и в присутствии аддукта фуллерена C_{60} [207].

2.5.9. Генотоксичность

Генотоксичность аддуктов фуллерена C_{60} оценивали с помощью метода ДНК-комет с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) и щелочного электрофореза в микрогелях. ДНК-кометы визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Микромед 3 ЛЮМ (Микромед, Санкт-Петербург, Россия). Длины хвостов ДНК-комет измеряли с помощью программы CASP (версия 1.2.2). Содержание ДНК в хвосте и длина хвоста определялись экспериментально; момент хвоста рассчитывали, как процент ДНК в хвосте, умноженный на длину между центром головы и хвостом [206].

2.5.10. Фотовыцветание

Для исследования фотодинамических свойств были сняты спектры поглощения следующих образцов: (i) Радахлорина; (ii) растворов, содержащих Радахлорин и аддукт фуллерена C_{60} в различных концентрациях; (iii) раствора Радахлорина, содержащего 500 мкМ азида натрия до и после облучения красным лазером Laserland LED-2000 (Besram Technology Inc., Китай, мощность лазера 55 мВт, 659 нм) согласно работам [208,209]. Влияние аддуктов фуллерена C_{60} на фотовыцветание Радахлорина оценивали путём расчёта константы скорости фотодеградации k_{deg} [206].

2.5.11. Взаимодействие с коллагеном

Изучение связывания C_{60} -Met с коллагеном проводили с использованием микропланшетного ридера Tecan Infinite M200 (Австрия). Регистрация спектров эмиссии осуществлялась в диапазоне длин волн $\lambda = 310\text{--}350$ нм при длине волны возбуждения 290 нм. Для проведения экспериментов были приготовлены растворы коллагена с концентрацией 3 мкМ и растворы коллагена с C_{60} -Met с концентрацией $C = 3\text{--}21$ мкМ (шаг 3 мкМ). Точность термостатирования составляла $\Delta T = 0.01$ К [210].

2.5.12. Протекторный эффект C_{60} -Met при УФ-повреждении коллагена

Растворы коллагена (0.9 мг/мл) в отсутствие и в присутствии C_{60} -Met ($C = 0.0015$, 0.003 и 0.06 мг/мл) облучали при комнатной температуре с использованием облучателя ЭНПО2-30-001 (Россия) при длине волны 254 нм, время облучения составляло от 0 до 45 мин с шагом 15 мин. Спектры эмиссии в диапазоне длин волн $\lambda = 310\text{--}450$ нм были сняты с использованием спектрофлуориметра Fluoromax 4P, длина волны возбуждения 290 нм [210].

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Идентификация производных фуллерена C₆₀

3.1.1. Идентификация производных фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами

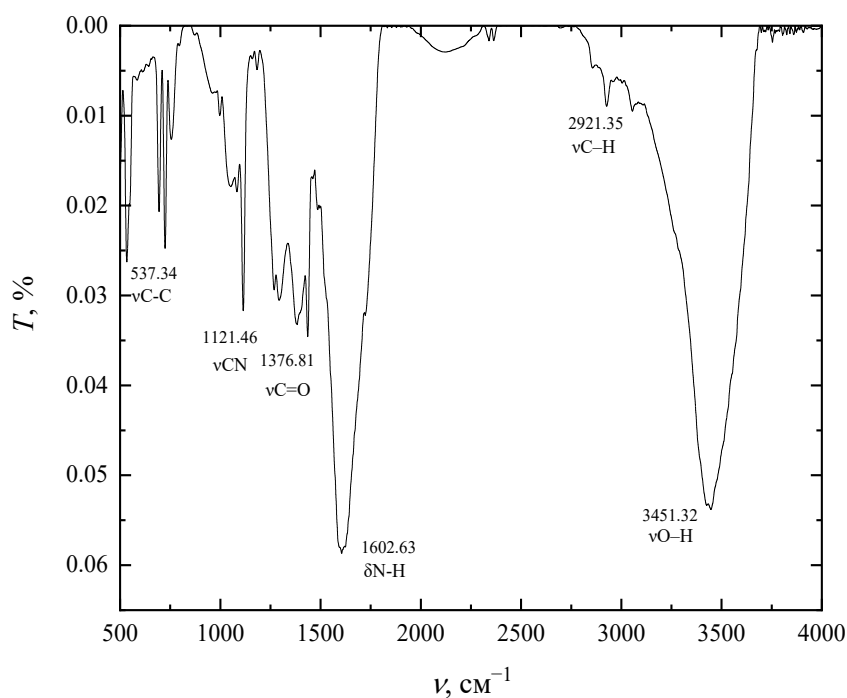
Результаты элементного анализа производных фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами приведены в Табл. 3.1. На основании результатов элементного анализа было установлено, что фуллерен C₆₀ образует с глицином тетра-аддукт, с L-гидроксипролином — бис-аддукт, с L-метионином и L-цистеином — трис-аддукты.

Табл. 3.1. Результаты элементного анализа производных фуллерена C₆₀ с L-аминокислотами.

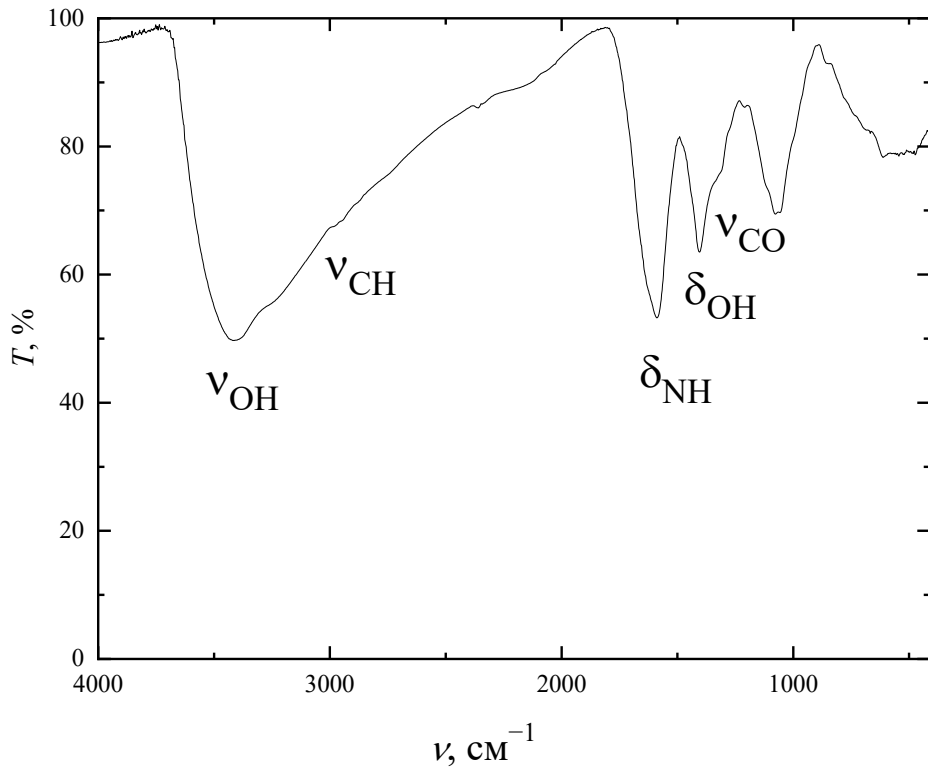
Аддукт	Брутто-формула	C, %	H, %	N, %
C ₆₀ -Gly	C ₆₈ H ₂₀ N ₄ O ₈ ·7H ₂ O	71.1 ± 0.2	3.2 ± 0.2	4.7 ± 0.2
C ₆₀ -Нур	C ₇₀ H ₁₈ N ₂ O ₆	85.2 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1
C ₆₀ -Cys	C ₆₉ H ₂₁ N ₃ O ₆ S ₃	76.5 ± 0.2	1.9 ± 0.1	3.9 ± 0.2
C ₆₀ -Met	C ₇₅ H ₃₃ N ₃ O ₆ S ₃	77.1 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.6 ± 0.2

ИК-спектры производных фуллерена C₆₀ с глицином, L-гидроксипролином, L-метионином и L-цистеином представлены на Рис. 3.1. На спектрах наблюдаются характеристические полосы связей как аминокислотных остатков, так и фуллерена C₆₀.

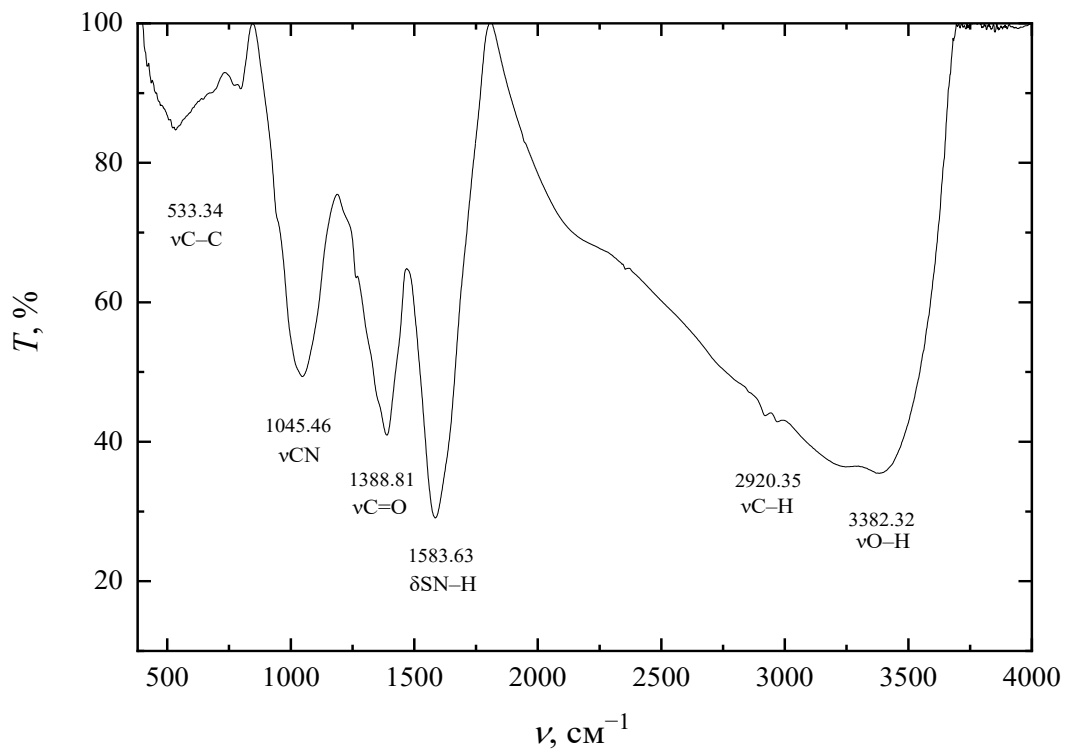
(a)



(d)



(e)



(z)

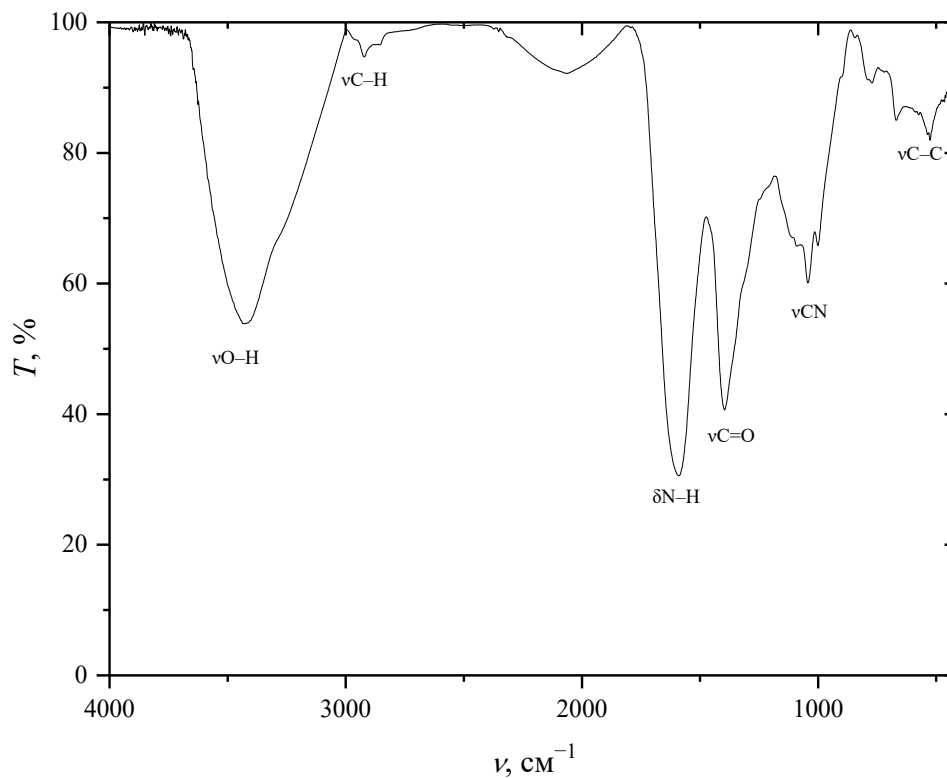
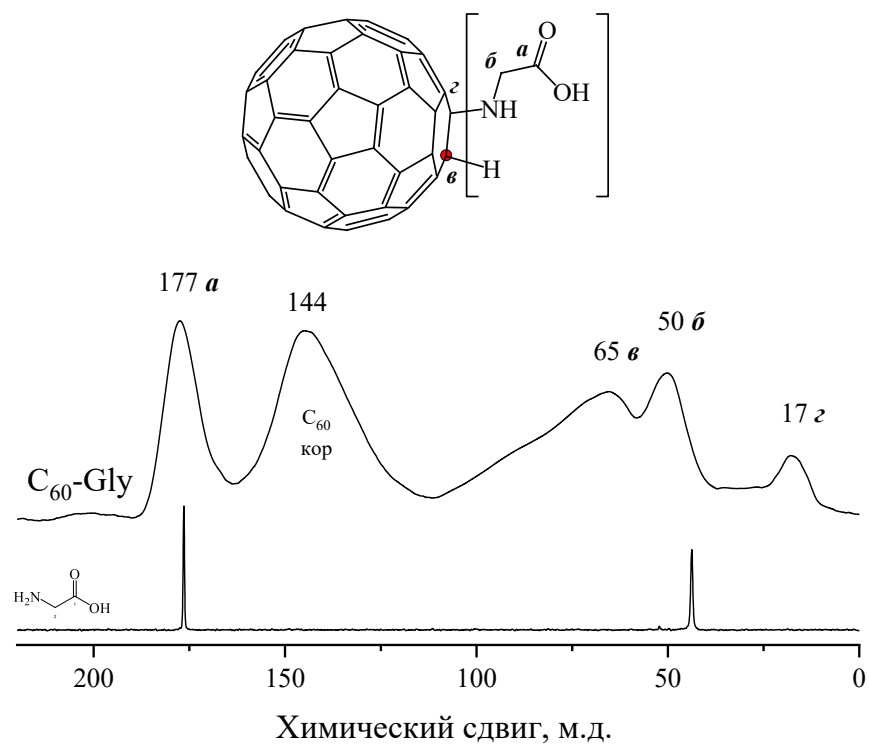


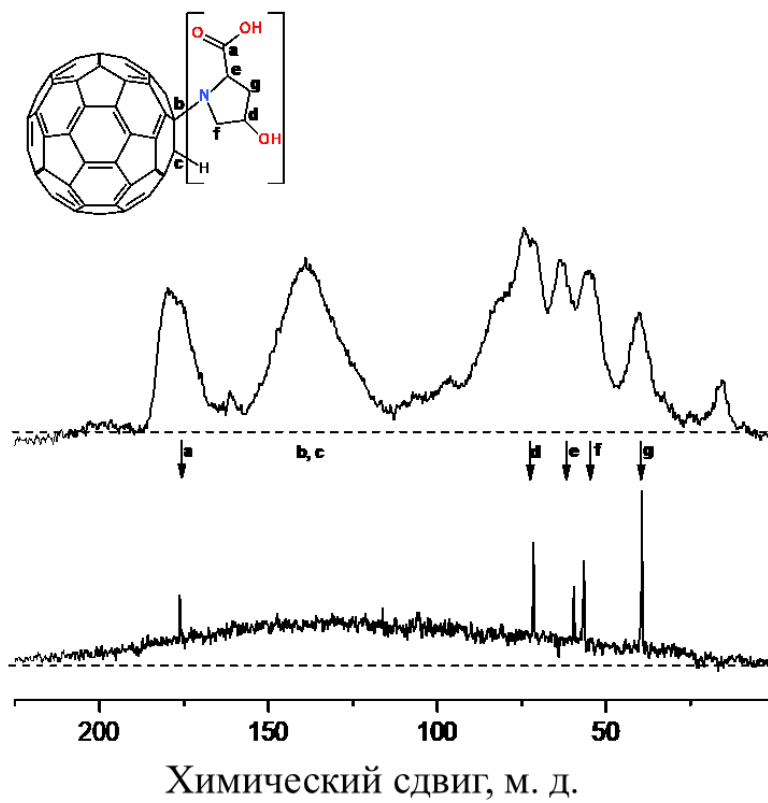
Рис. 3.1. ИК-спектры производных фуллерена C_{60} глицином (а), L-гидроксипролином (б), L-метионином (в) и L-цистеином (z).

На Рис. 3.2 в качестве примера приведены ^{13}C ЯМР спектры производных фуллерена C_{60} с глицином, L-гидроксипролином и L-метионином.

(a)



(б)



(в)

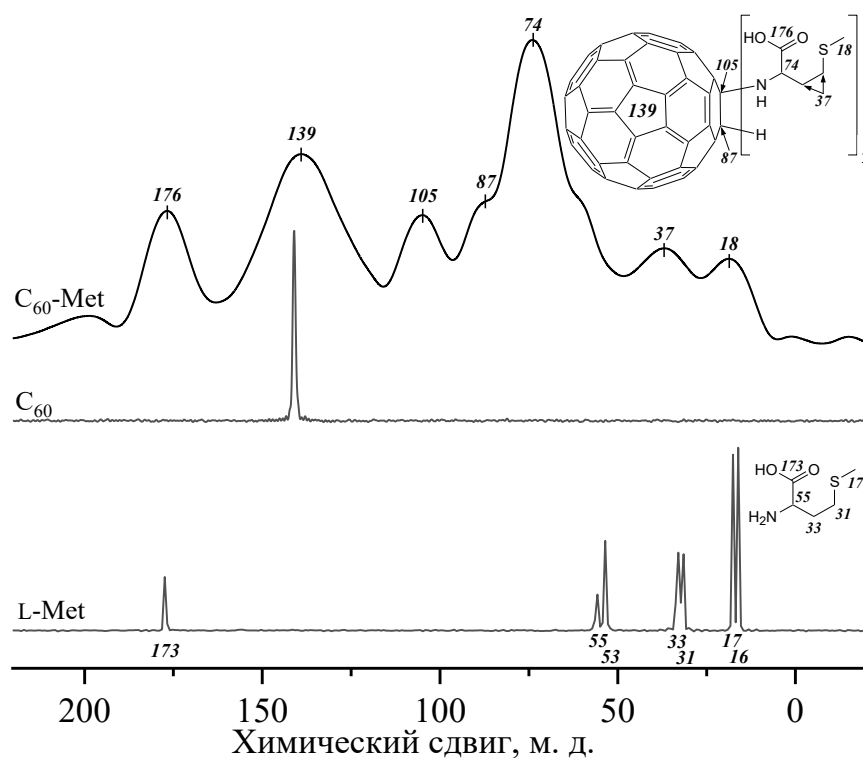
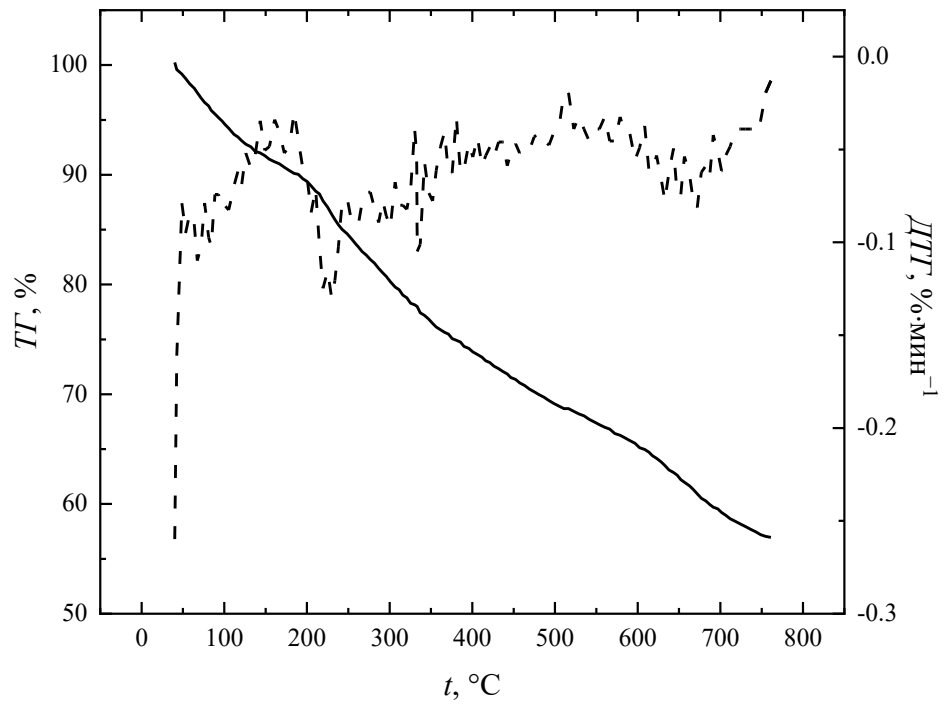


Рис. 3.2. ^{13}C ЯМР-спектры производных фуллерена C_{60} с глицином (а), L-гидроксипролином (б), L-метионином (в).

Представленные спектры подтверждают образование ковалентной связи между аминокислотными остатками и фуллереном C_{60} . Расшифровка полос спектров ^{13}C ЯМР представлена на Рис. 3.2 для соответствующего производного фуллерена C_{60} с L-аминокислотами.

Также для идентификации аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами был использован метод термogrавиметрического анализа (ТГ). В качестве примера на Рис. 3.3 представлены термограммы аддуктов C_{60} с глицином и L-гидроксипролином.

(а)



(б)

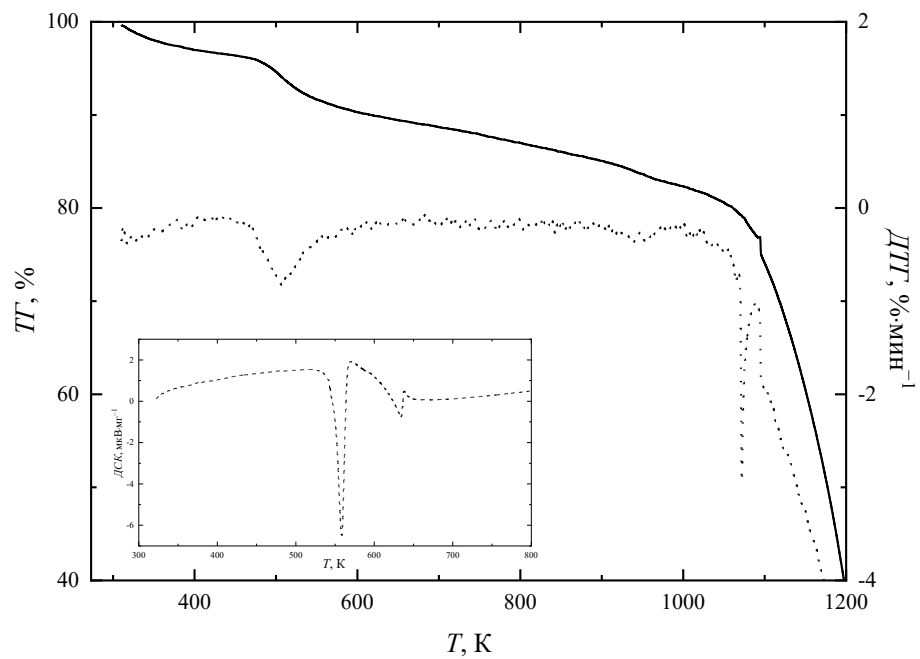


Рис. 3.3. Термический анализ кристаллогидратов аддуктов C_{60} с глицином (а) и L-гидроксипролином (б).

На основании полученных данных установлено, что ТГ (Табл. 3.2) может быть использован для установления состава аддуктов. Расшифровка полученных термограмм для C₆₀-Gly и C₆₀-Нур представлена в Табл. 3.2. Видно, что деградация аддуктов C₆₀ включает процессы термоокислительной деструкции, обусловленной дегидратацией, декарбоксилированием и деазотированием аминокислотных остатков, а также фуллеренового кора.

Табл. 3.2. Данные термогравиметрического анализа производных C₆₀-Gly, C₆₀-Нур.

T_M°, K ($T_b - T_e$), K	$\frac{\Delta m_i^{\text{расч.}}}{m_0}, \%$	$\frac{\Delta m_i^{\text{эксп.}}}{m_0}, \%$	Химический процесс
C ₆₀ -Gly			
395.15 (305.15–486.15)	10.9	10.2	C ₆₀ [NH-CH ₂ -COOH] ₄ ·7H ₂ O → C ₆₀ [NH-CH ₂ -COOH] ₄ + 7H ₂ O
575.15 (486.15–664.15)	14.7	17.3	C ₆₀ [NH-CH ₂ -COOH] ₄ → C ₆₀ [NH ₂ -CH ₃] ₄ + 4CO ₂
849.15 (664.15–1034.15)	39.7	39.7	C ₆₀ [NH ₂ -CH ₃] ₄ + 8O ₂ → C ₆₀ + 4CO ₂ + 8H ₂ O + 0.5N ₂
C ₆₀ -Нур			
428.15 (303.15–473.15)	3.5	3.7	C ₆₀ (C ₅ H ₉ NO ₂) ₂ ·2H ₂ O → C ₆₀ (C ₅ H ₉ NO ₂) ₂ + 2H ₂ O
623.15 (493.15–733.15)	8.4	8.8	C ₆₀ (C ₅ H ₉ NO ₂) ₂ → C ₆₀ (NC ₄ H ₉) ₂ + 2CO ₂
893.15 (773.15–1103.15)	14.2	14.4	C ₆₀ (NC ₄ H ₉) ₂ + 12.5O ₂ → C ₆₀ + N ₂ + 8CO ₂ + 9H ₂ O

Электронные спектры аддуктов C₆₀ с L-аминокислотами: глицином, L-гидроксипролином, L-метионином и L-цистеином являются малоинформативными, однако могут быть использованы для аналитического определения последних. В качестве примера на Рис. 3.4 представлены электронные спектры растворов C₆₀-Gly в воде и немодифицированного C₆₀ в *o*-ксилоле.

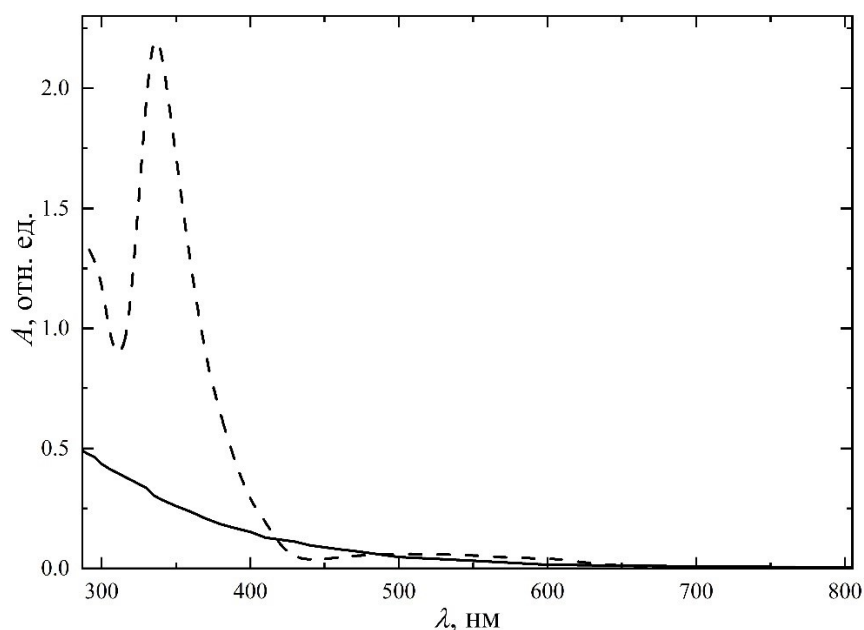


Рис. 3.4. Электронные спектры раствора C_{60} -Gly в воде ($C = 0.08 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$, сплошная линия) и немодифицированного фуллерена C_{60} в *o*-ксилоле ($C = 0.029 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$, пунктирная линия). Максимум при $\lambda = 335 \text{ нм}$, A — коэффициент поглощения.

Из полученных спектров можно сделать следующие выводы: (i) электронный спектр водного раствора C_{60} -Gly не содержит полос поглощения; (ii) на спектре водного раствора C_{60} -Gly отсутствует пик поглощения, характерный для фуллерена C_{60} ($\lambda = 335 \text{ нм}$); (iii) сравнение спектров растворов C_{60} -Gly и C_{60} подтверждает функционализацию фуллерена и отсутствие непрореагировавшего фуллерена C_{60} .

Установление степени чистоты синтезированных аддуктов C_{60} с L-аминокислотами проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Чистота синтезированных аддуктов C_{60} с L-аминокислотами составляла не менее 99.5 %. На Рис. 3.5 приведён пример хроматограммы аддукта C_{60} с L-гидроксипролином.

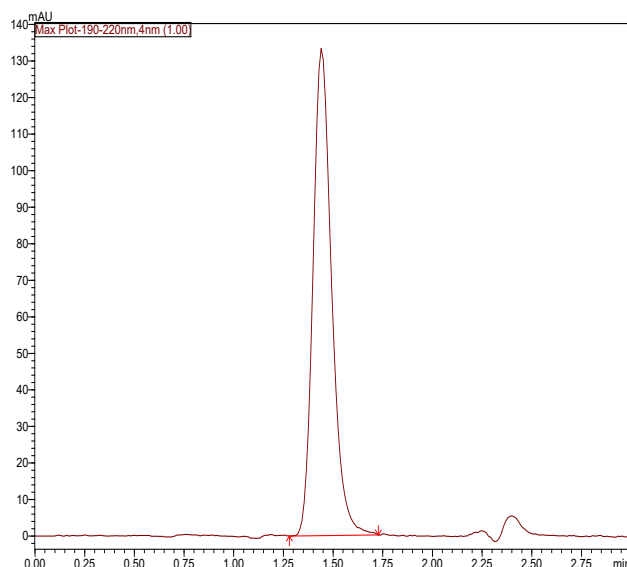


Рис. 3.5. Жидкостная хроматограмма аддукта C_{60} с L-гидроксипролином. Колонка: «Phenomenex[®] NH2» (150 × 2.0 мм, 5 мкм, 100 А), элюент: ацетонитрил / водный раствор уксусной кислоты (0.1 %) (5:95), 0.2 мл/мин, объём дозируемой пробы: 20 мкл, детектирование: диодная матрица.

3.1.2. Идентификация полигидроксилированного фуллерена $C_{60}(OH)_{24}$

Результаты элементного анализа $C_{60}(OH)_{24}$: теоретическое содержание 63.8 % (С), 2.1 % (Н); экспериментальные значения 63.9 ± 0.3 % (С), 2.2 ± 0.3 % (Н).

На Рис. 3.6 представлен ИК-спектр $C_{60}(OH)_{24}$, на котором видны следующие полосы поглощения: 3418 см^{-1} ($\nu O-H$), 1597 см^{-1} ($\nu C=C$), 1370 см^{-1} ($\delta C-O-H$) и 1060 см^{-1} ($\nu C-O$).

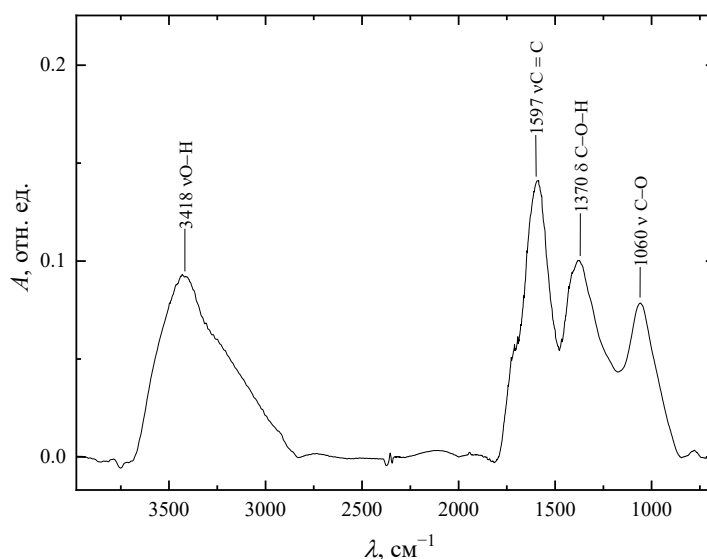


Рис. 3.6. ИК-спектр $C_{60}(OH)_{24}$.

На Рис. 3.7 приведён ^{13}C ЯМР-спектр $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$, полученный методом CP/MAS при времени контакта 2000 мкс.

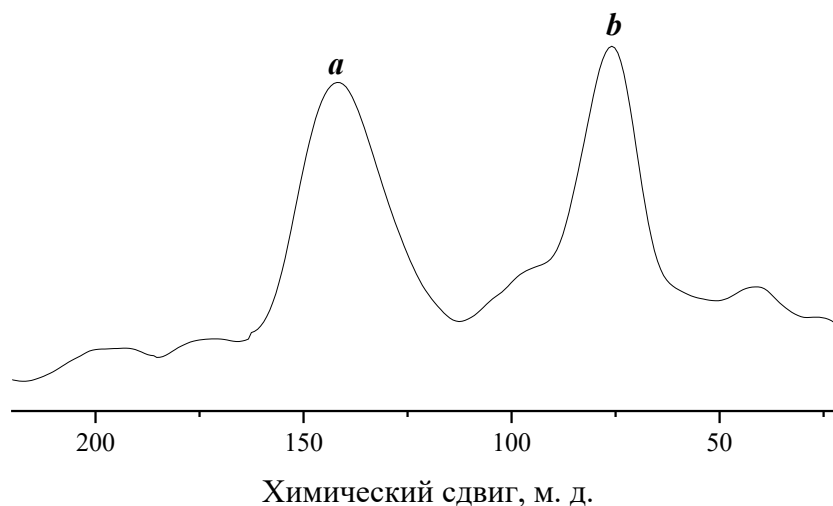


Рис. 3.7. ^{13}C ЯМР-спектр $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$, полученный методом CP/MAS при времени контакта 2000 мкс. *a* — структурно «свободные» атомы углерода фуллеренового остова (142 м. д.), *б* — гидроксильные атомы углерода (76 м. д.).

На Рис. 3.8 представлены результаты комплексного термического анализа $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$. Из полученных результатов видно, что: (i) фуллеренол $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ термически стабилен до $T = 340$ К; (ii) распад фуллеренола происходит в интервале 340–1100 К и включает процессы дегидроксилирования, образования гемикетала, пинаколиновую перегруппировку гидроксильных групп и их деградацию. Разрушение фуллеренового ядра начинается при $T = 1100$ К.

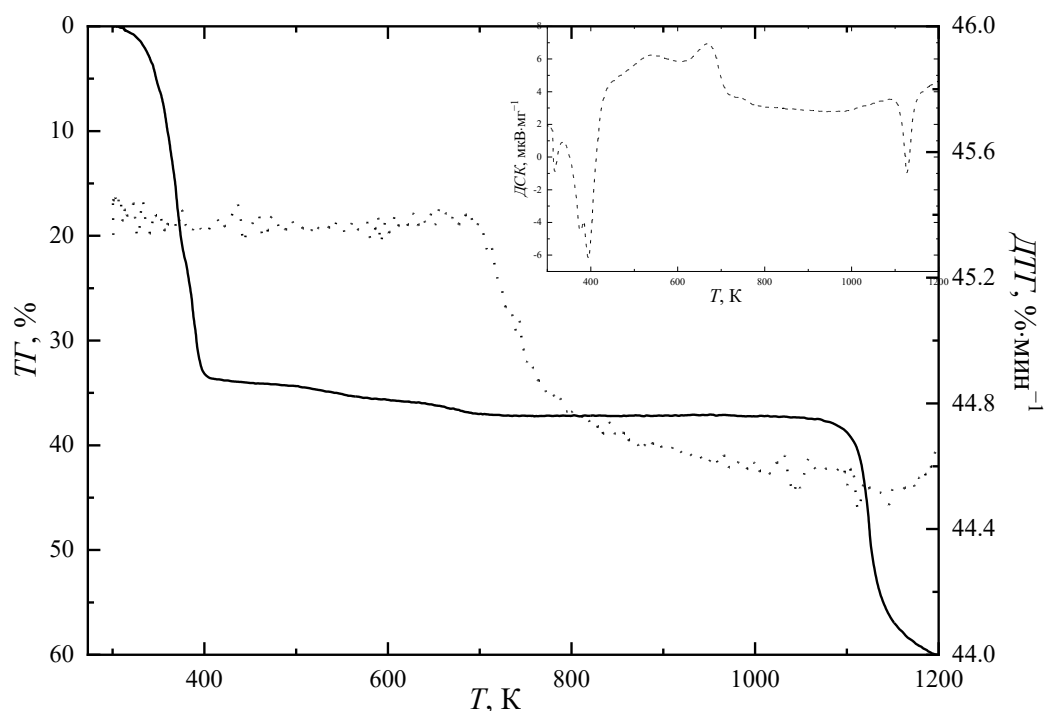


Рис. 3.8. Результаты комплексного термического анализа образца $C_{60}(OH)_{24}$ в области температур $T = 300\text{--}1200$ К. Сплошная линия соответствует кривой ТГ, пунктирная — кривой ДТГ. Вставленный график — ДСК.

На Рис. 3.9 приведён электронный спектр водного раствора фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$. Как и в случае электронных спектров аддуктов C_{60} с L-аминокислотами, электронный спектр водного раствора фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ является малоинформативным, однако свидетельствует о конверсии фуллерена в фуллеренол, а также об отсутствии и непрореагировавшего фуллерена.

Анализ хроматограммы фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ позволил заключить, что чистота синтезированного образца составляет 99.7 % (Рис. 3.10).

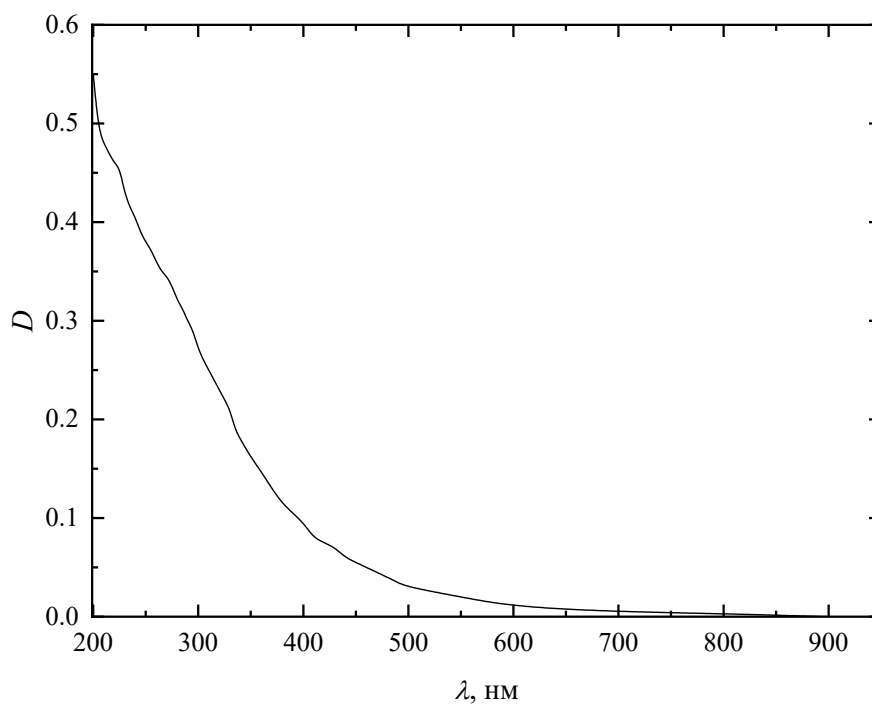


Рис. 3.9. Электронный спектр раствора фуллеренола $C_{60}(OH)_{22-24}$. D — оптическая плотность, λ — длина волны.

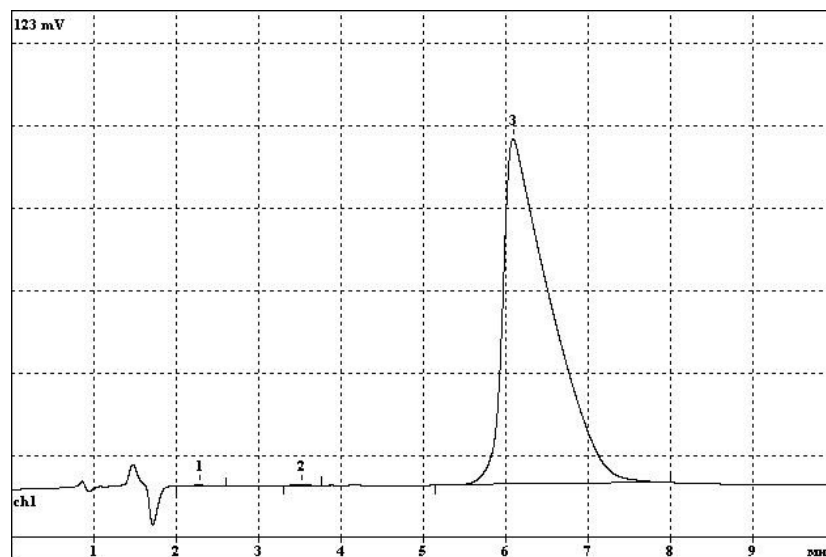


Рис. 3.10. Жидкостная хроматограмма фуллеренола $C_{60}(OH)_{22-24}$. Колонка: «Phenomenex[®] NH2» (150 × 2.0 мм, 5 мкм, 100 Å), элюент: ацетонитрил / водный раствор уксусной кислоты (0.1 %) (5:95), 0.2 мл/мин, объём дозируемой пробы: 20 мкл, детектирование: диодная матрица.

3.1.3. Идентификация карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$

Результаты элементного анализа производного $C_{60}[C(COOH)_2]_3$: теоретическое содержание 80.7 % (C), 0.6 % (H); экспериментальные значения 80.7 ± 0.3 % (C), 0.5 ± 0.1 % (H).

Основные пики на ИК-спектре (cm^{-1}): 3470, 1811, 1723, 1715, 1431, 1405, 1410, 1222, 1231, 1057, 820, 833, 730, 580, 528, 522. Длинноволновая часть спектра 522–1700 cm^{-1} соответствует колебаниям связей C–C фуллеренового ко́ра. В коротковолновой части спектра 1700–1725 cm^{-1} соответствует колебаниям связей C=O групп малоновой кислоты в $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, 3450–3550 cm^{-1} соответствует колебаниям групп O–H.

Анализ полученного спектра ^{13}C ЯМР показывает следующее: (i) пик в области 173.5 м. д. относится к атомам углерода карбоксильных группах (Рис. 3.11а), (ii) пик при 140.5 м. д. соответствует структурно «чистым» атомам углерода в молекуле фуллерена (Рис. 3.11б), (iii) интенсивный пик с химическим сдвигом 47.0 м. д. относится к атомам углерода фуллерена, входящих в циклопропановое кольцо (Рис. 3.11в), (iv) химический сдвиг 24.9 м. д. относится к атомам углерода циклопропанового кольца, связанного с карбоксильными группами.

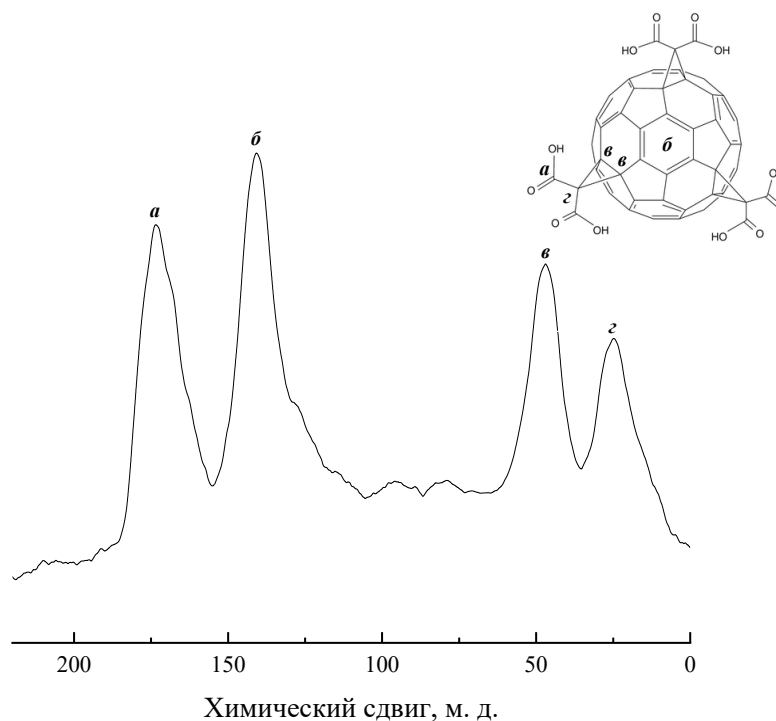


Рис. 3.11. ^{13}C ЯМР-спектр карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, полученный методом CP/MAS при времени контакта 2000 мкс.

На Рис. 3.12 приведён электронный спектр водного раствора карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. Как и в случае электронных спектров аддуктов C_{60} с L-аминокислотами и фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$, электронный спектр свидетельствует об успешном прохождении реакции, а также об отсутствии непрореагировавшего фуллерена. На Рис. 3.13 проиллюстрирована выполнимость закона Бугера — Ламберта — Бера при $\lambda = 330$ нм для растворов карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$.

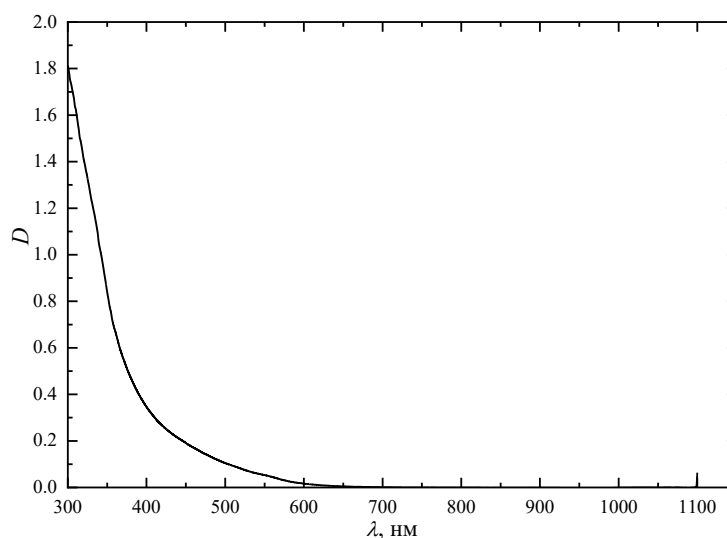


Рис. 3.12. Электронный спектр $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ в H_2O . D — оптическая плотность, λ — длина волны (нм).

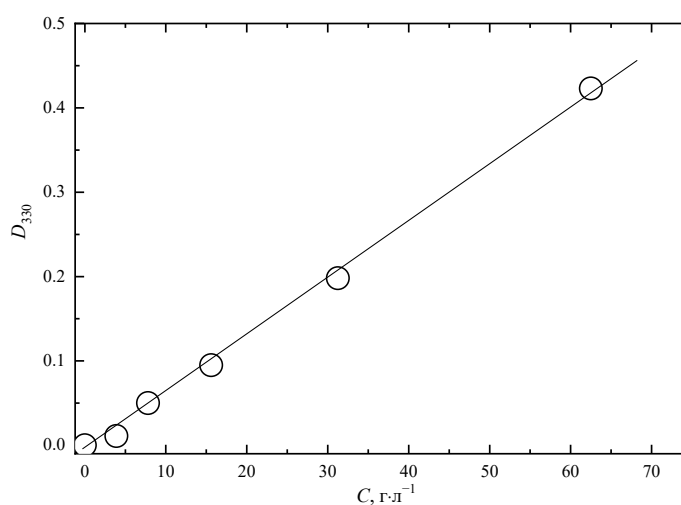


Рис. 3.13. Выполнимость закона Бугера — Ламберта — Бера при $\lambda = 330$ нм. D — оптическая плотность, l — оптический путь (1 см), C — объёмная концентрация.

В Табл. 3.3 и на Рис. 3.14 представлены результаты комплексного термического анализа карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. Можно выделить следующие особенности: (i) образец $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ стабилен до 60 °С, дальнейшее повышение температуры приводит к потере трех молекул кристаллизационной воды; (ii) в области $t = 140\text{--}295$ °С протекает процесс декарбоксилирования; (iii) в интервале $t = 320\text{--}520$ °С протекают одновременные процессы декарбоксилирования и дегидрирования. Общая экспериментальная потеря массы составляет 25.6 %, что соответствует отщеплению шести молекул воды и трех карбонильных групп.

Табл. 3.3. Термический анализ кристаллогидрата $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. (T^m – температура максимального термического эффекта; T_b и T_e — температуры начала и окончания термического эффекта; $\Delta m_i / m_0$ — потеря массы; m_0 — начальная масса).

T_M°, K ($T_b - T_e$), K	$\frac{\Delta m_i^{\text{расч.}}}{m_0}, \%$	$\frac{\Delta m_i^{\text{эксп.}}}{m_0}, \%$	Химический процесс	Продукт распада
—	0.0	0.0	—	$C_{60}[C(COOH)_2]_3 \cdot 3H_2O$
97 (60–130)	5.2	5.0	$-3H_2O$	$C_{60}[C(COOH)_2]_3$
150 (140–180)	2.6	2.5	$-C=O$	$C_{60}[C(COOH)_2]_2COH(COOH)$
208 (195–240)	2.6	2.8	$-C=O$	$C_{60}[C(COOH)_2][COH(COOH)]_2$
271 (255–295)	2.6	2.7	$-C=O$	$C_{60}[COH(COOH)]_3$
337 (320–385)	4.3	4.1	$-C=O$ $-H_2O$	$C_{60}CO[COH(COOH)]_2$
420 (400–440)	4.3	4.3	$-C=O$ $-H_2O$	$C_{60}(CO)_2COH(COOH)$
488 (480–520)	4.3	4.2	$-C=O$ $-H_2O$	$C_{60}(CO)_3$

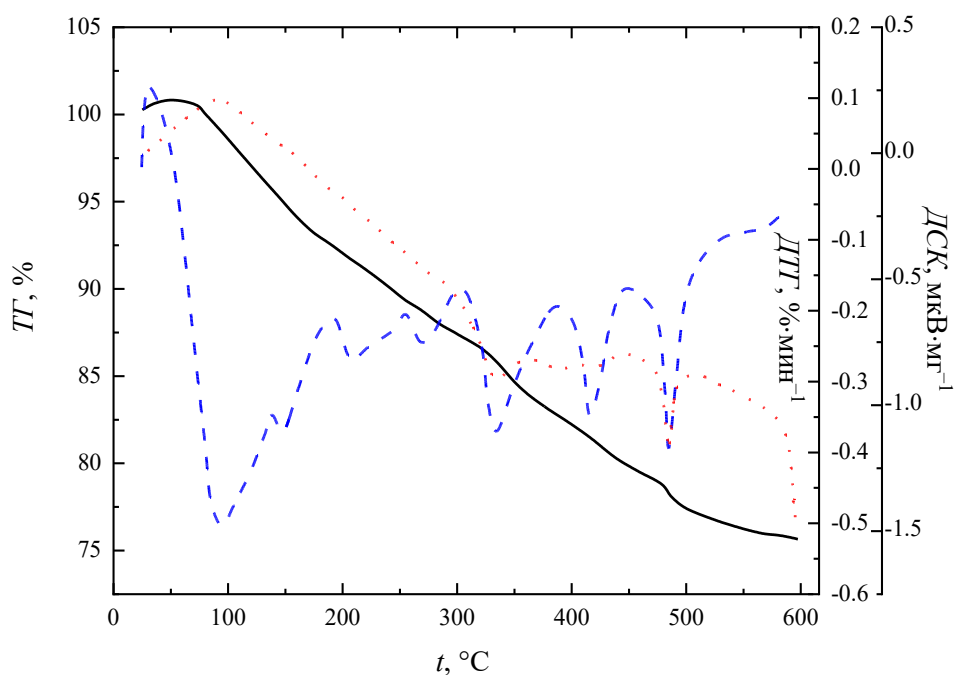


Рис. 3.14. Комплексный термический анализ аддукта $C_{60}[C(COOH)_2]_3$: кривая ТГ (сплошная линия), кривая ДТГ (штрихованная линия), кривая ДСК (пунктирная линия).

Анализ хроматограммы карбоксилированного фуллера $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ позволил заключить, что чистота синтезированного образца составляет 99.5 % (Рис. 3.15).

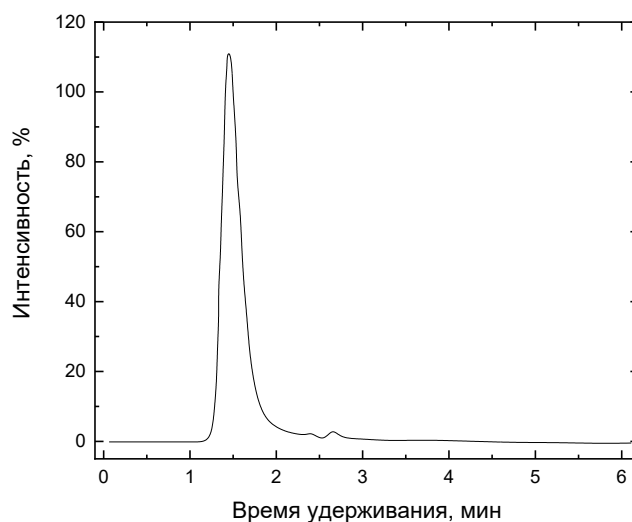


Рис. 3.15. Жидкостная хроматограмма образца $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. Колонка: «Phenomenex® NH2» (150 × 2.0 мм, 5 мкм, 100 А), элюент: ацетонитрил / водный раствор уксусной кислоты (0.1 %) (5:95), 0.2 мл/мин, объём дозируемой пробы: 20 мкл, детектирование: диодная матрица.

3.2. Физико-химические свойства производных

Изучение физико-химических свойств водных растворов аддуктов лёгких фуллеренов является важным для их дальнейшего биомедицинского применения. В частности, важно иметь информацию о совместимости аддуктов с водой и водными растворами, их состояния в водных растворах, так в зависимости от размера агрегатов может меняться механизм их биологического действия. В свою очередь, данные по плотности и вязкости необходимы для оценки влияния аддуктов фуллеренов на гемосовместимость. К настоящему времени в нашей научной группе опубликовано большое число работ, посвящённых изучению физико-химических свойств растворов, фазовых равновесий, а также термодинамических свойств фуллеренов в широком интервале температур [62,79,93,94,99,105,106,203,211]. В качестве примера остановимся на экспериментальных результатах, полученных для аддукта фуллерена C₆₀ с глицином.

3.2.1. Плотность водных растворов C₆₀-Gly

Результаты экспериментального изучения плотности водных растворов C₆₀-Gly в интервале температур $T = 278.15\text{--}323.15$ К и диапазоне концентраций $C = 0.15\text{--}15$ г·дм⁻³ представлены на Рис. 3.16 и Табл. 3.4. Как видно из Рис. 3.16, наблюдается увеличение плотности с увеличением концентрации водных растворов. Полученные данные по концентрационным и температурным зависимостям плотности (Рис. 3.16) были использованы для расчёта средних молярных объёмов (\bar{V}) растворов по Ур. 2 (Рис. 3.17):

$$\bar{V} = \frac{V}{n_{\text{H}_2\text{O}} + n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} \quad (2),$$

где V — объём водного раствора C₆₀-Gly; $n_{\text{H}_2\text{O}}$ и $n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}$ — количество вещества воды и C₆₀-Gly в 1 дм³ раствора.

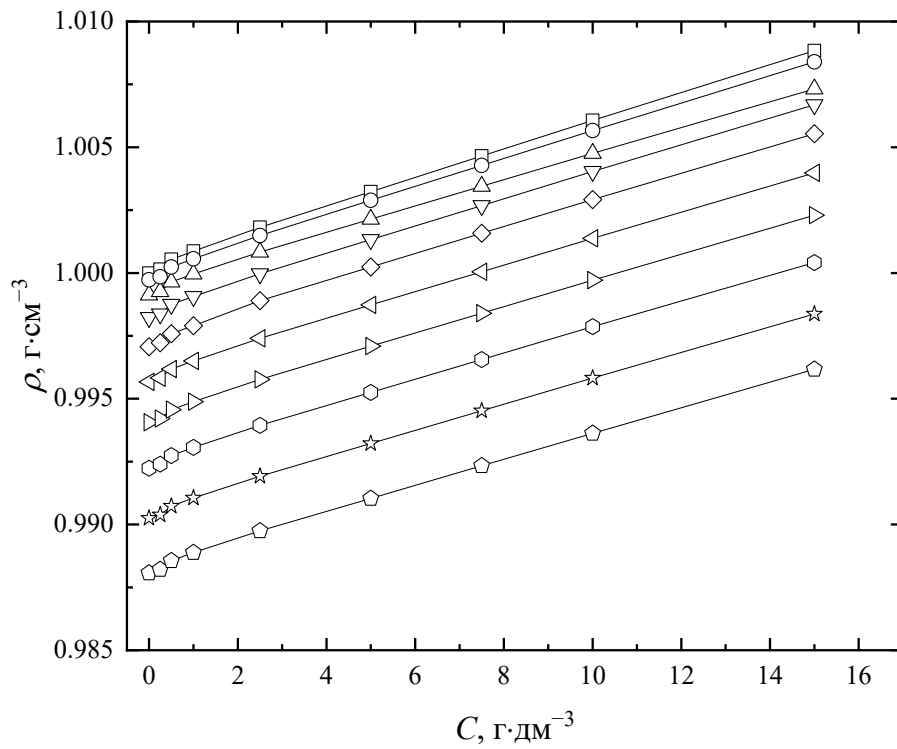


Рис. 3.16. Концентрационные зависимости плотности (ρ) водных растворов C_{60} -Gly при (\square) 278.15 К, (\circ) 283.15 К, (\triangle) 288.15 К, (∇) 293.15 К, (\diamond) 298.15 К, (\triangleleft) 303.15 К, (\triangleright) 308.15 К, (\oplus) 313.15 К, (\star) 318.15 К и (\odot) 323.15 К. C – объёмная концентрация C_{60} - Gly в водном растворе.

Табл. 3.4. Температурная (T) и концентрационная (C) зависимости плотности (ρ) водных растворов C_{60} -Gly.

$C, \text{г}\cdot\text{дм}^{-3}$	$\rho, \text{г}\cdot\text{см}^{-3}$									
	278.15 К	283.15 К	288.15 К	293.15 К	298.15 К	303.15 К	308.15 К	313.15 К	318.15 К	323.15 К
0	0.99999	0.99973	0.99913	0.99823	0.99707	0.99567	0.99406	0.99224	0.99025	0.98807
0.25	1.00015	0.99985	0.99926	0.99838	0.99723	0.99583	0.99421	0.99240	0.99039	0.98821
0.5	1.00036	1.00006	0.99947	0.99857	0.99741	0.99600	0.99438	0.99256	0.99055	0.98838
1	1.00069	1.00039	0.99979	0.99889	0.99773	0.99633	0.99471	0.99289	0.99088	0.98871
2.5	1.00165	1.00132	1.00066	0.99980	0.99873	0.99723	0.99560	0.99377	0.99175	0.98958
5	1.00307	1.00273	1.00198	1.00117	1.00008	0.99857	0.99693	0.99509	0.99306	0.99088
7.5	1.00450	1.00413	1.00330	1.00253	1.00143	0.99990	0.99825	0.99641	0.99437	0.99219
10	1.00593	1.00553	1.00462	1.00390	1.00278	1.00124	0.99958	0.99773	0.99569	0.99349
15	1.00878	1.00834	1.00726	1.00663	1.00548	1.00392	1.00224	1.00036	0.99831	0.99611

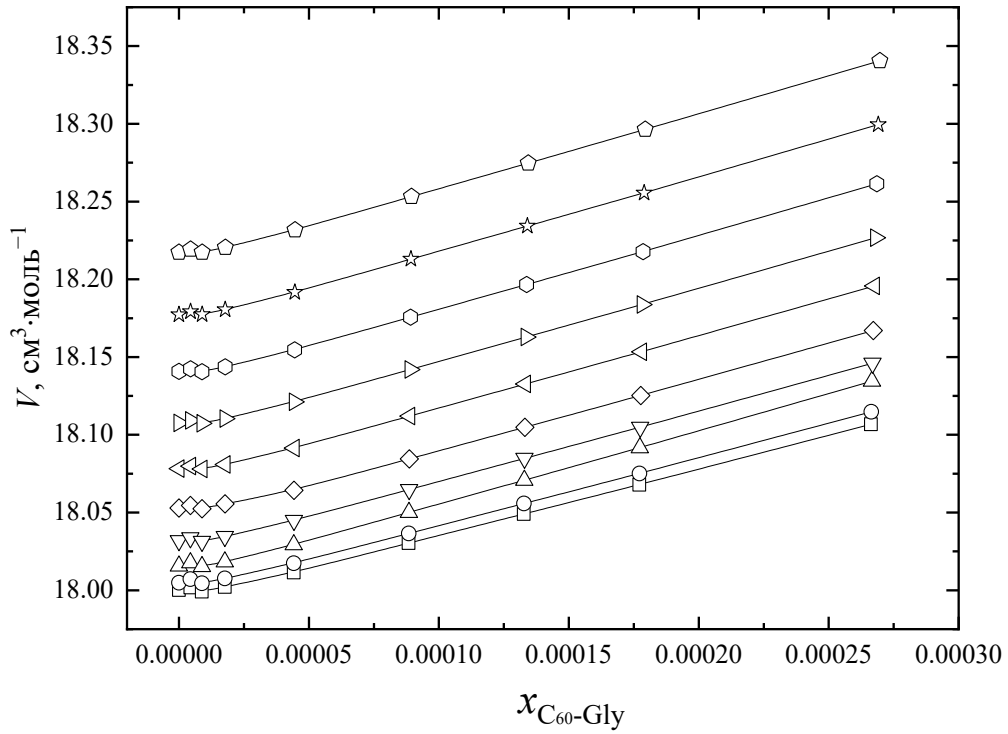


Рис. 3.17. Концентрационные зависимости среднего молярного объема (\bar{V}) водных растворов C₆₀-Gly при (□) 278.15 К, (○) 283.15 К, (△) 288.15 К, (▽) 293.15 К, (◇) 298.15 К, (◁) 303.15 К, (▷) 308.15 К, (○) 313.15 К, (☆) 318.15 К и (⬠) 323.15 К. x мольная доля C₆₀-Gly.

Парциальные молярные объемы компонентов раствора ($V_{\text{H}_2\text{O}}$ и $V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}$) рассчитывали, используя Ур. 3 и 4:

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P,n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} \quad V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} \right)_{T,P,n_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (3),$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \bar{V} - x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} \right)_{T,P} \quad V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} = \bar{V} - x_{\text{H}_2\text{O}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P} \quad (4).$$

На Рис. 3.18 и 3.19 Рис приведены концентрационные зависимости парциальных молярных объемов C₆₀-Gly и H₂O ($V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}$ и $V_{\text{H}_2\text{O}}$) в интервале температур $T = 278.15\text{--}323.15$ К. При всех изученных температурах концентрационные зависимости парциальных молярных объемов C₆₀-Gly имеют сложное поведение: в области низких концентраций C₆₀-Gly парциальные молярные объемы отрицательны и принимают экстремально

высокие (по модулю) значения. Это означает, что добавление даже небольшого количества производного C₆₀-Gly приводит к значительному уплотнению и структурированию водных растворов.

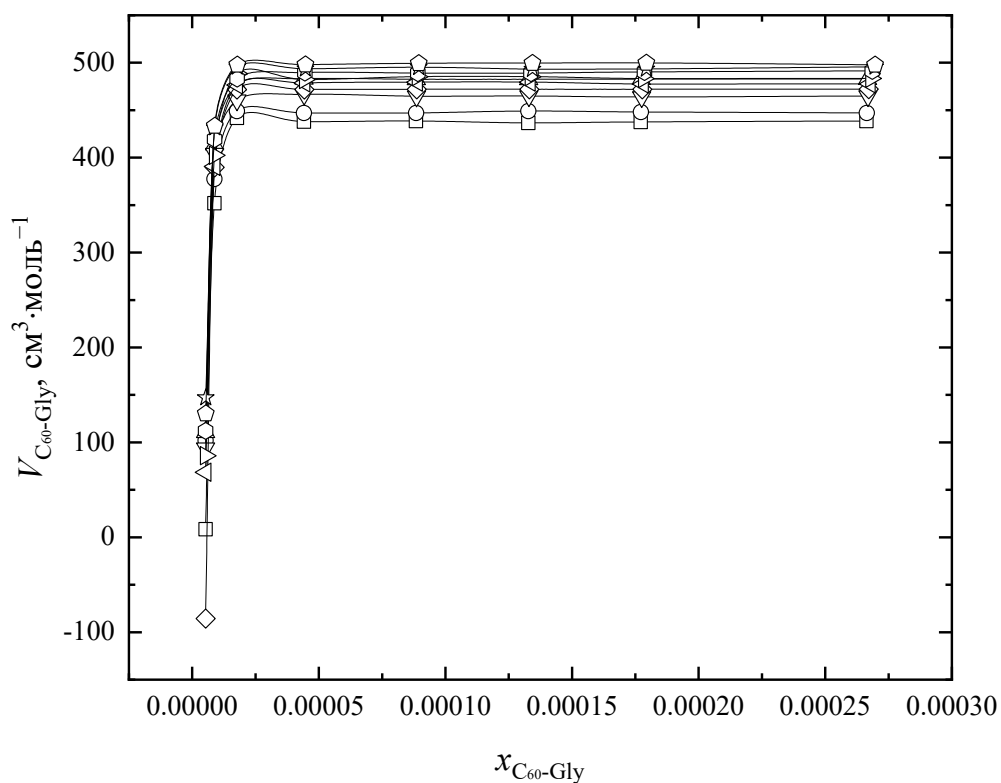


Рис. 3.18. Зависимость парциального молярного объёма C₆₀-Gly ($V_{C_{60}\text{-Gly}}$) от его мольной доли в температурном диапазоне 278.15–323.15 К: (□) 278.15 К, (○) 283.15 К, (△) 288.15 К, (▽) 293.15 К, (◇) 298.15 К, (◁) 303.15 К, (▷) 308.15 К, (⬡) 313.15 К, (☆) 318.15 К и (⬠) 323.15 К.

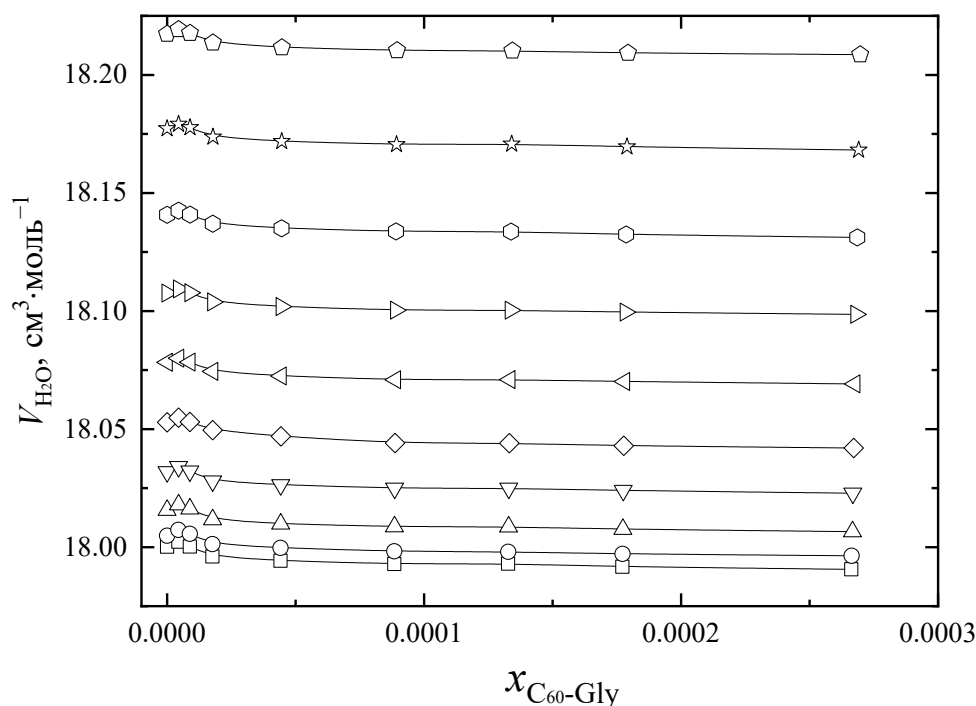


Рис. 3.19. Зависимость парциального молярного объема воды ($V_{\text{H}_2\text{O}}$) от мольной доли (x) $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ при различных температурах: (\square) 278.15 К, (\circ) 283.15 К, (\triangle) 288.15 К, (∇) 293.15 К, (\diamond) 298.15 К, (\triangleleft) 303.15 К, (\triangleright) 308.15 К, (\odot) 313.15 К, (\star) 318.15 К и (\ominus) 323.15 К.

Хорошо известно, что производные более высокого порядка потенциала Гиббса (в нашем случае, вторые производные), соответствующие первым производным объема или энтропии, значительно более чувствительны к изменению структуры раствора, чем частные производные низкого порядка. Смешанные производные второго порядка потенциала Гиббса были определены из экспериментальных данных по плотностям водных растворов $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ с использованием соотношений Максвелла:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial T} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial T \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial T} \right)_P = - \left(\frac{\partial \bar{S}}{\partial P} \right)_T \quad (5),$$

где $\bar{G}, \bar{V}, \bar{S}$ — средние молярные величины: потенциал Гиббса, объем и энтропия.

Хорошо видно, что функция $(\partial \bar{V} / \partial T)_P(x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}})$ проходит через минимум при концентрации аддукта фуллерена при всех рассмотренных температурах (Рис. 3.20). Мы пришли к выводу, что при этой температуре в водном растворе $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ происходит разделение фаз и происходит потеря диффузионной устойчивости. Этот факт связан со сложным типом агрегации $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ в водном растворе, то есть с образованием ассоциатов второго типа с линейными размерами в сотни нанометров.

Видно, что в изученном температурном диапазоне функция $(\partial \bar{V} / \partial T)_P(x_{C_{60}\text{-Gly}})$ проходит через минимум при $x_{C_{60}\text{-Gly}} \approx 5.3 \cdot 10^{-6}$ (Рис. 3.20). Эта концентрация соответствует потере диффузионной устойчивости водным раствором $C_{60}\text{-Gly}$. Последний факт связан со сложным типом ассоциации $C_{60}\text{-Gly}$ в растворе, а именно с образованием ассоциатов второго порядка с линейными размерами сотни нм.

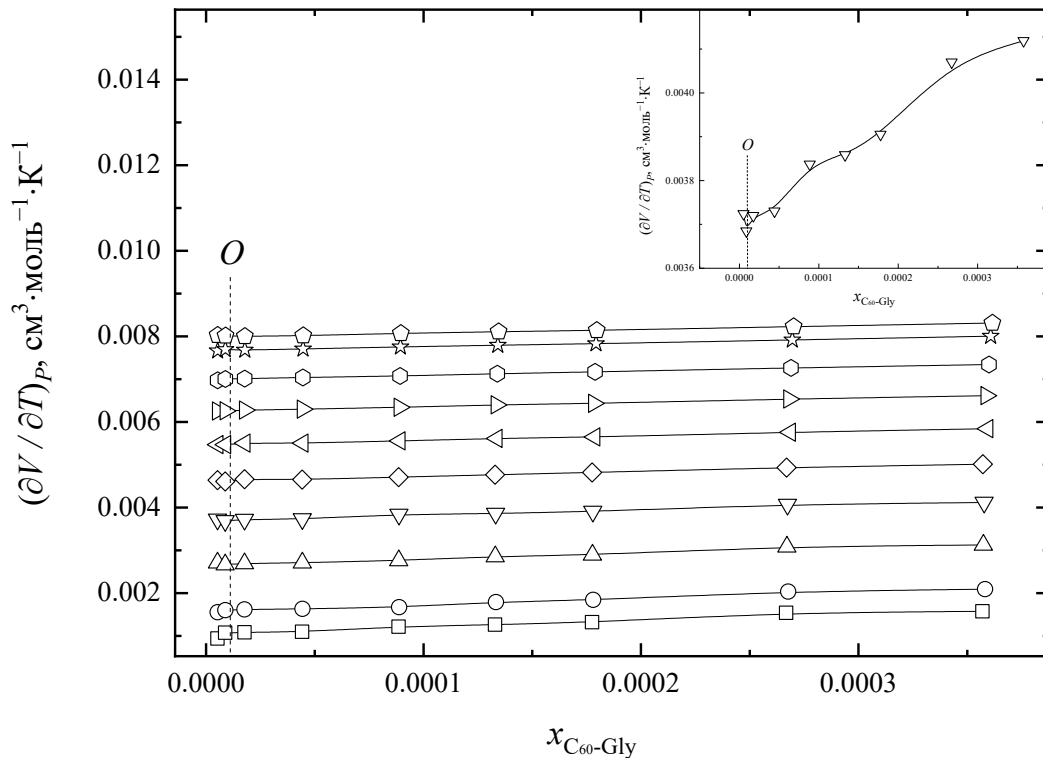


Рис. 3.20. Концентрационная зависимость производной $\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$ в диапазоне температур

278.15–323.15 К: $(\square) \left(\frac{\partial V_{278.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\circ) \left(\frac{\partial V_{283.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\triangle) \left(\frac{\partial V_{288.15}}{\partial T}\right)_{T,P}$, $(\nabla) \left(\frac{\partial V_{293.15}}{\partial T}\right)_P$, (\diamond)

$\left(\frac{\partial V_{298.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\triangleleft) \left(\frac{\partial V_{303.15}}{\partial T}\right)_{T,P}$, $(\triangleright) \left(\frac{\partial V_{308.65}}{\partial T}\right)_P$, $(\odot) \left(\frac{\partial V_{313.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\star) \left(\frac{\partial V_{318.15}}{\partial T}\right)_P$ и $(\ominus) \left(\frac{\partial V_{323.15}}{\partial T}\right)_{T,P}$

. O — экстремум $\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x \partial T}\right)_P = 0$, $x = 5.3 \cdot 10^{-6}$.

Похожие результаты были получены с использованием другой смешанной производной потенциала Гиббса:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial x} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x} \right)_{T,P} = \left(\frac{\partial \mu_{C_{60}\text{-Gly}}}{\partial P} \right)_T - \left(\frac{\partial \mu_{H_2O}}{\partial P} \right)_T = V_{C_{60}\text{-Gly}} - V_{H_2O} \quad (6),$$

где V_i — парциальный молярный объём, μ_i — химический потенциал i -го компонента.

Хорошо видно, что зависимость $(\partial \bar{V} / \partial x)_{P,T}(x_{C_{60}\text{-Gly}})$ также проходит через минимум при концентрации $x_{C_{60}\text{-Gly}} \approx 5.3 \cdot 10^{-6}$ (Рис. 3.21).

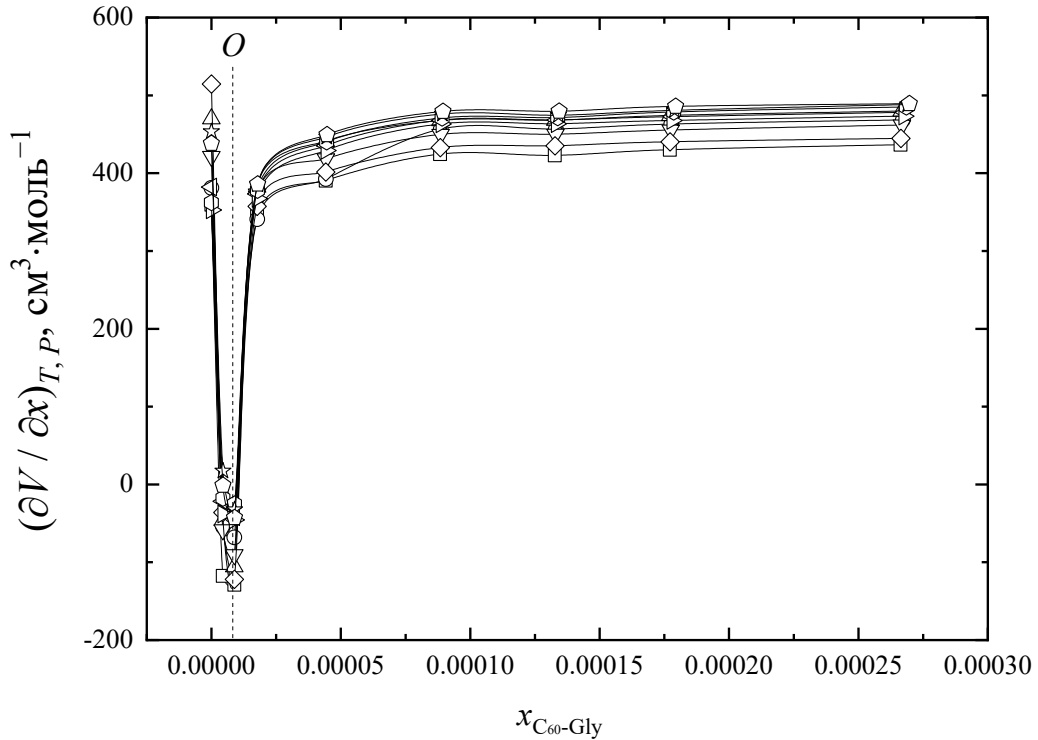


Рис. 3.21. Концентрационная зависимость производной $\left(\frac{\partial V}{\partial x_{C_{60}\text{-Gly}}} \right)_{T,P}$ в температурном интервале 278.15–323.15 К. (\square) 278.15 К, (\circ) 283.15 К, (\triangle) 288.15 К, (∇) 293.15 К, (\diamond) 298.15 К, (\triangleleft) 303.15 К, (\triangleright) 308.15 К, (\hexagon) 313.15 К, (\star) 318.15 К and (\odot) 323.15 К. O — экстремум $\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \right)_{T,P} = 0$, $x = 5.3 \cdot 10^{-6}$.

3.2.2. Скорость звука в водных растворах $C_{60}\text{-Gly}$

В Табл. 3.5 представлены полученные значения скорости звука в бинарной системе $C_{60}\text{-Gly-H}_2O$ в интервале температур $T = 278.15\text{--}333.15$ К. С использованием экспериментальных данных рассчитана изэнтропическая сжимаемость (κ_S) по уравнению Лапласа:

$$\kappa_S = \rho^{-1} \cdot u^{-2} \quad (7),$$

где ρ — плотность водного раствора C₆₀-Gly, u — скорость звука.

Полученные зависимости κ_S от молярной концентрации C₆₀-Gly представлены на Рис. 3.22. Наблюдается уменьшение κ_S можно наблюдать с увеличением концентрации C₆₀-Gly.

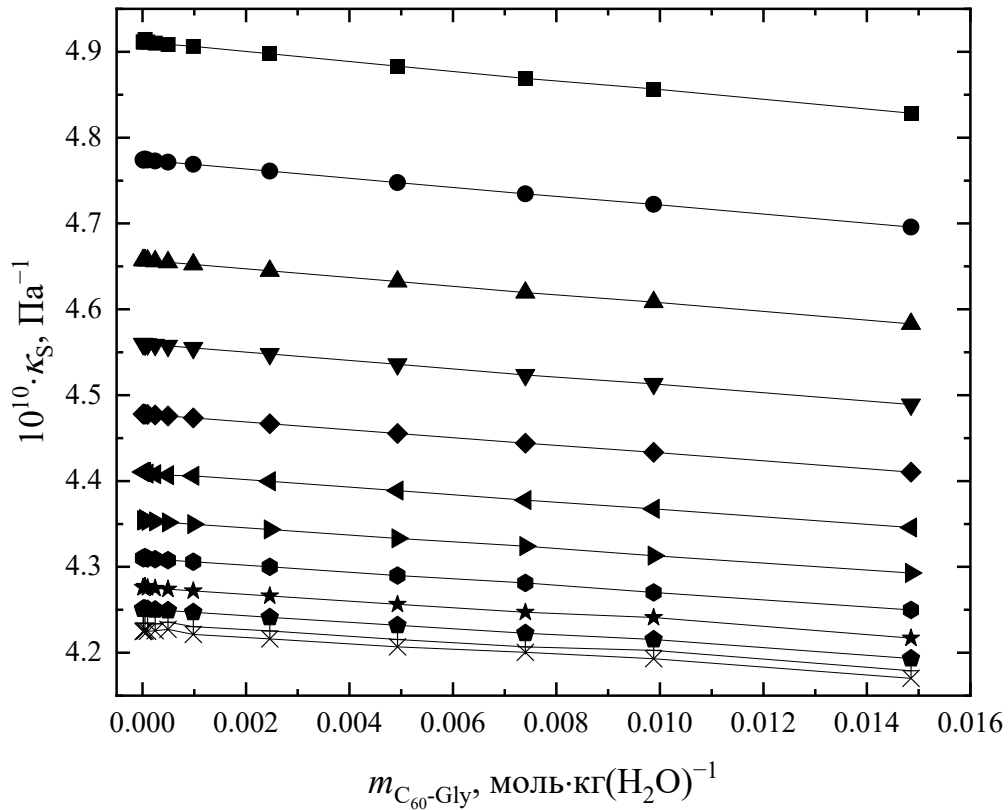


Рис. 3.22. Концентрационная зависимость изоэнтропической сжимаемости (κ_S) водного раствора C₆₀-Gly при температурах: (■) 278.15 К, (●) 283.15 К, (▲) 288.15 К, (▼) 293.15 К, (◆) 298.15 К, (◄) 303.15 К, (►) 308.15 К, (⬢) 313.15 К, (★) 318.15 К, (⬤) 323.15 К, (+) 328.15 К, (×) 333.15 К.

Кажущаяся удельная изоэнтропическая сжимаемость ($\kappa_{S,\phi}$) характеризует межмолекулярные взаимодействия между растворенным веществом и растворителем. Данная величина рассчитывается по Ур. 8:

$$\kappa_{S,\phi} = \frac{\kappa_S(1 + m_{C_{60}\text{-Gly}})}{\rho m_{C_{60}\text{-Gly}}} - \frac{\kappa_{S0}}{\rho_0 m_{C_{60}\text{-Gly}}} \quad (8),$$

где $m_{C_{60}\text{-Gly}}$ — моляльность $C_{60}\text{-Gly}$, κ_S и κ_{S0} — изоэнтропические сжимаемости $C_{60}\text{-Gly}$ и воды, соответственно, ρ и ρ_0 — плотности водных растворов $C_{60}\text{-Gly}$ и воды, соответственно.

Рассчитанные моляльные зависимости кажущейся удельной изоэнтропической сжимаемости водных растворов $C_{60}\text{-Gly}$ в интервале температур $T = 278.15\text{--}333.15$ К представлены на Рис. 3.23. Положительные значения $\kappa_{S,\phi}$ свидетельствуют о том, что молекулы воды, окружающие молекулы аддукта $C_{60}\text{-Gly}$ обладают меньшим сопротивлением к сжатию по сравнению с объёмными молекулами воды, что согласуется с выводом об уплотнении водных растворов $C_{60}\text{-Gly}$, полученным из концентрационной зависимости плотности. Как видно из Рис. 3.23, значения $\kappa_{S,\phi}$ уменьшаются с увеличением концентрации $C_{60}\text{-Gly}$, что означает, что раствор становится менее сжимаемым по сравнению с чистым растворителем за счёт увеличения межмолекулярных взаимодействий между молекулами воды и наночастицами $C_{60}\text{-Gly}$. В то же время повышение температуры приводит к ослаблению межмолекулярных взаимодействий и уменьшению $\kappa_{S,\phi}$.

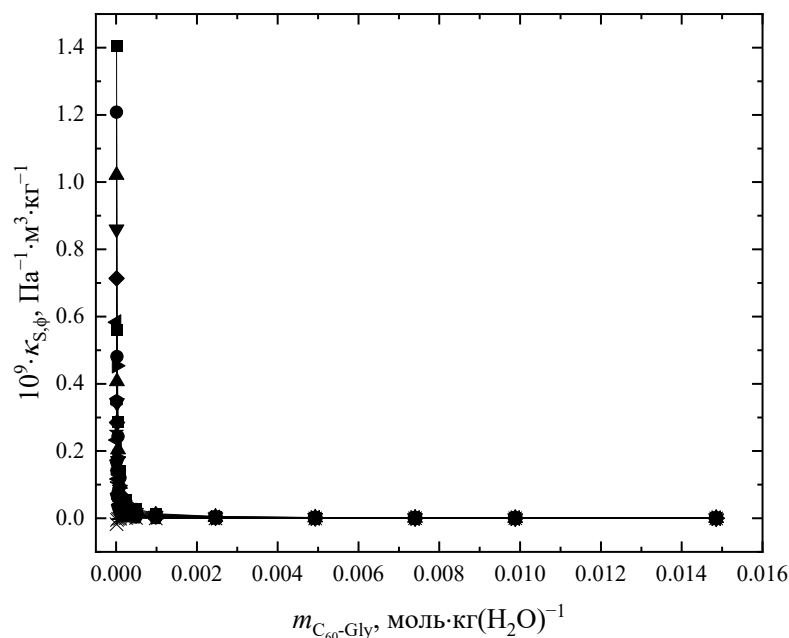


Рис. 3.23. Концентрационная зависимость кажущейся удельной изоэнтропической сжимаемости ($\kappa_{S,\phi}$) водного раствора $C_{60}\text{-Gly}$ при разных температурах: (■) 278.15 К, (●) 283.15 К, (▲) 288.15 К, (▼) 293.15 К, (◆) 298.15 К, (◄) 303.15 К, (►) 308.15 К, (⬤) 313.15 К, (★) 318.15 К, (⬤) 323.15 К, (+) 328.15 К, (×) 333.15 К.

Табл. 3.5. Температурная (T) и концентрационная (C) зависимости скорости звука (u) водных растворов C_{60} -Gly.

C , $г \cdot дм^{-3}$	u , $м \cdot с^{-1}$											
	278.15 К	283.15 К	288.15 К	293.15 К	298.15 К	303.15 К	308.15 К	313.15 К	318.15 К	323.15 К	328.15 К	333.15 К
0.01	1426.86	1447.46	1465.94	1482.21	1496.54	1509.01	1519.99	1529.13	1536.75	1542.99	1547.86	1551.61
0.025	1426.92	1447.55	1466.00	1482.23	1496.56	1509.03	1520.00	1529.13	1536.77	1542.98	1547.94	1551.53
0.05	1426.46	1447.32	1465.93	1482.31	1496.57	1509.00	1519.72	1528.88	1536.53	1542.99	1547.87	1551.49
0.1	1426.85	1447.48	1465.97	1482.24	1496.57	1509.31	1520.05	1529.17	1536.78	1542.99	1547.87	1551.53
0.25	1427.01	1447.60	1466.06	1482.32	1496.64	1509.40	1520.13	1529.24	1536.88	1543.05	1547.92	1551.57
0.5	1427.12	1447.69	1466.16	1482.41	1496.73	1509.49	1520.22	1529.36	1536.94	1543.14	1548.02	1551.65
1	1427.27	1447.87	1466.37	1482.62	1496.93	1509.40	1520.38	1529.50	1537.12	1543.32	1548.20	1551.84
2.5	1427.94	1448.50	1466.95	1483.17	1497.46	1509.90	1520.86	1529.96	1537.58	1543.79	1548.60	1552.25
5	1429.06	1449.56	1467.94	1484.11	1498.36	1510.77	1521.68	1530.75	1538.32	1544.48	1549.33	1552.94
7.5	1430.20	1450.57	1468.99	1485.15	1499.27	1511.64	1522.27	1531.33	1539.09	1545.32	1550.06	1553.63
10	1431.07	1451.53	1469.84	1485.94	1500.13	1512.47	1523.30	1532.32	1540.23	1546.86	1552.13	1555.30
15	1433.22	1453.59	1471.85	1487.87	1501.98	1514.24	1525.10	1534.03	1541.52	1547.59	1552.22	1555.72

3.2.3. Вязкость водных растворов C₆₀-Gly

Концентрационные зависимости динамической вязкости $\eta(C)$ водных растворов C₆₀-Gly представлены в Табл. 3.6 и на Рис. 3.24 ($T = 278.15\text{--}323.15$ К). Видно, что с увеличением концентрации C₆₀-Gly происходит увеличение вязкости.

Чтобы определить значения кинематической вязкости (η_k) в том же диапазоне температур, использовали Ур. 9:

$$\eta_k = \frac{\eta}{\rho} \quad (9),$$

где η — динамическая вязкость, ρ — плотность водных растворов C₆₀-Gly.

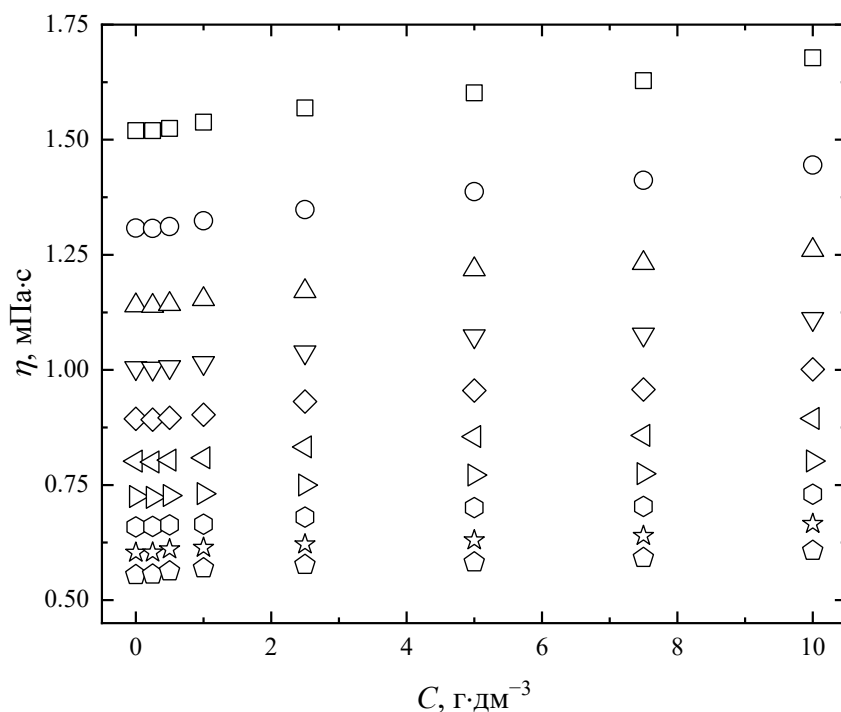


Рис. 3.24. Концентрационные зависимости динамической вязкости (η) при скорости сдвига 100 с^{-1} в бинарной системе C₆₀-Gly–H₂O при (□) 278.15 К, (○) 283.15 К, (△) 288.15 К, (▽) 293.15 К, (◇) 298.15 К, (◁) 303.15 К, (▷) 308.15 К, (⬡) 313.15 К, (☆) 318.15 К и (⬠) 323.15 К. C — объёмная концентрация.

Табл. 3.6. Температурная (T) и концентрационная (C) зависимости вязкости (η) водных растворов C_{60} -Gly.

$C, \text{г}\cdot\text{дм}^{-3}$	$\eta, \text{мПа}\cdot\text{с}$									
	278.15 К	283.15 К	288.15 К	293.15 К	298.15 К	303.15 К	308.15 К	313.15 К	318.15 К	323.15 К
0	1.5196	1.3080	1.1401	1.0040	0.8938	0.8019	0.7247	0.6591	0.6030	0.5544
0.25	1.5197	1.3073	1.1390	1.0030	0.8921	0.8001	0.7230	0.6601	0.6033	0.5557
0.50	1.5245	1.3115	1.1430	1.0064	0.8959	0.8039	0.7271	0.6633	0.6105	0.5625
1.00	1.5381	1.3238	1.1534	1.0152	0.9025	0.8093	0.7313	0.6648	0.6136	0.5694
2.50	1.5690	1.3483	1.1707	1.0382	0.9315	0.8327	0.7500	0.6803	0.6210	0.5764
5.00	1.6018	1.3873	1.2182	1.0735	0.9552	0.8551	0.7717	0.7008	0.6298	0.5822
7.50	1.6282	1.4117	1.2318	1.0772	0.9575	0.8578	0.7745	0.7035	0.6396	0.5916
10.00	1.6780	1.4449	1.2601	1.1110	1.0013	0.8946	0.8023	0.7300	0.6655	0.6070

Термодинамические параметры вязкого течения рассчитывались по уравнению Эйринга:

$$\eta = \frac{hN_A}{V} \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)_p \quad (10),$$

где η — динамическая вязкость, h — постоянная Планка, N_A — число Авогадро, V — молярный объём.

Термодинамические характеристики вязкого течения (ΔG , ΔH , ΔS) были рассчитаны в соответствии с Ур. 11–13 (см. Табл. 3.7):

$$\Delta G = RT \ln \frac{\eta V}{hN_A} \quad (11),$$

$$\Delta H = -RT^2 \frac{\partial}{\partial T} \left(\ln \frac{\eta V}{hN_A} \right) \quad (12),$$

$$\Delta S = -\frac{\Delta G^* \cdot \Delta H^*}{T} \quad (13).$$

Табл. 3.7. Концентрационная зависимость энтропийного фактора ($\ln A_S$), энергии активации вязкого течения (E_a), температуры Аррениуса (T_A), энтальпии активации (ΔH) и энтропии (ΔS). C — концентрация водного раствора C_{60} -Gly.

C , г·дм ⁻³	E_a , Дж·моль ⁻¹	$\ln A_S$, ln[мПа·с]	T_A , К	ΔH , кДж·моль ⁻¹	ΔS , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹
0.25	16628.31	-6.8027	294.01	33.26	-66.82
0.50	16489.88	-6.7415	294.21	32.98	-67.83
1.00	16714.61	-6.8265	294.50	33.43	-66.42
2.50	16849.53	-6.8424	296.19	33.70	-66.16
5.00	16860.55	-6.8326	296.81	33.72	-66.32
7.50	16914.73	-6.8519	296.92	33.83	-66.00
10.00	16715.11	-6.7354	298.50	33.43	-67.94

ΔH и ΔS несут информацию о взаимодействиях растворенного вещества с растворителем. Анализ Табл. 3.7 показывает стабильность значений энтальпий (ΔH^*) и энтропий (ΔS^*) вязкого течения во всём диапазоне концентраций ($C = 0.25$ – 10 г·дм⁻³), учитывая точность численного дифференцирования. Положительные значения ΔH указывают на специфические взаимодействия между молекулами, отрицательные

значения ΔS свидетельствуют о том, что образование активированного комплекса приводит к молекулярному упорядочению в растворе. Используя логарифмическую форму уравнения Френкеля — Андраде, была вычислена энергия активации вязкого течения и предэкспоненциальный множитель (Табл. 3.7):

$$\ln \eta = \ln A_s + \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (14),$$

где A_s — предэкспоненциальный множитель, E_a — энергия активации для переходного состояния, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура.

Температуры активации были определены согласно Ур. 15 (Табл. 3.7):

$$T_A = \frac{-E_a}{R \ln A_s} \quad (15).$$

Дополнительно были рассчитаны коэффициенты Вант-Гоффа для вязкости (γ_η) бинарной системы C_{60} -Gly- H_2O в соответствии с Ур. 16:

$$\gamma_\eta^{10} = \frac{\eta_{T-\Delta T}}{\eta_T} = 1.26 \pm 0.07 \quad (16),$$

где γ_η — коэффициент вязкости Вант-Гоффа (Рис. 3.25).

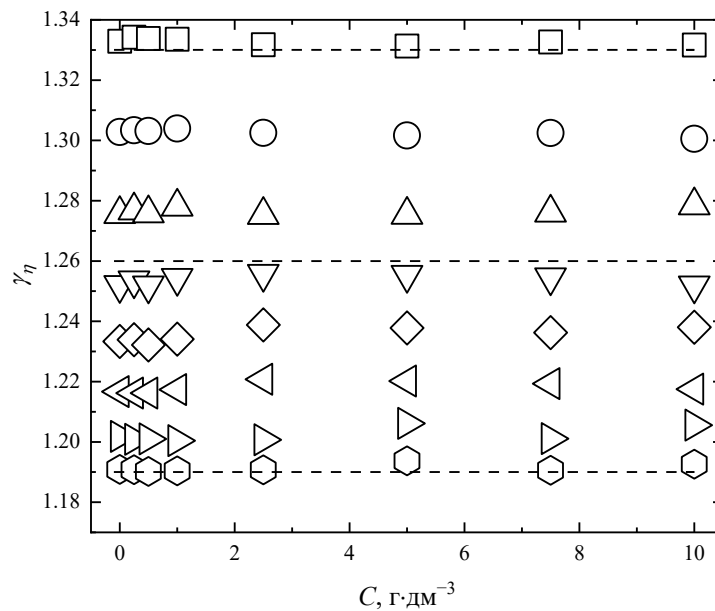


Рис. 3.25. Концентрационная зависимость коэффициента вязкости Вант-Гоффа ($\gamma_\eta = 1.26 \pm 0.07$) в бинарной системе C₆₀-Gly-вода. (\square) $\frac{\eta_{278.15}}{\eta_{288.15}}$, (\circ) $\frac{\eta_{283.15}}{\eta_{293.15}}$, (\triangle) $\frac{\eta_{288.15}}{\eta_{298.15}}$, (∇) $\frac{\eta_{293.15}}{\eta_{303.15}}$, (\diamond)

$\frac{\eta_{298.15}}{\eta_{308.15}}$, (\triangleleft) $\frac{\eta_{303.15}}{\eta_{313.15}}$, (\triangleright) $\frac{\eta_{308.15}}{\eta_{318.15}}$, (\circ) $\frac{\eta_{313.15}}{\eta_{323.15}}$.

Температурные зависимости динамических вязкостей (Рис. 3.26) бинарной системы C₆₀-Gly-H₂O были описаны с помощью трёхпараметрического уравнения Фогеля — Фулчера — Таммана (VFT):

$$\lg \eta(T) = \lg \eta_0 + \frac{A}{T - B} \quad (17),$$

где η_0 , A и B — корреляционные параметры.

Значения среднего абсолютного отклонения (AAD) и стандартного отклонения (SD) между экспериментальными и расчётными данными были получены в соответствии с Ур. 18 и 19:

$$AAD = \left[\sum_{i=1}^n \left(\frac{\eta_{\text{exp},i} - \eta_{\text{cal},i}}{\eta_{\text{exp},i}} \right) \right] \cdot \frac{100}{n} \quad (18),$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\eta_{\text{exp},i} - \eta_{\text{cal},i})^2}{n - p}} \quad (19),$$

где $\eta_{\text{exp},i}$ и $\eta_{\text{cal},i}$ — экспериментальная и расчётная динамическая вязкость, n — количество экспериментальных точек, p — количество регулируемых параметров.

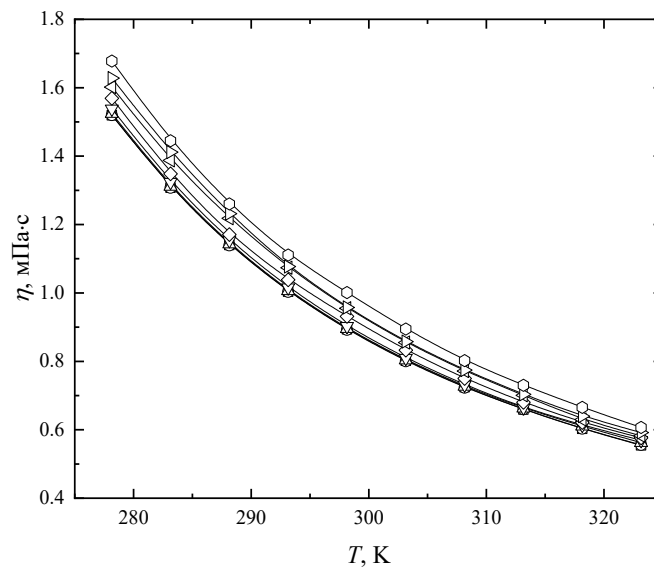


Рис. 3.26. Температурные зависимости динамической вязкости (η) при скорости сдвига 100 с^{-1} в бинарной системе $\text{C}_{60}\text{-Gly-H}_2\text{O}$ при различных концентрациях $\text{C}_{60}\text{-Gly}$: (\square) $0 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (\circ) $0.25 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (\triangle) $0.5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (∇) $1 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (\diamond) $2.5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (\triangleleft) $5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (\triangleright) $7.5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (\odot) $10 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$. Точки — экспериментальные значения, сплошные линии — аппроксимация по уравнению VFT при различных концентрациях.

Значения параметров уравнения VFT, а также значения SD и AAD представлены в Табл. 3.8.

Табл. 3.8. Корреляционные параметры для уравнения VFT. C — концентрация $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ в водном растворе, SD — стандартное отклонение, AAD — абсолютное среднее отклонение.

	$C_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}, \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$						
	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	7.50	10.00
$\eta_0, \text{ мПа}\cdot\text{с}$	0.0376	0.0382	0.0378	0.0391	0.0397	0.0396	0.0420
$A, \text{ К}$	192.4	192.2	192.4	192.5	192.5	192.6	192.3
$B, \text{ К}$	158.3	158.0	158.5	158.7	158.7	158.8	158.0
$SD, \text{ мПа}\cdot\text{с}$	0.0013	0.0023	0.0014	0.0016	0.0025	0.0033	0.0057
$AAD, \%$	0.23	0.35	0.13	0.13	0.18	0.27	0.40

3.2.4. Изобарная теплоёмкость

Температурные зависимости изобарной теплоёмкости в диапазоне $T = 282.85\text{--}322.85 \text{ К}$ для воды, твёрдого $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ и водного раствора $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ ($C = 30 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$) представлены на Рис. 3.27.

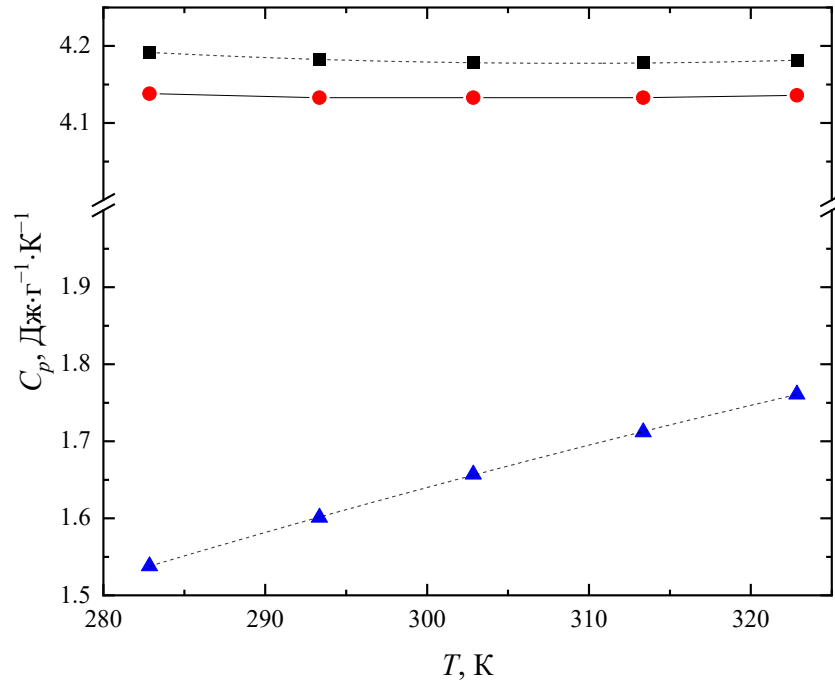


Рис. 3.27. Зависимости изобарной теплоёмкости (C_p) от температуры (T) для воды (■), твёрдого C_{60} -Gly (●) и водного раствора C_{60} -Gly ($C = 30 \text{ г·дм}^{-3}$) (▲). Точки — экспериментальные значения; сплошная линия — результат расчёта по Ур. 20, пунктирные линии — результат аппроксимации с использованием Ур. 21.

Экспериментальные значения теплоёмкостей водных растворов C_{60} -Gly сравнивали с расчётными значениями ($C_{p, \text{раствор}}$), полученными с помощью Ур. 20, которое широко применяется для прогнозирования значений теплоёмкостей дисперсий и растворов [212,213]:

$$C_{p, \text{раствор}} = w \cdot C_{p, C_{60}\text{-Gly}} + (1-w) \cdot C_{p, H_2O} \quad (20),$$

где w — массовая доля C_{60} -Gly в водном растворе, $C_{p, C_{60}\text{-Gly}}$ — изобарная теплоёмкость твёрдого C_{60} -Gly, C_{p, H_2O} — изобарная теплоёмкость воды. Результат расчёта представлен на Рис. 3.27.

Температурные зависимости C_p для воды и твёрдого C_{60} -Gly описывали с использованием полиномиального уравнения:

$$C_p = a_0 + a_1 T + a_2 T^2 \quad (21),$$

где a_i ($i = 0-2$) — фиксированные коэффициенты. Определённые коэффициенты a_i представлены в Табл. 3.9.

Табл. 3.9. Фиксированные коэффициенты a_i ($i = 0-2$) полиномиального Ур. 21, описывающего температурные зависимости изобарной теплоёмкости воды и C₆₀-Gly.

Образец	$a_0, \text{Дж}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$	$a_1, \text{Дж}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$	$a_2, \text{Дж}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$	R^2
H ₂ O	6.150	-0.0128	$2.066\cdot 10^{-5}$	0.984
C ₆₀ -Gly	-1.568	0.0157	$-1.675\cdot 10^{-5}$	0.999

3.2.5. Распределение наночастиц C₆₀-Gly по размерам водном растворе и ζ -потенциалы

На Рис. 3.28 и в Табл. 3.10 представлена концентрационная зависимость распределения ассоциатов C₆₀-Gly по размерам в водных растворах в диапазоне концентраций $C = 0.01-10 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$ при $T = 298.15 \text{ К}$.

Число ассоциатов i -го типа, упакованных в ассоциат $(i + 1)$ -того типа ($N_{i \rightarrow i+1}$) определялось по Ур. 22:

$$N_{i \rightarrow i+1} = \left(\frac{d_{i+1}}{d_i} \right)^3 \cdot K_{\text{упак.}} \quad (22),$$

где $K_{\text{упак.}}$ — формальный упаковочный коэффициент, характеризующий отношение объёма, занятого мономерными молекулами аддукта C₆₀ с глицином в ассоциате к общему объёму ассоциата (в сфероидном приближении). Из-за сравнительно больших размеров и заряда ионов C₆₀-Gly в водных растворах был выбран упаковочный коэффициент, соответствующий примитивной кубической ячейке ($K_{\text{упак.}} = 0.52$).

Анализ Табл. 3.10 и Рис. 3.28 позволяет сделать следующие заключения: (i) в растворе отсутствуют мономерные молекулы C₆₀-Gly с линейными размерами 2 нм в диапазоне концентраций C₆₀-Gly $C = 0.01-10 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (ii) в диапазоне низких концентраций ($C = 0.01-0.3 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$) в растворе присутствуют ассоциаты первого порядка с линейным размером 30–50 нм; (iii) ассоциаты второго порядка с линейным размером 100–400 нм наряду с ассоциатами первого порядка детектированы в диапазоне концентраций $C = 0.3-0.5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (iv) в более концентрированных растворах ($C = 0.5-10 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$) помимо ассоциатов второго порядка присутствуют ассоциаты третьего порядка, линейный размер которых составляет 1–2 мкм.

С помощью уравнения Гельмгольца — Смолуховского были рассчитаны ζ -потенциалы на основе экспериментальных значений электрофоретической подвижности. Анализ значений ζ -потенциалов (Табл. 3.10) показывает, что их значения находятся в

диапазоне от -40 до -30 мВ, что свидетельствует об агрегативной устойчивости водных растворов C_{60} -Gly в изученном диапазоне концентраций.

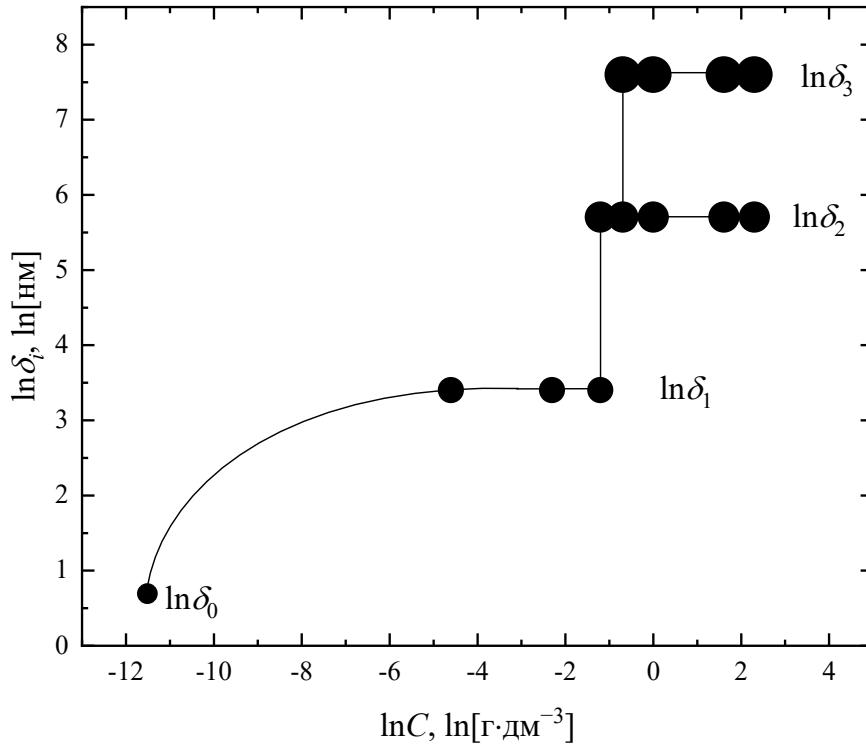


Рис. 3.28. Концентрационная зависимость распределения по размерам ассоциатов C_{60} -Gly в водных растворах при 298.15 К. C — объёмная концентрация C_{60} -Gly.

Табл. 3.10. Размеры частиц и ζ -потенциалы в бинарной системе C_{60} -Gly- H_2O при 298.15 К.

C , г·дм $^{-3}$	δ_0 , нм	δ_1 , нм	δ_2 , нм	δ_3 , мкм	$N_{0 \rightarrow 1} \cdot 10^{-3}$	$N_{0 \rightarrow 3} \cdot 10^{-4}$	$N_{0 \rightarrow 3} \cdot 10^{-7}$	ζ , мВ
0	2	—	—	—	—	—	—	—
0.01	—	30–50	—	—	2–8	—	—	-40 ± 5
0.1	—	30–50	—	—	2–8	—	—	-40 ± 5
0.3	—	30–50	100–400	—	2–8	6.5–420	—	-35 ± 5
0.5	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-35 ± 5

1.0	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-35 ± 5
5.0	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-30 ± 5
10.0	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-30 ± 5

3.3. Корреляция температурных и концентрационных зависимостей плотности, вязкости и скорости звука водных растворов C₆₀-Gly

Температурные и концентрационные зависимости физико-химических свойств (плотность, вязкость и показатель преломления), M , были описаны с использованием следующего полинома четвёртого порядка, $M(T, C)$:

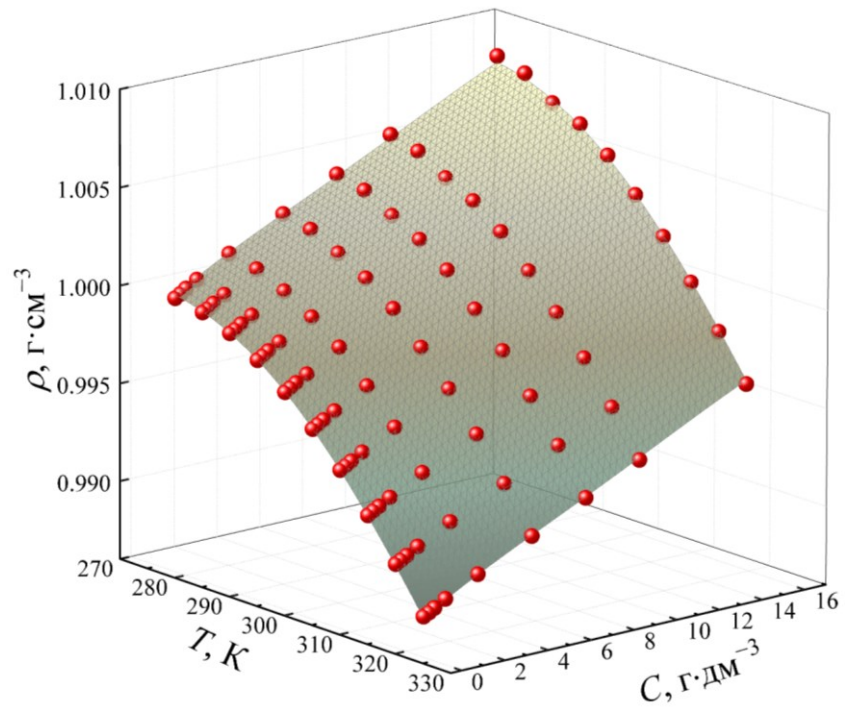
$$M = a + \sum_{i=1}^4 b_i \cdot T^i + \sum_{j=1}^4 c_j \cdot C^j \quad (23),$$

где C — объёмная концентрация C₆₀-Gly, T — абсолютная температура, a, b_i, c_j ($i, j = 1-4$) — корреляционные параметры, рассчитанные методом наименьших квадратов с использованием программного обеспечения Origin 9 (Табл. 3.11). Высокие значения коэффициента детерминации R^2 для всех изученных свойств указывают на хорошее согласие экспериментальных и расчётных значений (Рис. 3.29).

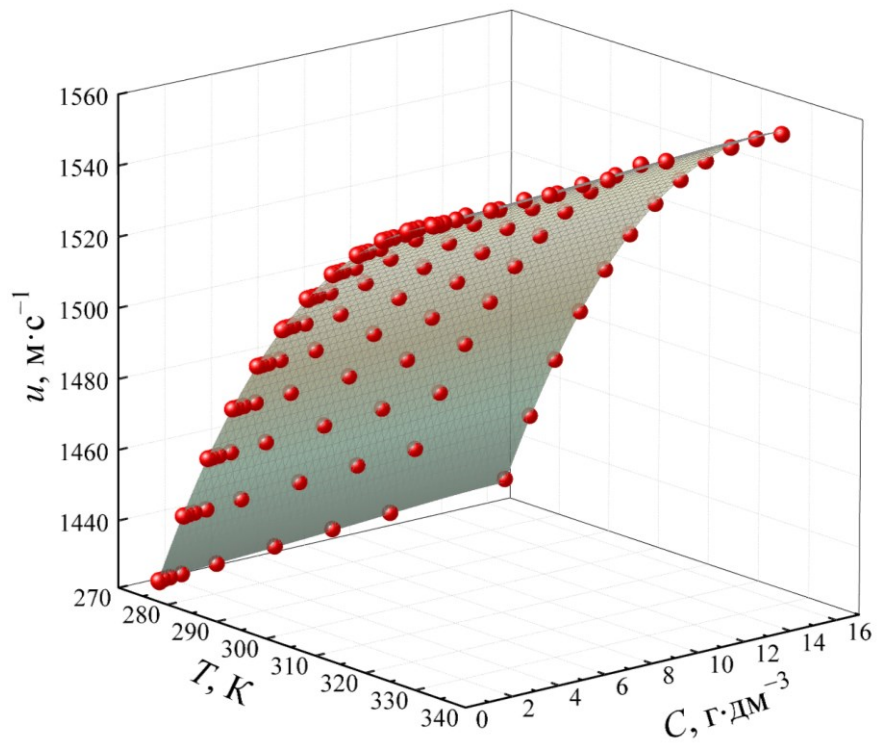
Табл. 3.11. Корреляционные параметры a , b_i , c_j ($i, j = 1-4$) Ур. 23 для T - C зависимостей плотности (ρ), скорости звука (u) динамической вязкости (η) водных растворов C₆₀-Gly. R^2 — коэффициент детерминации.

Свойство раствора	a	b_1	b_2	b_3	b_4	c_1	c_2	c_3	c_4	R^2
ρ , г·см ⁻³	4.68	-0.053	$2.83 \cdot 10^{-4}$	$-6.61 \cdot 10^{-7}$	$5.68 \cdot 10^{-10}$	$6.98 \cdot 10^{-4}$	$-3.54 \cdot 10^{-4}$	$3.10 \cdot 10^{-6}$	$-9.21 \cdot 10^{-8}$	0.99967
u , м·с ⁻¹	$-1.26 \cdot 10^4$	144.83	-0.57	$1.03 \cdot 10^{-3}$	$-7.22 \cdot 10^{-7}$	0.46	-0.050	$6.77 \cdot 10^{-3}$	$-2.61 \cdot 10^{-4}$	0.99996
η , мПа·с	1131.24	-14.22	0.067	$-1.42 \cdot 10^{-4}$	$9.54 \cdot 10^{-8}$	$8.67 \cdot 10^{-3}$	$3.46 \cdot 10^{-3}$	$-8.23 \cdot 10^{-4}$	$4.90 \cdot 10^{-5}$	0.99826

(a)



(б)



(в)

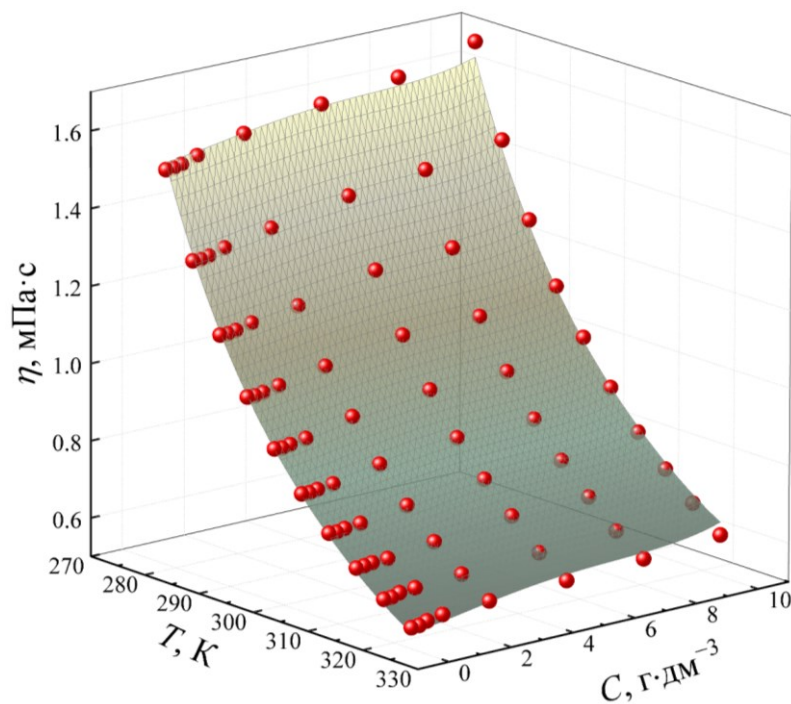


Рис. 3.29. Температурные и концентрационные зависимости плотности — ρ (а), u — скорости звука (б) и вязкости η (в) водных растворов C₆₀-Gly, T — абсолютная температура, C — объёмная концентрация C₆₀-Gly. Красные сферы представляют экспериментальные данные, поверхности были рассчитаны по Ур. 23.

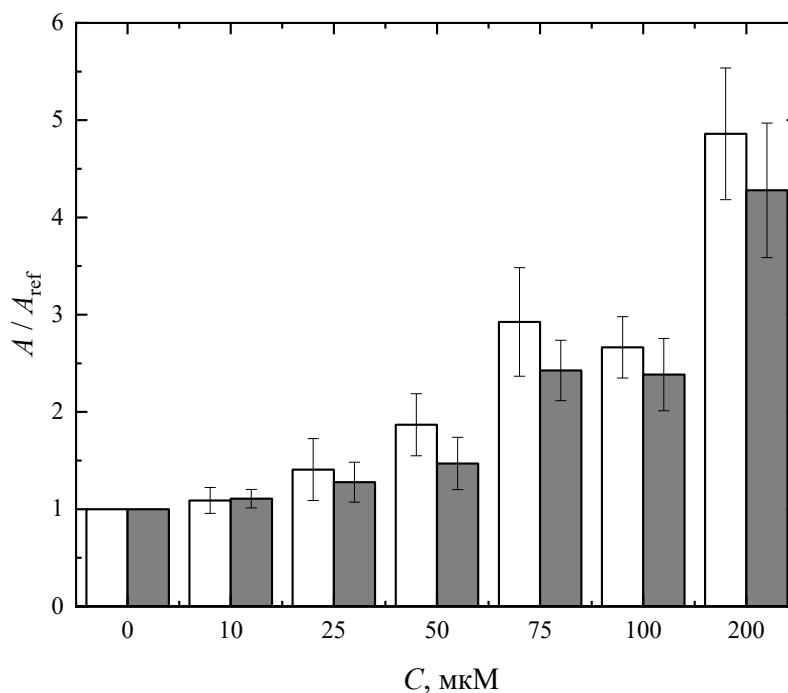
Глава 4. Изучение биосовместимости водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами, фуллеренола и карбоксилированного фуллерена

4.1. Биосовместимость аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами

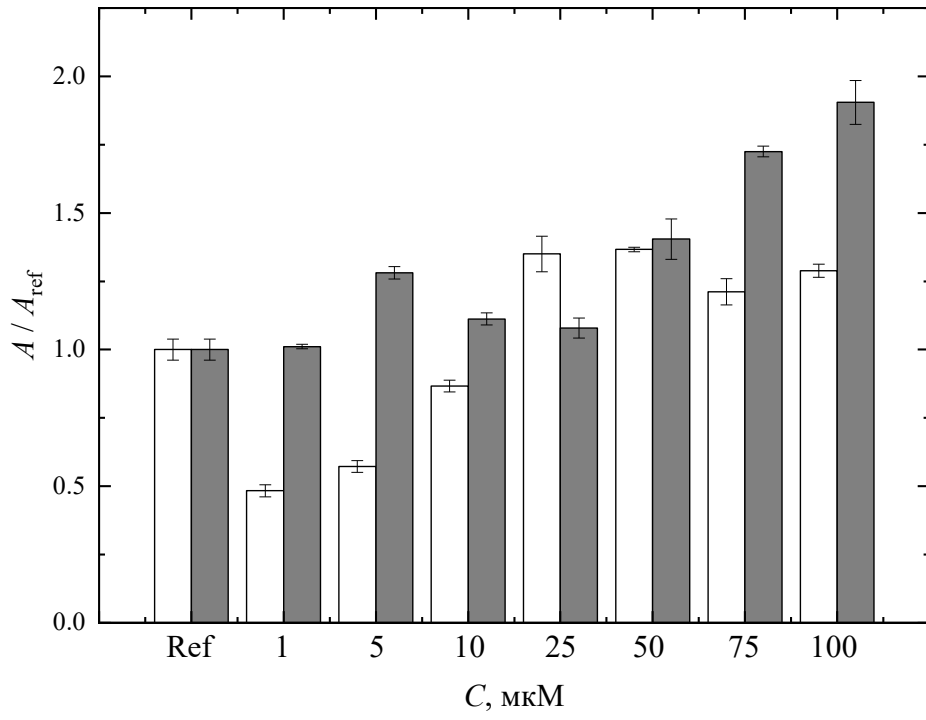
4.1.1. Спонтанный гемолиз

Для оценки биосовместимости аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами было изучено их влияние на спонтанный гемолиз эритроцитов. В случае совместимых с кровью веществ мембрана эритроцитов остаётся неповреждённой, а содержимое клетки не высвобождается. Влияние аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами на гемолиз эритроцитов определяли по высвобождению гемоглобина из эритроцитов. Результаты представлены на Рис. 4.1. C_{60} -Gly при инкубации в течение 1 и 3 ч вызывает гемолиз при концентрациях выше 25 мкМ (Рис. 4.1а); C_{60} -Нур в течение 1 ч вызывает гемолиз в концентрации выше 25 мкМ, в течение 3 ч — выше 5 мкМ (Рис. 4.1б); C_{60} -Met в течение 1 ч — выше 25 мкМ, в течение 3 ч — даже при 1 мкМ (Рис. 4.1в); C_{60} -Cys в течение 1 ч — выше 200 мкМ, в течение 3 ч — выше 50 мкМ (Рис. 4.1г). При этом степень гемолиза для всех производных фуллерена C_{60} носит дозозависимый характер.

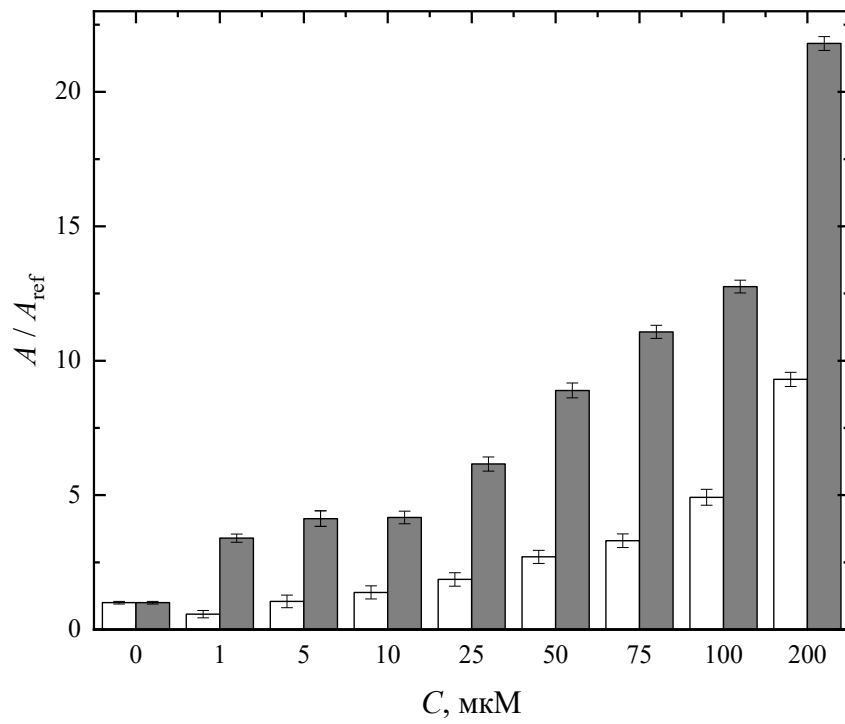
(а)



(б)



(b)



(c)

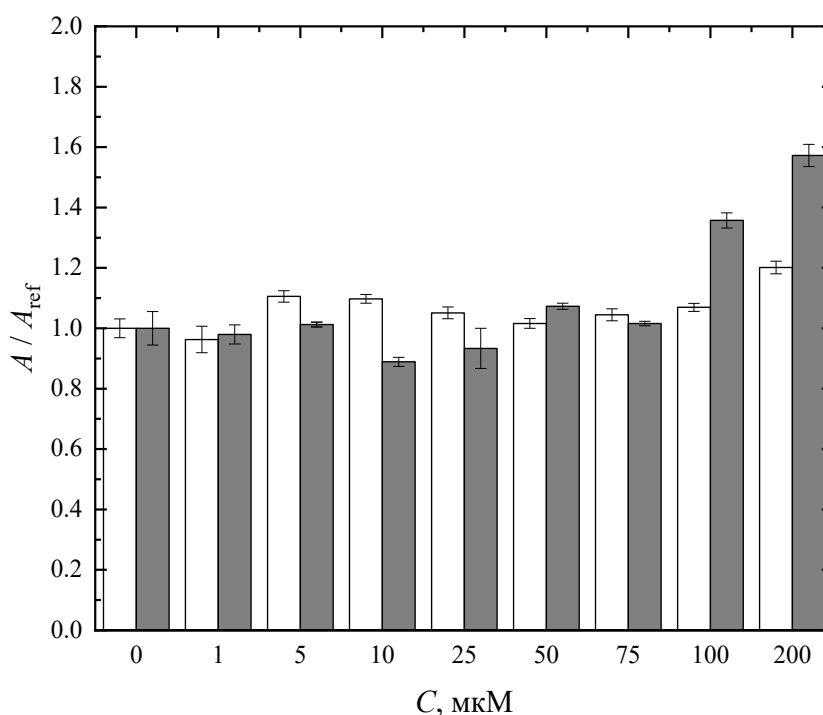


Рис. 4.1. Влияние аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами на гемолиз через 1 ч (белый) и 3 ч (серый): C_{60} -Gly — (a). б — C_{60} -Нур — (б). C_{60} -Met — (в). C_{60} -Cys — (г).

4.1.2. Агрегация тромбоцитов

Как видно из данных, представленных в Табл. 4.1, в тестах АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов наблюдаются следующие эффекты при добавлении аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами: (i) C_{60} -Gly в диапазоне концентраций 50–100 мкМ статистически значимо по сравнению с контролем снижает агрегацию тромбоцитов с дозозависимым эффектом; (ii) C_{60} -Нур и C_{60} -Cys не влияют на агрегацию тромбоцитов в концентрационном диапазоне 5–100 мкМ; (iii) C_{60} -Met в диапазоне концентраций 10–100 мкМ статистически значимо по сравнению с контролем снижает агрегацию тромбоцитов с дозозависимым эффектом.

Табл. 4.1. Влияние аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами на агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме (индуктор агрегации — 10 мкМ АДФ).

Аддукт	Амплитуда, %				
	Концентрация аддукта фуллерена C_{60} , мкМ				
	Контроль	5	10	50	100
C_{60} -Gly	82.4 ± 0.2	75.9 ± 4.2	74.1 ± 5.1	70.0 ± 3.3	61.5 ± 1.1

C ₆₀ -Hyp	85.1 ± 1.2	84.1 ± 2.1	84.5 ± 2.5	81.9 ± 1.8	80.8 ± 0.9
C ₆₀ -Met	81.8 ± 3.3	81.1 ± 2.7	71.0 ± 3.0	65.4 ± 1.9	51.3 ± 2.8
C ₆₀ -Cys	84.6 ± 2.8	83.1 ± 3.2	85.2 ± 4.1	81.6 ± 2.8	81.2 ± 2.2

4.1.3. Взаимодействие с ДНК

Для изучения взаимодействия аддуктов фуллерена C₆₀ с ДНК был использован метод электронной спектроскопии. На Рис.4.2. представлены спектры поглощения растворов ДНК ($C = 6.49 \cdot 10^{-8}$ М) в присутствии аддуктов C₆₀ с L-аминокислотами ($C = 6.43 \cdot 10^{-8}$ М).

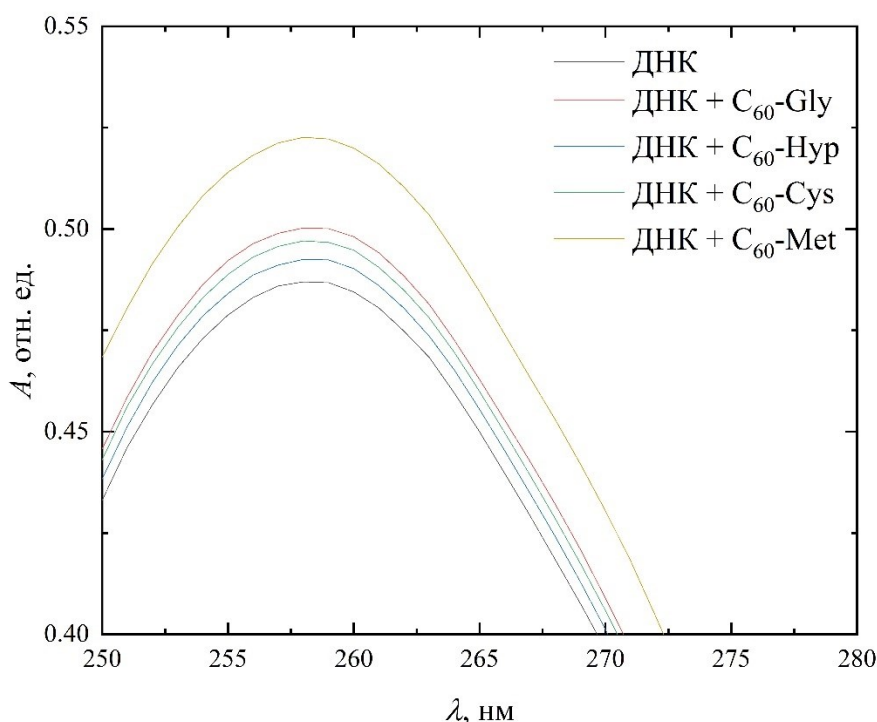


Рис. 4.2. Спектры поглощения растворов ДНК ($C = 6.49 \cdot 10^{-8}$ М) и растворов ДНК ($C = 6.49 \cdot 10^{-8}$ М) в присутствии аддуктов C₆₀ с L-аминокислотами ($C = 6.43 \cdot 10^{-8}$ М).

Видно, что наблюдается гиперхромный эффект при добавлении аддуктов C₆₀ с L-аминокислотами к раствору ДНК. При этом не происходило заметного сдвига максимума поглощения ДНК. Гиперхромизм объясняется наличием следующих синергических нековалентных взаимодействий: внешнего контакта аддуктов C₆₀ с L-аминокислотами и сахарофосфатным остовом молекулы ДНК за счёт электростатического взаимодействия и образования водородных связей. Поскольку отсутствуют изменения в положении полос поглощения (батохромный или гипсохромный сдвиги), можно сделать вывод, что

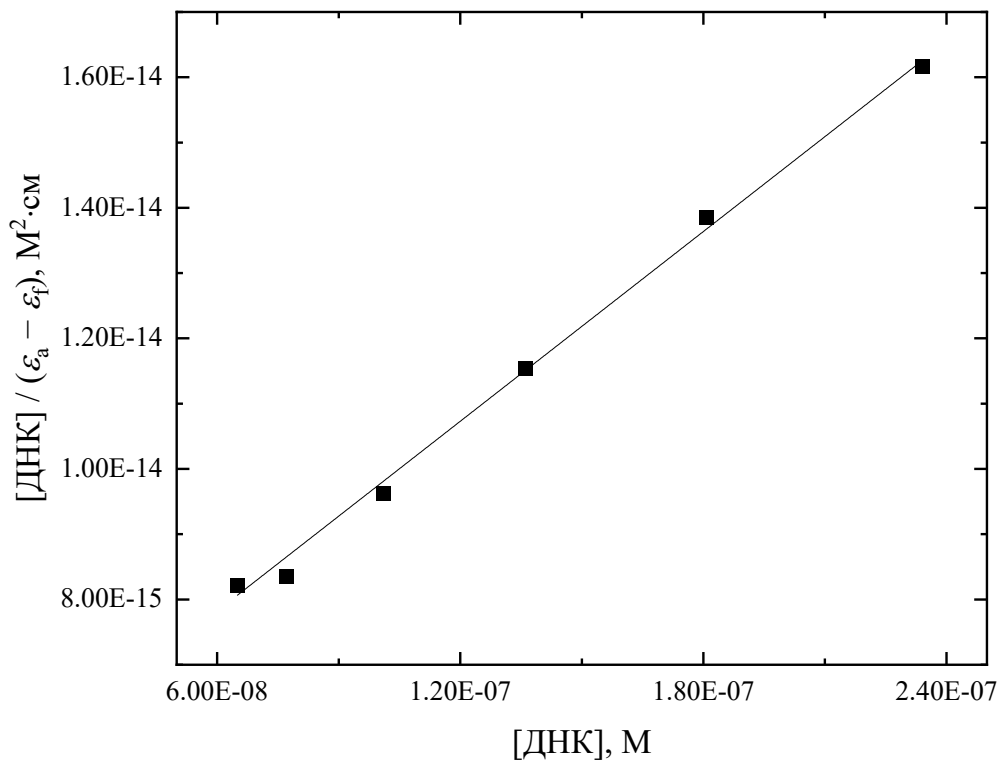
наблюдается связывание аддуктов C_{60} с бороздками молекулы ДНК. Константа связывания (K_b) была рассчитана по уравнению Вульфа — Шиммера:

$$\frac{[\text{ДНК}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{ДНК}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (24),$$

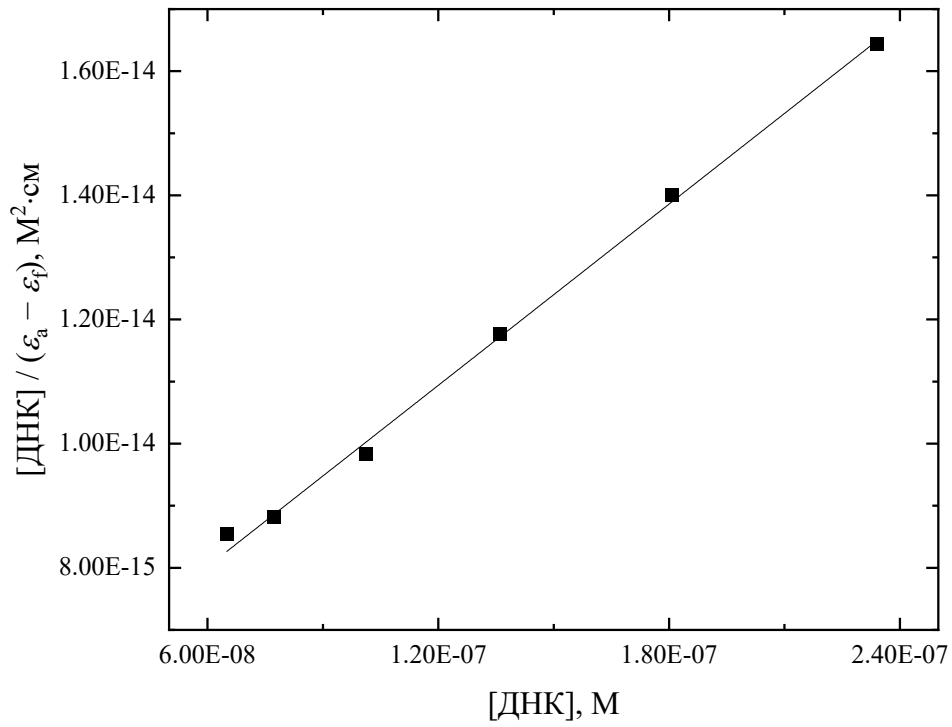
где $[\text{ДНК}]$ — концентрация ДНК, ε_a , ε_f , ε_b — коэффициенты экстинкции комплекса лиганда (аддукта C_{60} с L-аминокислотами) с ДНК, лиганда и лиганда, связанного с ДНК в стехиометрическом количестве, соответственно.

На Рис. 4.3 представлены зависимости Вульфа — Шиммера (в координатах $[\text{ДНК}] / (\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ от концентрации $[\text{ДНК}]$) для связывания аддуктов C_{60} -Gly, C_{60} -Нур, C_{60} -Met и C_{60} -Cys с ДНК. Значения ε_f и K_b , полученные из графиков, представлены в Табл. 4.2.

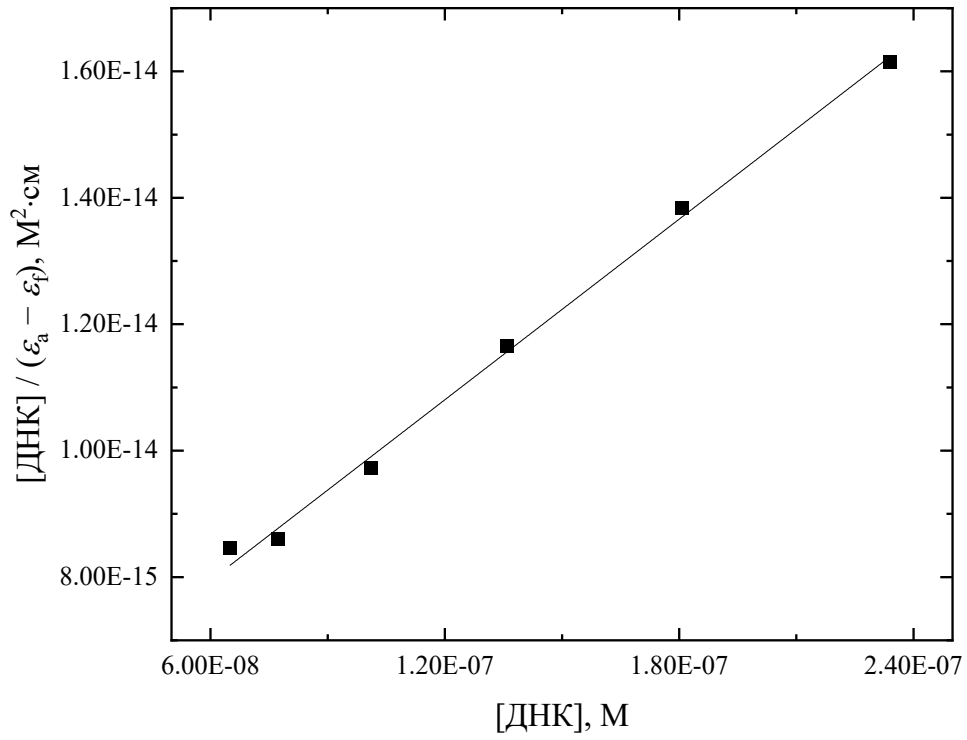
(a)



(б)



(б)



(в)

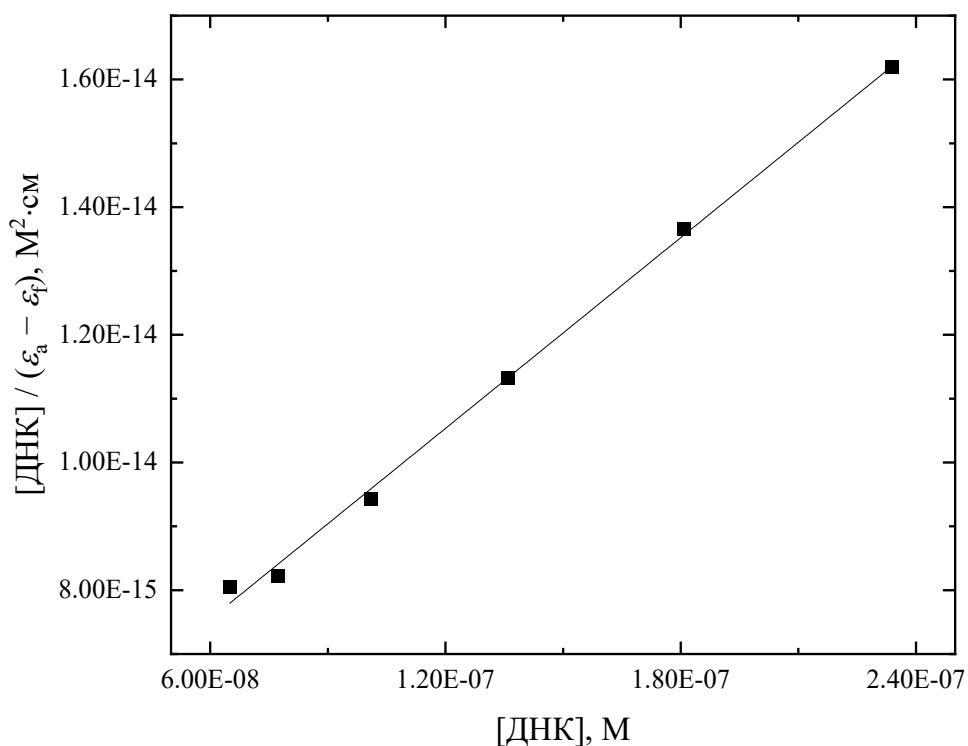


Рис. 4.3. Зависимости Вульфа — Шиммера для связывания ДНК с C₆₀-Gly — (а), C₆₀-Нур — (б), C₆₀-Met — (в) и C₆₀-Cys — (г).

Табл. 4.2. Значения коэффициентов экстинкции (ε_f) и констант связывания (K_b) аддуктов фуллерена C₆₀ с ДНК.

Аддукт	ε _f · 10 ⁴ , M ⁻¹ · см ⁻¹	K _b · 10 ⁶ , M ⁻¹
C ₆₀ -Gly	2.74 ± 0.06	9.85 ± 0.65
C ₆₀ -Нур	2.59 ± 0.08	9.54 ± 0.49
C ₆₀ -Cys	3.31 ± 0.51	9.35 ± 0.52
C ₆₀ -Met	3.36 ± 0.06	10.92 ± 0.53

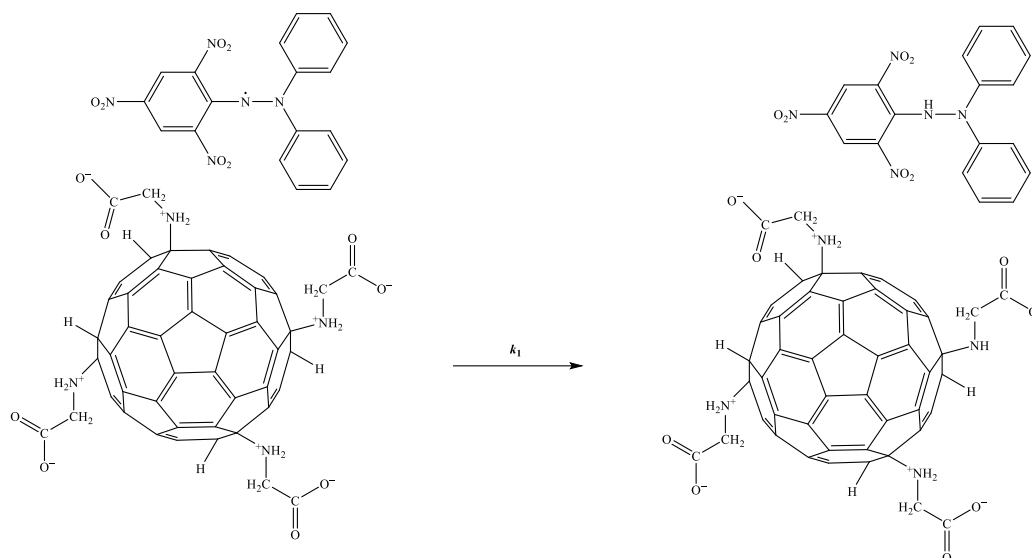
4.1.4. Антирадикальная активность

Предполагаемый механизм реакции аддуктов фуллерена C₆₀ со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) включает в себя две стадии: быстрая — передача иона водорода радикалу и медленная — нуклеофильная атака радикала π-связи фуллеренового кора (Рис. 4.4). Для количественной оценки скорости реакции между аддуктами фуллерена C₆₀ и ДФПГ была использована двухстадийная кинетическая модель реакции псевдопервого порядка [106]:

$$\ln \frac{A_{\infty} - A_t}{A_{\infty} - A_0} = -kt \quad (25),$$

где A_{∞} , A_t и A_0 — оптические плотности раствора спустя «бесконечность» (через семь дней после начала эксперимента), в момент времени t и в начальный момент времени, соответственно. Для примера на Рис. 4.4 представлена кинетическая зависимость на реакции восстановления ДФПГ аддуктом фуллерена C₆₀-Gly.

(а)



(б)

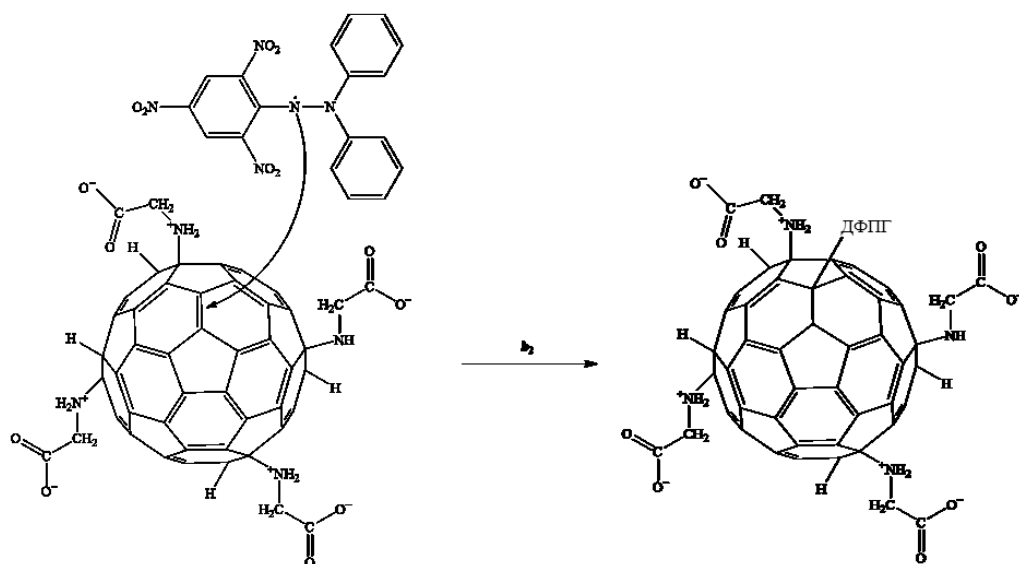
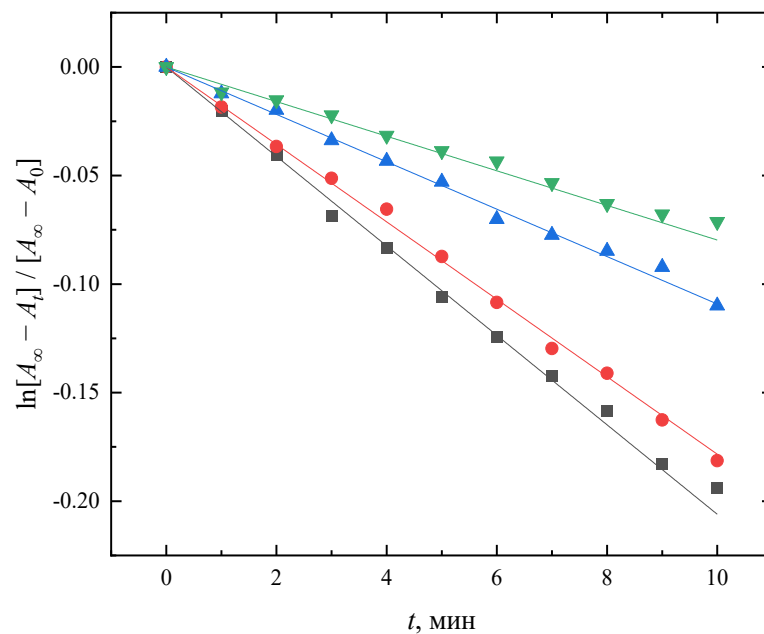


Рис. 4.4. Предполагаемый механизм взаимодействия аддукта C₆₀-Gly с ДФПГ. Перенос водорода от карбоксильной группы аминокислотного остатка к радикалу ДФПГ (быстрая стадия) — (а); нуклеофильная атака радикала С=С-связи фуллерена (медленная стадия) — (б). k_1 и k_2 — кажущихся константы скоростей реакций быстрой и медленной стадий, соответственно.

(a)



(б)

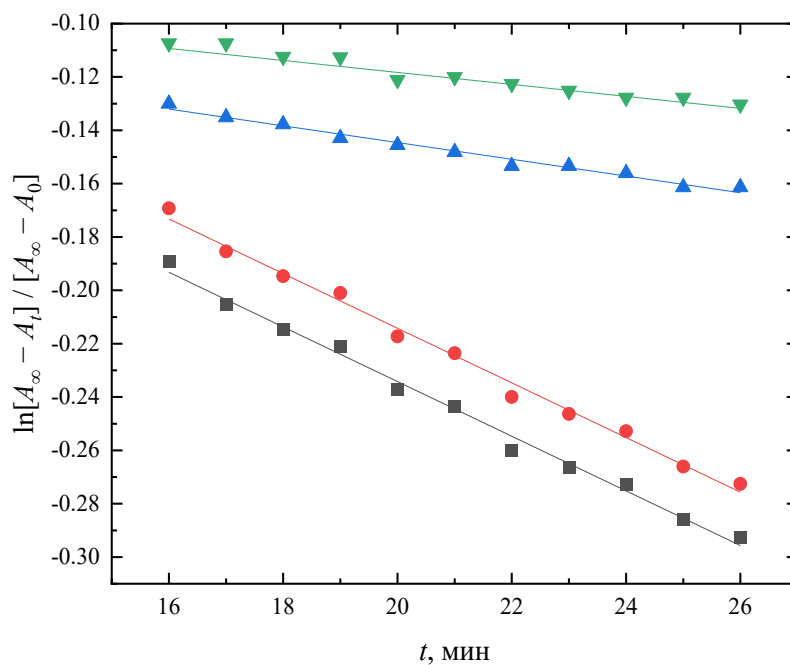


Рис. 2.5. Кинетическая зависимость реакции восстановления ДФПГ аддуктом C_{60} -Gly в температурном диапазоне 303.15–318.15K: для первой стадии — (a); для второй стадии

— (б). 303.15 К — серая линия, 308.15 К — красная линия, 313.15 К — синяя линия, 318.15 К — зелёная линия.

Из тангенсов угла наклона двух участков кинетических кривых были получены значения кажущихся констант скорости при различных температурах (Табл. 4.3).

Табл. 4.1. Значения кажущихся констант скорости восстановления ДФПГ аддуктами фуллерена C_{60} при 25 °С.

Аддукт	$k_1 \cdot 10^{-3}, \text{мин}^{-1}$	$k_2 \cdot 10^{-3}, \text{мин}^{-1}$
C_{60} -Gly	3.52 ± 0.28	1.12 ± 0.03
C_{60} -Нур	8.35 ± 0.15	1.31 ± 0.04
C_{60} -Met	3.01 ± 0.13	1.12 ± 0.04
C_{60} -Cys	9.31 ± 0.11	1.05 ± 0.13

Также были рассчитаны значения антиоксидантной эффективности (AE) по формуле:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T_{EC_{50}}} \quad (26),$$

где EC_{50} — концентрация антиоксиданта, необходимая для восстановления 50 % радикалов ДФПГ, $T_{EC_{50}}$ — время, через которое происходит восстановление 50 % радикалов ДФПГ. Антиоксидантную эффективность аддуктов фуллерена C_{60} сравнивали с известным промышленным антиоксидантом — ионолом. Величина AE для ионола составляет 5.82, для C_{60} -Gly — 0.86, C_{60} -Нур — 0.21, C_{60} -Met — 1.86 и C_{60} -Cys — 2.45.

4.1.5. Цитотоксичность

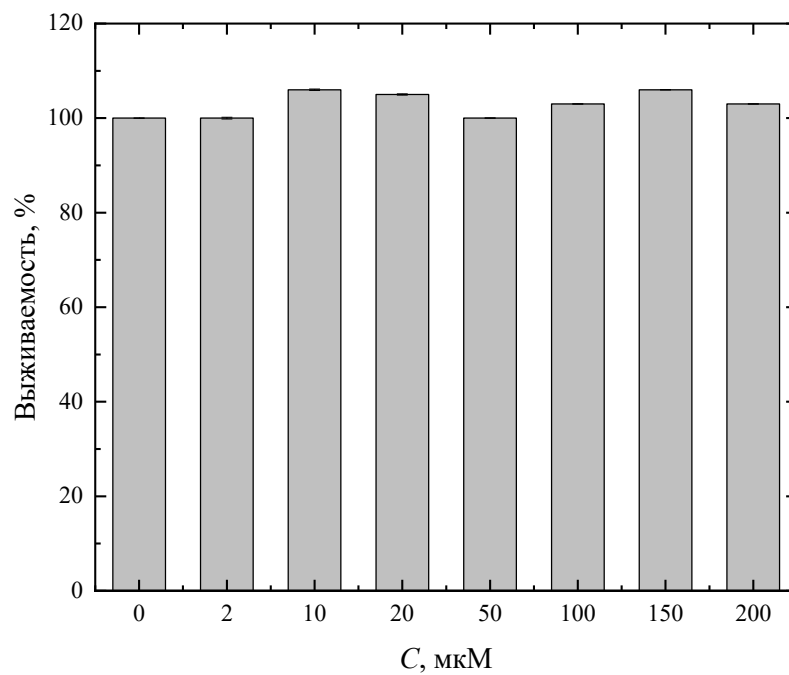
Цитотоксичность (%) аддуктов фуллерена C_{60} L-аминокислотами рассчитывали по формуле:

$$\text{Цитотоксичность} = \frac{\bar{A}(C_i)}{\bar{A}(0)} \cdot 100\% \quad (27),$$

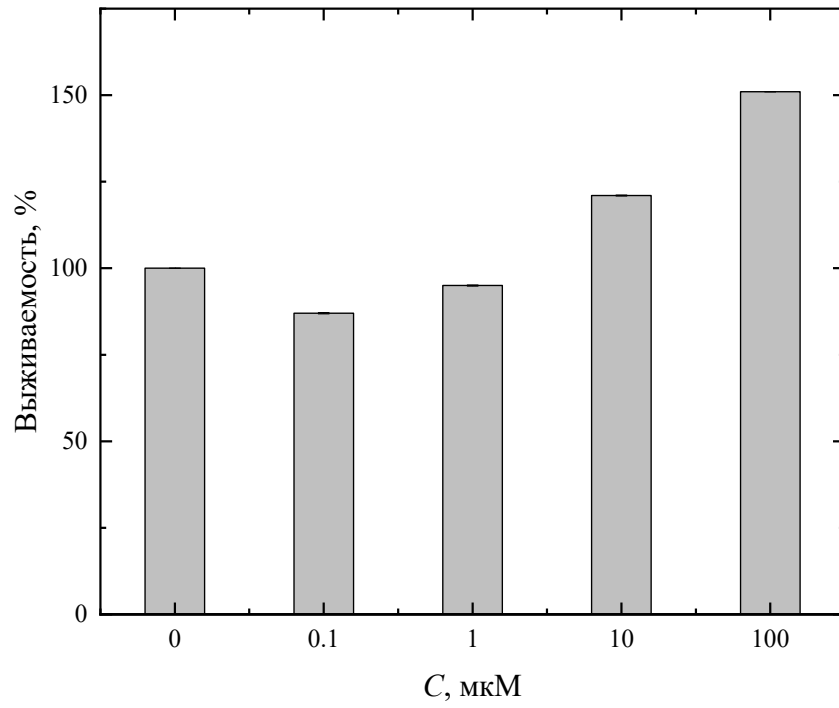
где C_i — концентрация аддуктов фуллерена C_{60} , $\bar{A}(C_i)$ — средняя оптическая плотность в опытных пробах (с добавлением i -ого производного концентрации C_i), $\bar{A}(0)$ — средняя оптическая плотность в контрольных пробах (инкубация клеток без добавления аддуктов фуллерена C_{60}). На Рис. 4.6 представлены данные по цитотоксичности аддуктов фуллерена C_{60} L-аминокислотами. Как видно из полученных данных, C_{60} -Gly, C_{60} -Нур и C_{60} -Met (Рис. 4.6а, б, в) практически не обладали цитотоксическим действием по

отношению к клеточной линии почки эмбриона человека HEK293 в изученном диапазоне концентраций, а аддукт C_{60} -Cys (Рис. 4.62) в концентрациях выше 50 мкМ оказывал цитотоксическое действие.

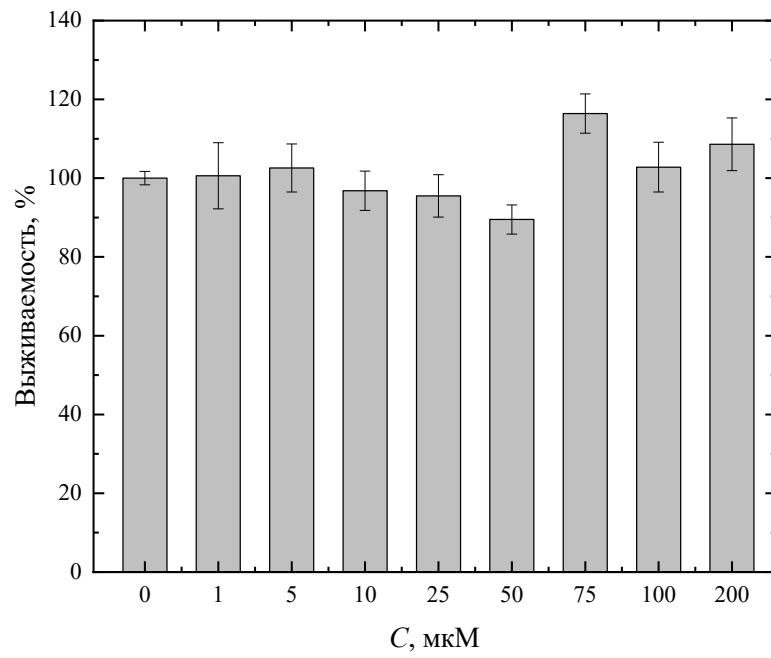
(а)



(б)



(б)



(в)

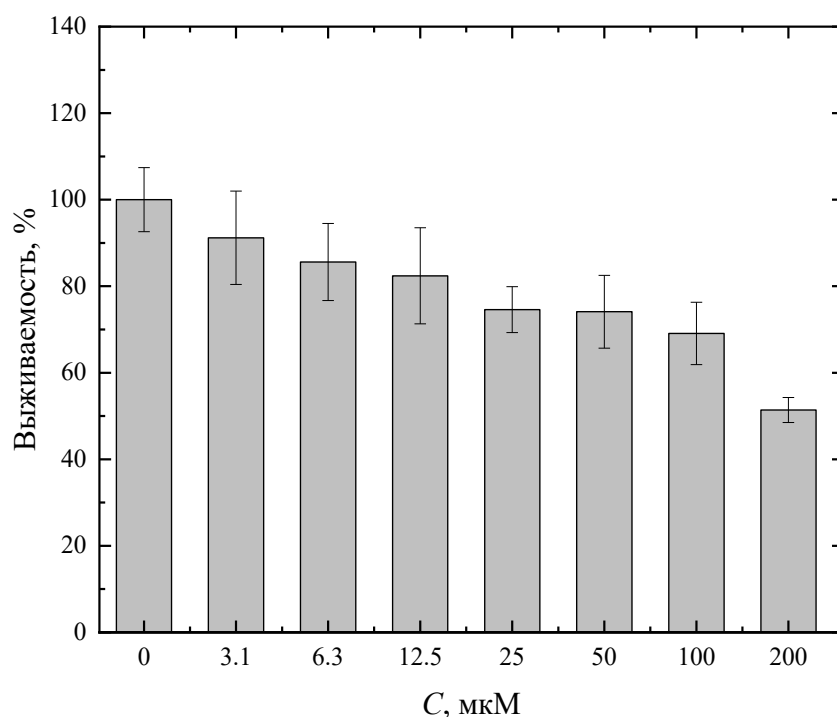


Рис. 4.6. Цитотоксичность аддуктов фуллерена C_{60} L-аминокислотами в отношении клеток линии НЕК 293: C_{60} -Gly — (а); C_{60} -Нур — (б); C_{60} -Met — (в); C_{60} -Cys — (г).

4.1.6. Взаимодействие C_{60} -Met с коллагеном

На Рис. 4.7 представлены спектры эмиссии коллагена в буфере Дульбекко в отсутствии и в присутствии C_{60} -Met. Тушение флуоресценции может иметь различные механизмы: выделяют динамическое и статическое тушение, которые имеют различную зависимость от температуры. Увеличение температуры вызывает ускорение диффузии и увеличение количества столкновений тушителя с флуорофором, что обычно приводит к диссоциации малоустойчивых комплексов. Константа тушения возрастает с повышением температуры для динамического тушения и уменьшается для статического.

Для анализа данных нами было использовано уравнение Штерна — Вольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}Q \quad (28),$$

где F_0 и F — интенсивности флуоресценции в отсутствии и присутствии тушителя, K_{sv} — константа тушения Штерна — Вольмера, Q — концентрация тушителя. Для определения констант тушения были построены зависимости в координатах F_0 / F от Q (Рис. 4.8) при изученных температурах.

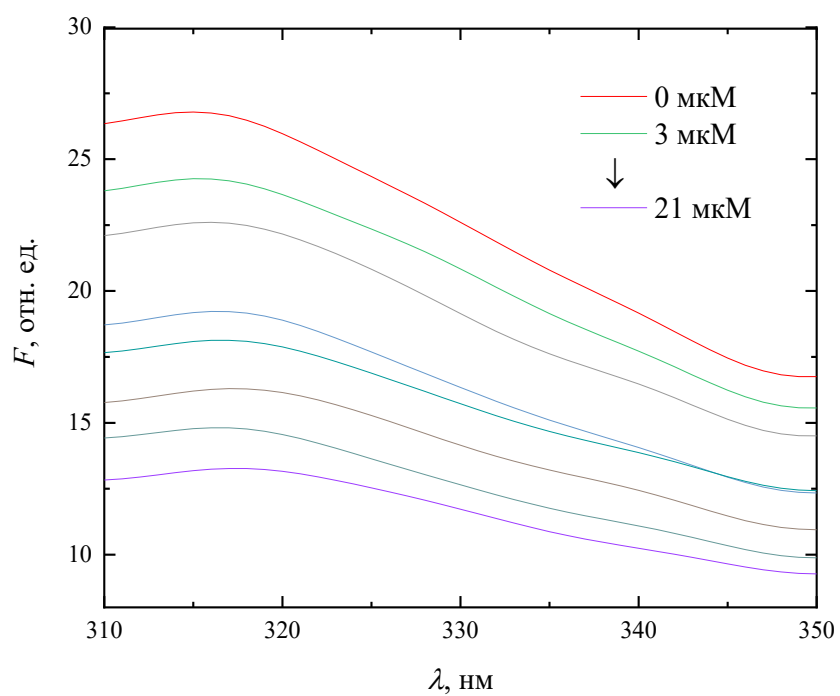


Рис. 4.7. Спектры флуоресценции 3 μM раствора коллагена в отсутствие и присутствии аддукта C_{60} -Met ($C = 0$ –21 μM).

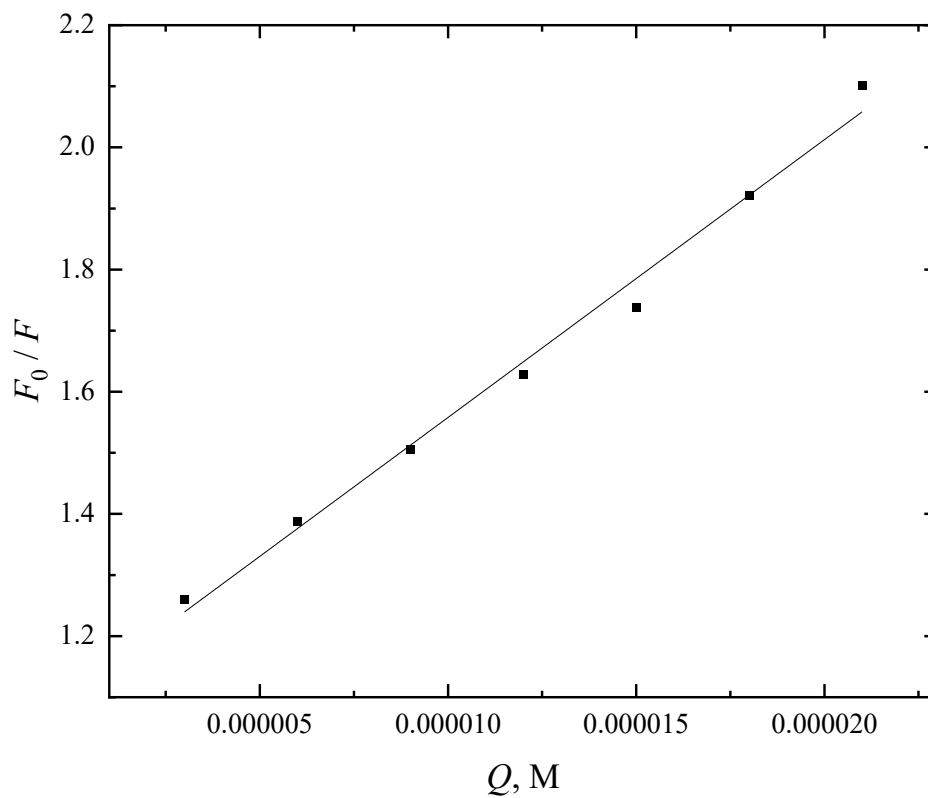


Рис. 4.8. Зависимость Штерна — Вольмера процесса тушения флуоресценции коллагена производным С₆₀-Мет при 298.15 К.

Далее для определения константы связывания (K_b) и числа сайтов связывания (n) С₆₀-Мет с коллагеном было использовано уравнение Скэтчарда:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg Q \quad (29),$$

Из графиков в координатах $\lg[(F_0 - F) / F]$ от $\lg Q$ были получены значения K_b и n (Табл. 4.4).

Предполагая, что в исследуемом температурном диапазоне изменения энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) не зависят от температуры, данные значения можно определить из уравнения Вант-Гоффа:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (30).$$

Изменения энергии Гиббса (ΔG) реакции связывания при различных температурах были рассчитаны по формуле:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (31).$$

Результаты расчётов приведены в Табл. 4.5.

Табл. 4.4. Значения констант тушения Штерна — Вольмера (K_{SV}), констант связывания (K_b) и числа сайтов связывания (n) С₆₀-Мет с коллагеном в температурном диапазоне температурах 298.15–318.15 К.

T, K	$K_{SV} \cdot 10^4, M^{-1}$	$K_b \cdot 10^5, M^{-1}$	n
298.15	6.29 ± 0.29	1.1 ± 0.09	1.3 ± 0.07
303.15	6.34 ± 0.33	1.1 ± 0.11	1.3 ± 0.11
308.15	7.14 ± 0.15	1.3 ± 0.06	1.5 ± 0.10
313.15	7.51 ± 0.33	1.3 ± 0.11	1.5 ± 0.11
318.15	7.55 ± 0.15	1.3 ± 0.06	1.5 ± 0.06

Табл. 4.5. Термодинамические параметры связывания аддукта С₆₀-Мет с коллагеном.

T, K	$-\Delta G, \text{кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$	$-\Delta H, \text{кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$	$-\Delta S, \text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$
298.15	27 ± 7	89 ± 8	392 ± 24
303.15	29 ± 7		
308.15	30 ± 7		
313.15	32 ± 7		

318.15	34 ± 7
--------	------------

Для установления механизма взаимодействия применяются термодинамические параметры, а именно: изменения энтальпии, энтропии и энергии Гиббса. Полученные отрицательные значения ΔG в интервале температур $T = 298.15\text{--}318.15$ К свидетельствуют о том, что взаимодействие аддукта C₆₀-Met с коллагеном является термодинамически выгодным. Отрицательные значения ΔH и ΔS являются типичными при образовании водородных связей, поэтому можно предположить, что образование комплекса с C₆₀-Met с коллагеном происходит за счёт аминокислотных остатков C₆₀-Met.

4.1.7. Протекторный эффект C₆₀-Met

На Рис. 4.9 представлены спектры эмиссии водных растворов коллагена до и после облучения УФ-светом. Видно, что при увеличении времени облучения уменьшается интенсивность флуоресценции. Это связано с двумя эффектами: фотосшиванием и фотодеградацией коллагена. Фотосшивание обуславливает конформационный переход молекулы коллагена (спираль–клубок), что приводит к уменьшению эмиссии за счёт экранирования триптофановых остатков. Фотодеградация приводит к уменьшению концентрации коллагена, что сопровождается изменением спектра флуоресценции. Оба эти эффекта в литературе связывают с образованием активных форм кислорода при УФ-облучении, поэтому вещества, проявляющие антирадикальную активность, способны также проявлять фотопротекторные свойства [210].

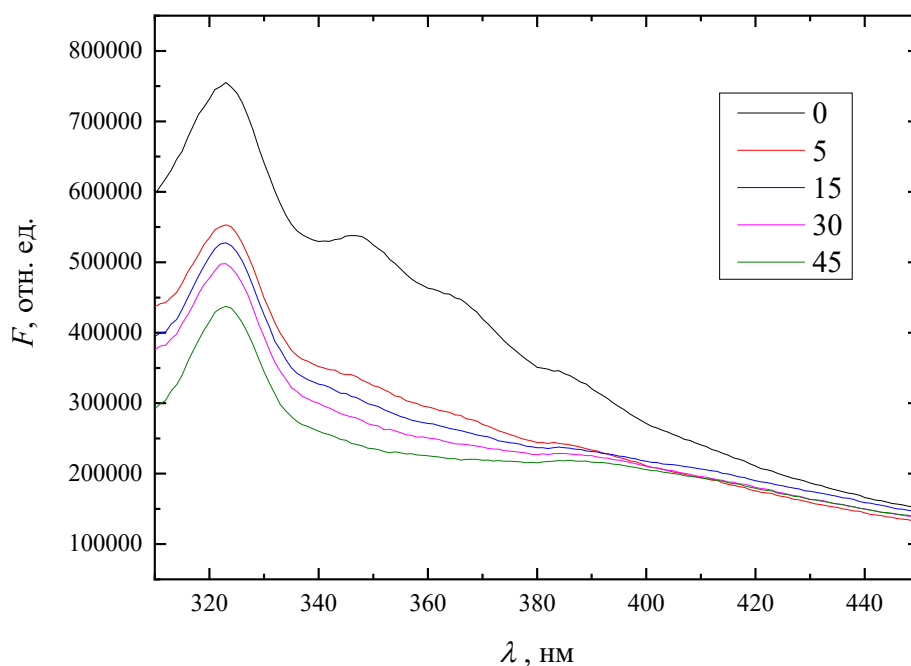


Рис. 4.9. Спектры эмиссии водных растворов коллагена при возбуждении при длине волны 290 нм до и после облучения УФ-светом во временном интервале 0–45 мин.

В Табл. 4.6 представлены значения интенсивности флуоресценции водных растворов коллагена в отсутствии и в присутствии C_{60} -Met ($C = 0.0015$ – 0.06 мг/мл) до и после УФ-облучения.

Табл. 4.6. Интенсивности флуоресценции $F(t)$ при длине волны 350 нм водных растворов коллагена в отсутствии и в присутствии C_{60} -Met в зависимости от времени облучения.

C , мг/мл	$F(t)$				
	0 мин	5 мин	15 мин	30 мин	45 мин
0	524573	324977	297175	268830	235446
0.0015	267671	239551	222804	218389	213152
0.003	227377	213318	206543	198558	185376
0.06	191330	184300	180291	168129	163425

Для оценки протекторного эффекта аддукта C_{60} -Met при УФ-индуцированном повреждении коллагена были рассчитаны изменения интенсивности флуоресценции до и после облучения ($\Delta F = F_0 - F_t$), характеризующие изменения флуоресценции вследствие фотосшивания и фотодеградации коллагена. Зависимость ΔF от t представлена на Рис. 4.10.

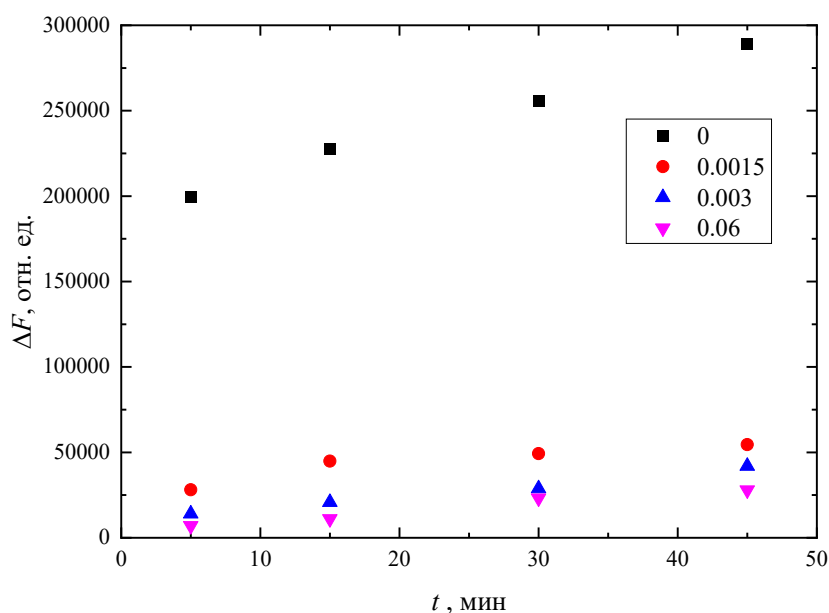


Рис. 4.10. Зависимость изменения флуоресценции водных растворов коллагена в отсутствии и в присутствии C_{60} -Met от времени облучения ($\lambda = 350$ нм).

Из Рис. 4.10 видно, что воздействие УФ-излучения на коллаген в присутствии производного C_{60} -Met приводит к дозозависимому уменьшению фотодегradации и фотосшивания коллагена. Таким образом, можно сделать вывод о высоком потенциале аддукта C_{60} -Met как основы для разработки фотозащитных наноматериалов.

4.2. Биосовместимость карбоксилированного фуллера $C_{60}[C(COOH)_2]_3$

4.2.1. Спонтанный гемолиз

Для изучения биосовместимости наночастиц $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ был проведён эксперимент по их влиянию на гемолиз. Токсичность карбоксилированного фуллера определяли путём измерения концентрации выделившегося из эритроцитов гемоглобина. Результаты расчёта степени гемолиза эритроцитов, инкубированных в присутствии $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ представлены на Рис. 4.11.

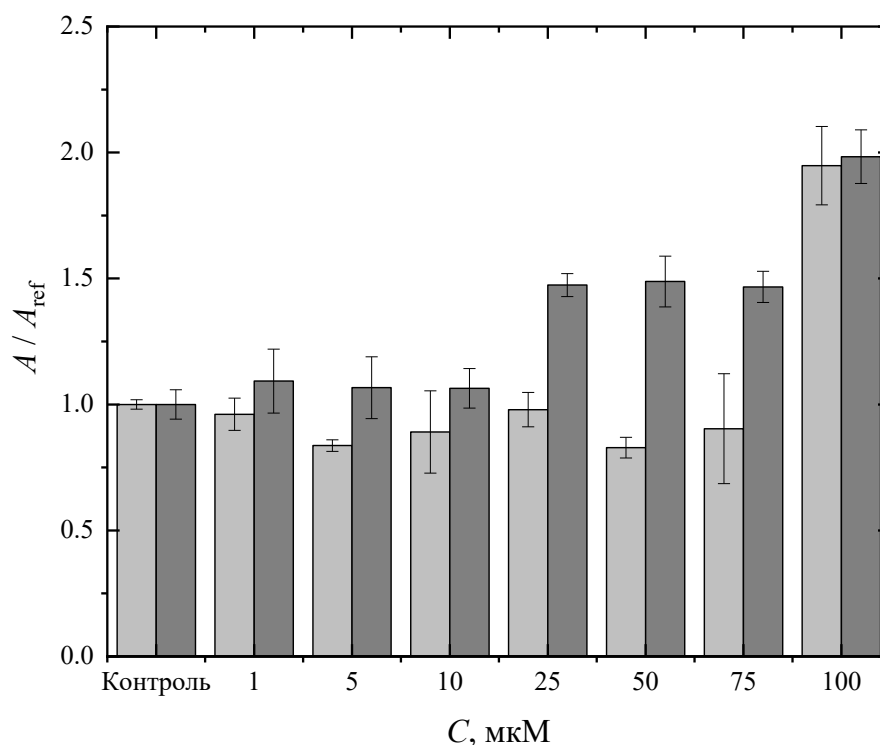


Рис. 4.11. Влияние $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ на спонтанный гемолиз после 1 ч (светло-серый) и 3 ч (тёмно-серый) инкубации.

Анализ данных показывает, что при 1 и 3 ч инкубации эритроцитов с $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ в диапазоне концентраций $C = 1-100$ мкМ наблюдается слабый гемолиз. Можно сделать вывод, что $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ является гемосовместимым материалом, гемолитическая активность зависит от времени инкубации и гемолиз при инкубации с $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ в течении 3 ч имеет дозозависимый характер.

4.2.2. Агрегация тромбоцитов

Результаты по влиянию карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ на агрегацию тромбоцитов человека в присутствии индуктора агрегации тромбоцитов (АДФ и коллагена) представлены в Табл. 4.7. В эксперименте по АДФ- и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов наблюдалось усиление агрегации в присутствии карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ в диапазоне концентраций $C = 10-100$ мкМ по сравнению с контролем. Таким образом, $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ обладает проагрегантной активностью в тестах АДФ- и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Табл. 4.7. Влияние $C_{60}[C(\text{COOH})_2]_3$ на агрегацию тромбоцитов в присутствии АДФ и коллагена.

Индуктор	Амплитуда, %			
	Концентрация $C_{60}[C(\text{COOH})_2]_3$, мкМ			
	Контроль	1.0	10.0	100.0
АДФ	57.8 ± 4.5	64.0 ± 3.5	74.6 ± 1.7	75.4 ± 1.3
Коллаген	64.2 ± 3.2	64.2 ± 3.3	75.4 ± 0.9	76.4 ± 1.5

4.2.3. Взаимодействие с ЧСА

Для изучения связывания ЧСА с $C_{60}[C(\text{COOH})_2]_3$ были получены спектры эмиссии растворов ЧСА ($C = 3$ мкМ) в буферном раствора Дульбекко в зависимости от концентрации $C_{60}[C(\text{COOH})_2]_3$ (Рис. 4.12). Наблюдаемые спектры соответствуют флуоресценции остатков триптофана в молекуле ЧСА; на это указывает наличие максимума поглощения в диапазоне длин волн $\lambda = 320\text{--}340$ нм. Видно, что молекула $C_{60}[C(\text{COOH})_2]_3$ действует как тушитель флуоресценции.

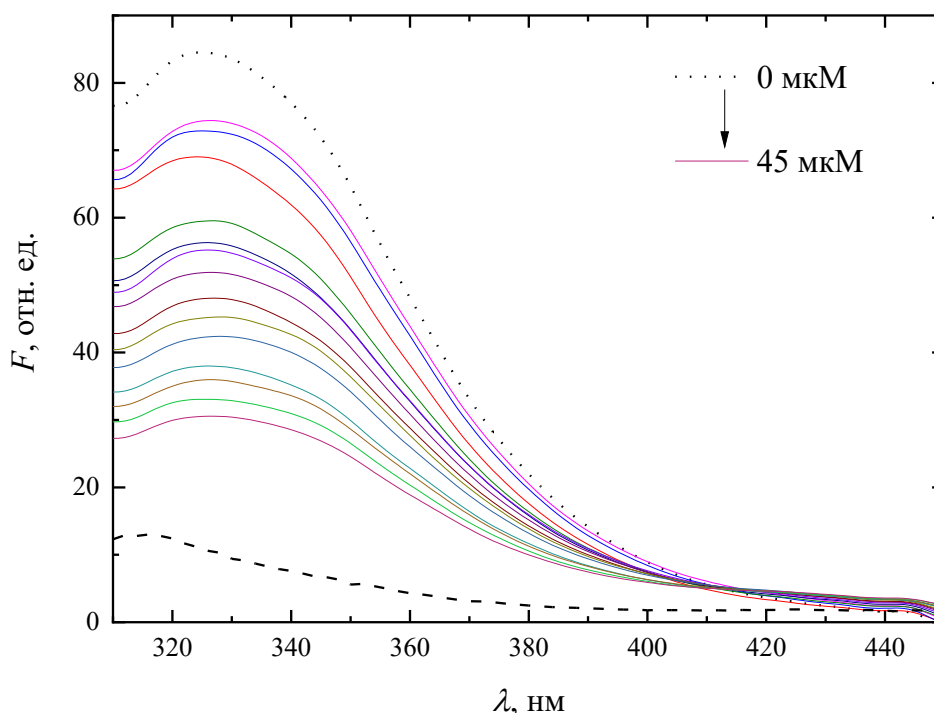


Рис. 4.12. Спектры флуоресценции ЧСА в буфере Дульбекко ($C = 3$ мкМ) при различных концентрациях $C_{60}[C(\text{COOH})_2]_3$ ($T = 298.15$ К). Пунктирная линия соответствует спектру

флуоресценции ЧСА, штриховая линия соответствует спектру флуоресценции $C_{60}[C(COOH)_2]_3$.

Для определения характера межмолекулярного взаимодействия при тушении флуоресценции использовали уравнение Штерна — Вольмера (Ур. 28).

Зависимости в координатах F_0 / F от Q для растворов ЧСА, содержащих $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ при различных температурах позволили рассчитать значения констант тушения (K_{SV}) (Рис. 4.13, Табл. 4.8).

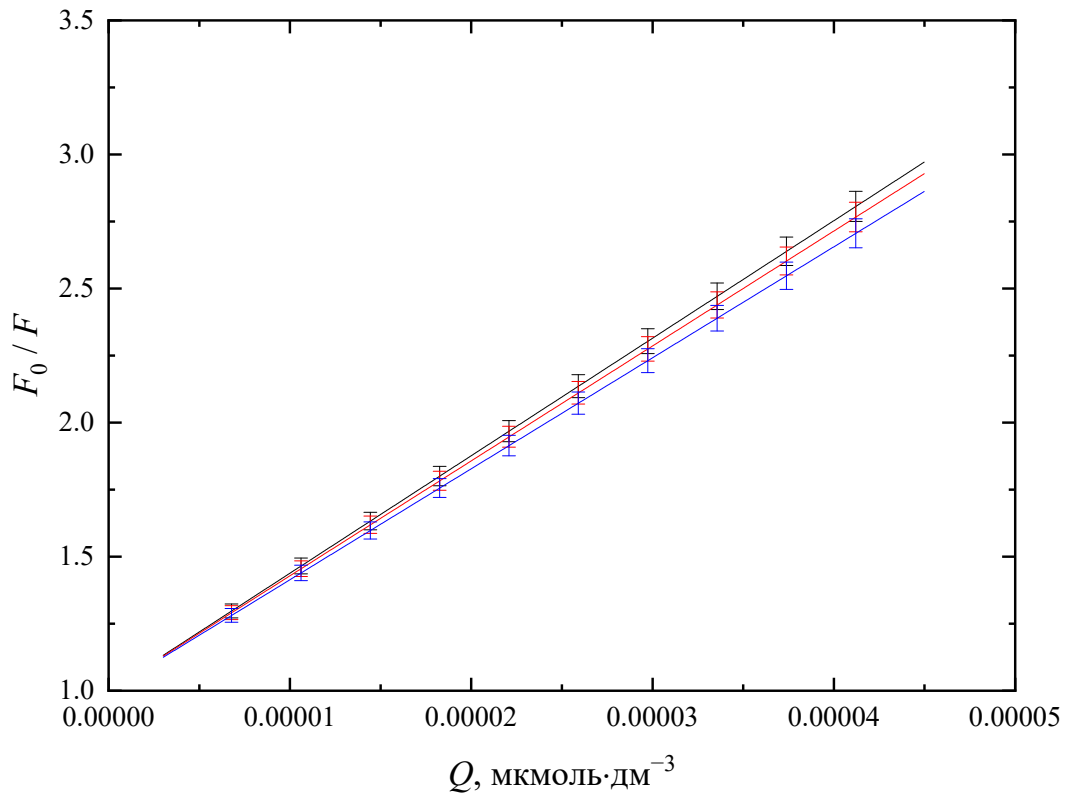


Рис. 4.13. Зависимости Штерна — Вольмера тушения флуоресценции ЧСА карбоксилированным фуллереном $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ при $T = 298.15$ К (черная линия), 303.15 К (красная линия), 308.15 К (синяя линия).

Табл. 4.8. Константы тушения (K_{SV}), константы связывания (K_b) и число сайтов связывания (n) для системы $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ –ЧСА при различных температурах.

T, K	$K_{SV} \cdot 10^4, M^{-1}$	$K_b \cdot 10^5, M^{-1}$	n
298.15	4.38 ± 0.17	1.55 ± 0.09	1.12 ± 0.06
303.15	4.29 ± 0.17	3.42 ± 0.16	1.21 ± 0.05
308.15	4.14 ± 0.18	12.01 ± 0.34	1.33 ± 0.04

Как видно из Табл. 4.8, значения константы тушения уменьшаются с ростом температуры в интервале $T = 298.15\text{--}308.15$ К, следовательно, имеет место статический механизм тушения. Значения констант связывания (K_b) и числа сайтов (n) связывания определяли с помощью уравнения Скэтчарда (Ур. 29). Полученные значения K_b и n представлены в Табл. 4.8. Константы связывания находятся в эффективном диапазоне $10^4\text{--}10^5$ М⁻¹, свидетельствующем о том, что ЧСА способен выполнять транспортную функцию в кровотоке. При меньших значениях K_b комплексы $C_{60}[C(COOH)_2]_3\text{--}ЧСА$ будут недостаточно прочными, а при больших значениях будет происходить необратимое связывание карбоксилированного фуллерена с ЧСА.

Предполагая, что в исследуемом интервале температур значения ΔH и ΔS не изменяются, для их определения использовали уравнение Вант-Гоффа (Ур. 30). Изменение энергии Гиббса (ΔG) реакции связывания $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ с ЧСА в температурном интервале $T = 298.15\text{--}308.15$ К было рассчитано с использованием Ур. 31. Результаты расчётов представлены в Табл. 4.9. Положительные значения ΔH и ΔS , представленные в Табл. 4.9, показывают, что гидрофобное взаимодействие играет ключевую роль в связывании $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ в ЧСА [214]. Отрицательные значения ΔG свидетельствуют о том, что связывание карбоксилированного фуллерена с ЧСА является термодинамически выгодным.

Табл. 4.9. Термодинамические параметры взаимодействия $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ с ЧСА.

T , К	ΔH , кДж·моль ⁻¹	ΔS , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	$-\Delta G$, кДж·моль ⁻¹
298.15			29.4 ± 5.3
303.15	156 ± 22	623 ± 72	32.5 ± 5.9
308.15			35.7 ± 6.4

4.2.4. Антиоксидантная активность

На Рис. 4.14 представлен предполагаемый механизм реакции $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ с ДФПГ. Этот процесс включает две стадии: (i) перенос водорода на радикал ДФПГ (быстрая стадия) и (ii) нуклеофильная атака ДФПГ С=C-связи (медленная стадия).

(a)

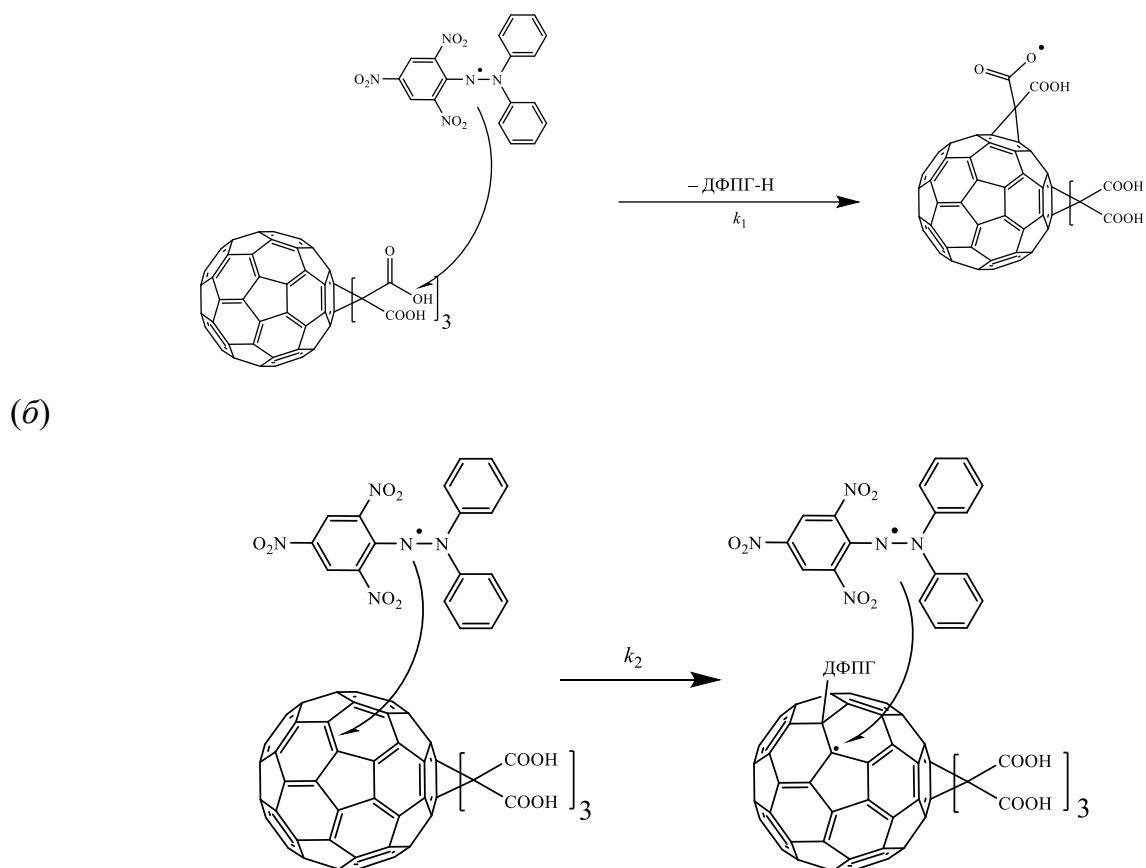


Рис. 4.14. Предполагаемый механизм реакции $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ с ДФПГ: быстрая стадия (а); медленная стадия (б).

Для определения констант скорости быстрой и медленной стадий реакции взаимодействия между карбоксилированным фуллереном $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ и ДФПГ (k_1 и k_2 , соответственно) использовалась двухстадийная кинетическая модель псевдопервого порядка [215] (Ур. 25). На Рис. 4.15 представлена кинетическая зависимость реакции восстановления ДФПГ карбоксилированным фуллереном $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ при 298.15 К.

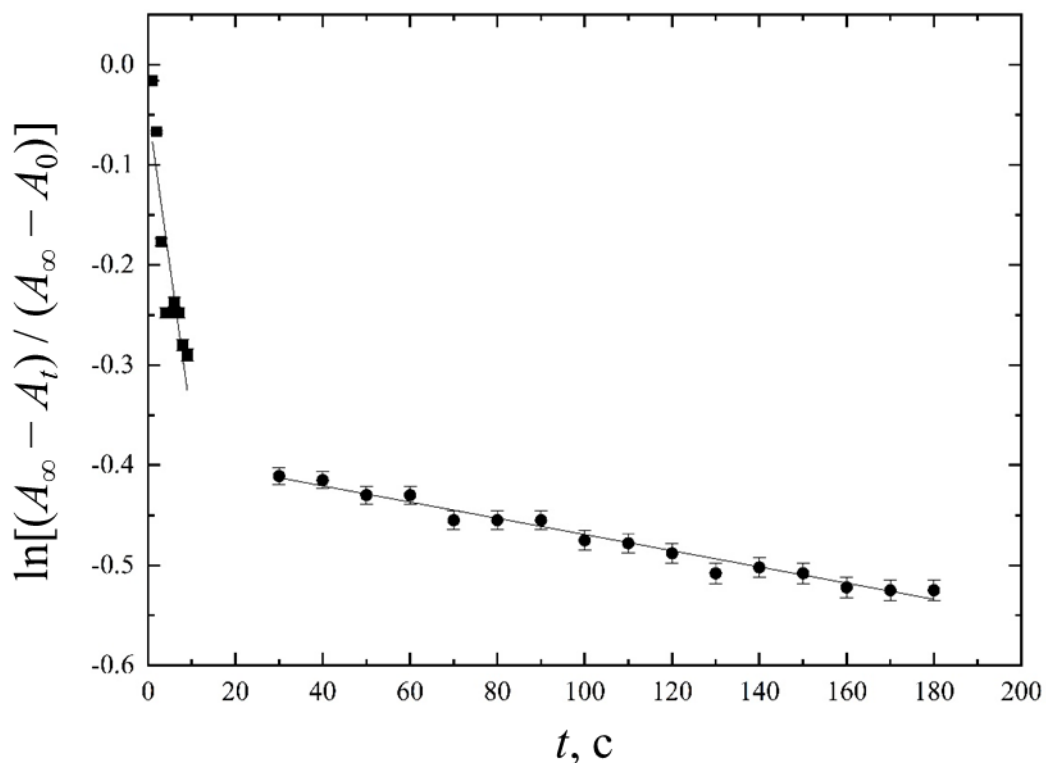


Рис. 4.15. Кинетическая зависимость реакции восстановления ДФПГ карбоксилированным фуллереном $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ при 298.15 К.

С использованием Ур. 25 для обеих стадий реакции ДФПГ с $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ были получены следующие константы скорости: $k_1 = 0.0311 \pm 0.0028 \text{ мин}^{-1}$ (быстрая стадия) и $k_2 = 0.001 \pm 0.0001 \text{ мин}^{-1}$ (лимитирующая стадия). Анализ литературы [215] показал, что в случае индивидуального фуллерена C_{60} ($C = 100 \text{ мкМ}$) константа скорости k_2 равна 0.0007 мин^{-1} , а для фуллеренола $C_{60}(OH)_{30}$ $k_1 = 0.0063 \text{ мин}^{-1}$ и $k_2 = 0.0014 \text{ мин}^{-1}$.

Долю восстановленного радикала (ДВР) рассчитывали через 1 ч по Ур. 32:

$$ДВР = \frac{(A_{ДФПГ} - A_{образец})}{A_{ДФПГ}} \cdot 100\% \quad (32),$$

где $A_{ДФПГ} = 0.302$, $A_{образец}$ — оптическая плотность растворов радикалов через час после начала измерений в отсутствие и в присутствии антиоксиданта (аскорбата натрия и $C_{60}[C(COOH)_2]_3$), соответственно.

В результате были получены следующие значения ДВР: $ДВР(C_{60}[C(COOH)_2]_3) = 24.5$, $ДВР(\text{аскорбат натрия}) = 86.8$. Полученные значения свидетельствуют о том, что карбоксилированный фуллерен $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ проявляет антиоксидантную активность, сопоставимую с аскорбатом натрия (эталонным соединением).

4.2.5. Фотовыцветание

Метод фотобличинга основан на фотодеградации фотосенсибилизатора, которая происходит в результате действия активных форм кислорода, образующихся при облучении фотосенсибилизатора. Известно, что Радахлорин действует по механизму II типа, приводящему к образованию активных форм кислорода из синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ в присутствии Радахлорина при облучении [216,217].

Фотодеградацию Радахлорина оценивали путём определения константы скорости фотодеградации k_{deg} . Константа k_{deg} может изменяться в присутствии различных соединений. Снижение k_{deg} по сравнению с контролем может свидетельствовать о наличии у исследуемого соединения антиоксидантных свойств, а увеличение k_{deg} свидетельствует о прооксидантных свойствах. В качестве эталонного соединения использовали азид натрия в концентрации $C = 500$ мкМ. Измерения спектров поглощения Радахлорина проводили в отсутствие и в присутствии $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ ($C = 10$ мкМ) и азиды натрия ($C = 500$ мкМ). Данные представлены в Табл. 4.10 и на Рис. 4.16.

Табл. 4.10. Константы фотодеградации систем, содержащих Радахлорин, $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ и NaN_3 .

Исследуемое соединение	$k_{\text{deg}} / \text{с}^{-1}$
Радахлорин	0.0205 ± 0.0018
Радахлорин + 10 мкМ $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$	0.0281 ± 0.0021
Радахлорин + 500 мкМ NaN_3	0.0015 ± 0.0004

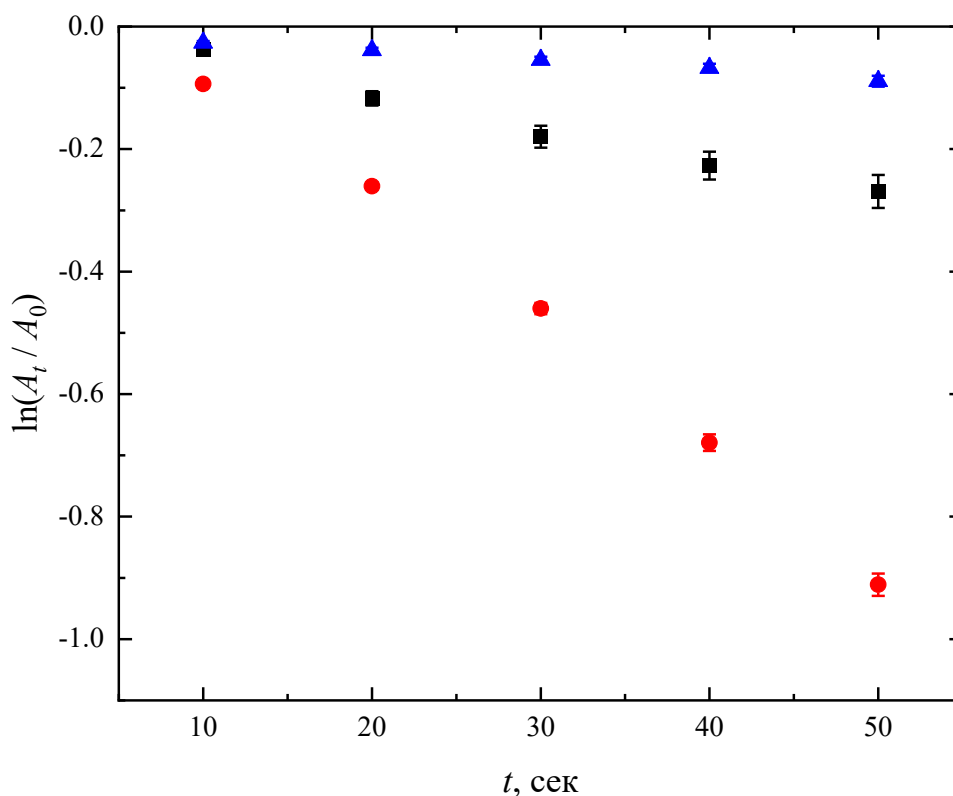


Рис. 4.16. Фотовыцветание Радахлорина (▲), а также Радахлорина в присутствии 10 мкМ $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ (●) и 500 мкМ NaN_3 (■).

Из полученных данных видно, что добавление $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ к Радахлорину приводит к увеличению скорости фотодеградаци. Таким образом, карбоксилированный фуллерен проявляет прооксидантные свойства в условиях проведения эксперимента. Можно сделать вывод о том, что карбоксилированный фуллерен является прооксидантом при облучении, а в модельной реакции с ДФПГ (в отсутствии облучения) является антиоксидантом. Перспективность проведённых исследований связана с потенциалом использования карбоксилированного фуллерена в фотодинамической терапии различных заболеваний.

4.2.6. Цитотоксичность

Метод МТТ использовали для определения цитотоксичности $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ на клеточной линии НЕК293. Из Рис. 4.17 видно, что инкубация клеток НЕК293 с карбоксилированным фуллереном в диапазоне концентраций $C = 0.1-10$ мкМ не вызывает токсического действия, в свою очередь, дальнейшее увеличение концентрации до 1000 мкМ приводит к уменьшению выживаемости клеток в пять раз по сравнению с контролем.

Можно предположить, что данный факт обусловлен агрегацией карбоксилированного фуллерена при увеличении концентрации.

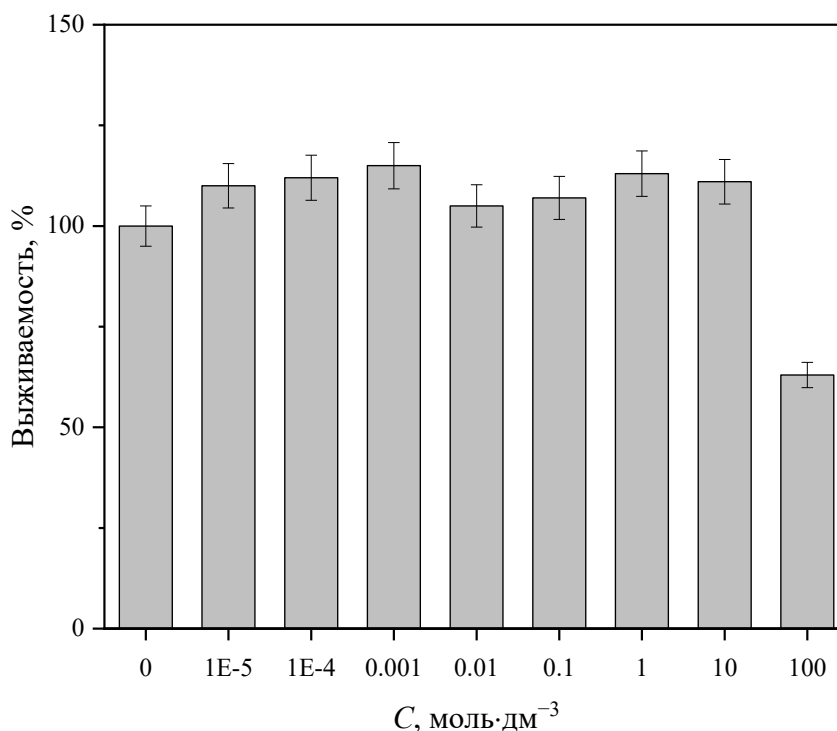


Рис. 4.17. Зависимость выживаемости клеток линии НЕК293 от концентрации $C_{60}[C(COOH)_2]_3$.

4.2.7. Генотоксичность

Токсичное действие $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ на ДНК изучали на моноцитах периферической крови человека (МПКЧ). Средние значения процентного содержания ДНК в хвосте кометы (% ДНК), длины хвоста и момента хвоста комет, полученных из МПКЧ и инкубированных в присутствии H_2O_2 (положительный контроль), а также $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ представлены в Табл. 4.11.

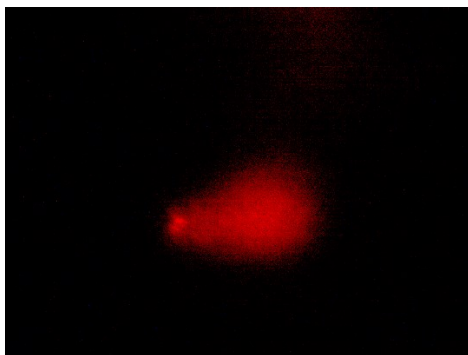
Табл. 4.11. Влияние $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ на процентного содержания ДНК в хвосте кометы, длину хвоста и момент хвоста комет.

		$C(H_2O_2)$, мкМ		$C(C_{60}[C(COOH)_2]_3)$, мкМ		
Характеристика	Отрицательный контроль	100.0	10.0	50.0	75.0	100.0
	Положительный контроль	100.0	10.0	50.0	75.0	100.0

% ДНК	54.6 ± 2.9	89.1 ± 6.7	52.3 ± 3.9	58.3 ± 4.3	56.1 ± 4.8	55.7 ± 4.3
Длина хвоста	20.3 ± 3.1	492.8 ± 20.6	19.8 ± 2.8	25.6 ± 2.4	22.8 ± 3.4	23.3 ± 3.6
Момент хвоста	11.1 ± 0.1	439.1 ± 1.4	10.4 ± 0.1	14.9 ± 0.1	12.8 ± 0.2	11.3 ± 0.2

Повреждение ДНК МПКЧ человека в присутствии H_2O_2 значительно выше, чем у контрольных клеток. Однако $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ в изученном диапазоне концентраций ($C = 10\text{--}100$ мкМ) не вызывал повреждений ДНК МПКЧ (Рис. 4.18) и, следовательно, не оказывал генотоксического действия.

(а)



(б)



(в)



Рис. 4.18. ДНК-кометы после электрофореза МПКЧ в микрогеле: положительный контроль ($C(\text{H}_2\text{O}_2) = 100 \text{ мкМ}$) — (а), отрицательный контроль — (б), карбоксилированный фуллерен ($C(\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3) = 100 \text{ мкМ}$) — (в).

4.3. Биосовместимость полигидроксилированного фуллерена $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$

4.3.1. Спонтанный гемолиз

На Рис. 4.19 показано, что $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ при инкубации в течение 1 и 3 ч вызывает слабый гемолиз во всем диапазоне концентраций ($C = 10\text{--}100 \text{ мкМ}$); степень гемолиза зависит от дозы и времени. Таким образом, фуллеренол $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ можно отнести к негемолитическим материалам, так как степень гемолиза не превышает 5 % [218].

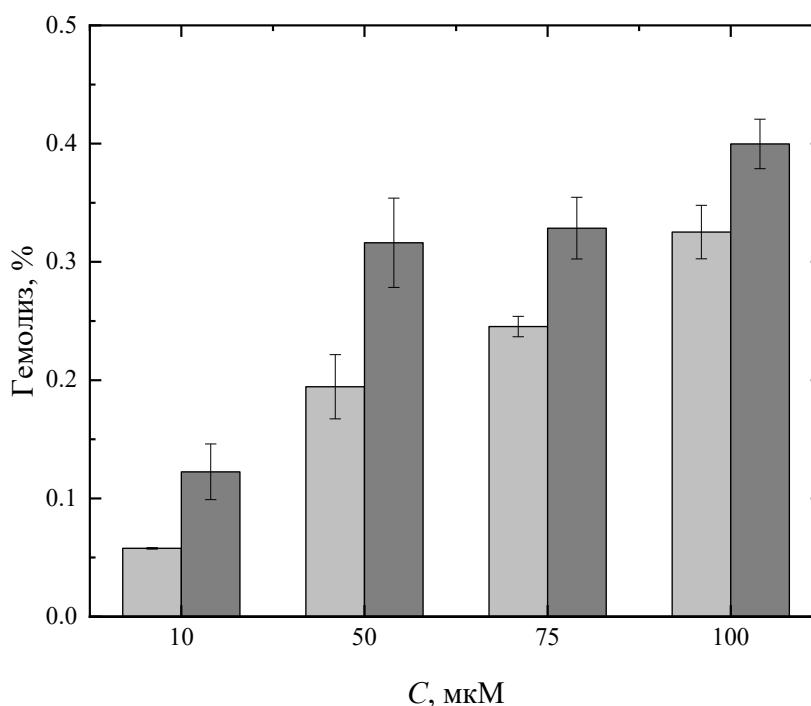


Рис. 4.19. Влияние $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ на степень гемолиза эритроцитов через 1 ч (светло-серый) и 3 ч (тёмно-серый) инкубации.

4.3.2. Агрегация тромбоцитов

В Табл. 4.12 показаны результаты измерения влияния $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ на агрегацию тромбоцитов человека в присутствии АДФ (индуктора агрегации тромбоцитов). Можно сделать вывод, что $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ в диапазоне концентраций $C = 10\text{--}50 \text{ мкМ}$ не влияет на агрегацию тромбоцитов; дальнейшее увеличение концентрации $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ приводит к снижению агрегации по сравнению с контролем. Таким образом, $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ обладает

антиагрегантной активностью при $C > 50$ мкМ в тестах на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Табл. 4.12. Влияние $C_{60}(\text{OH})_{24}$ на агрегацию тромбоцитов в присутствии АДФ.

Контроль	Амплитуда / %			
	Концентрация $C_{60}(\text{OH})_{24}$ / мкМ			
	10	50	75	100
83.4 ± 7.32	77.50 ± 4.16	76.57 ± 5.28	56.87 ± 5.28	59.5 ± 5.91

4.3.3. Плазмо-коагуляционный гемостаз

Как видно из данных, представленных в Табл. 4.13, $C_{60}(\text{OH})_{24}$ в концентрациях 50–100 мкМ приводит к статистически значимому увеличению РТ и ТТ в крови здоровых доноров по сравнению с контролем. Увеличение аРТТ наблюдается при всех исследованных концентрациях фуллеренола. Таким образом, $C_{60}(\text{OH})_{24}$ проявляет выраженные антикоагулянтные свойства в исследованном диапазоне концентраций ($C = 10$ – 100 мкМ).

Табл. 4.13. Показатели коагуляционного гемостаза после добавления $C_{60}(\text{OH})_{24}$ в плазму человека.

Тест	Норма	Контроль	C , мкМ			
			10	50	75	100
			Время коагуляции, с			
ТТ, с	15–19	17.1 ± 1.6	16.2 ± 1.3	$40 \pm 1.2^*$	$42.6 \pm 1.8^*$	>120.0
аРТТ, с	28–40	36.5 ± 1.9	$46.3 \pm 0.9^*$	$65.2 \pm 0.8^*$	$66.8 \pm 0.7^*$	$68.4 \pm 1.6^*$
РТ, с	13–18	13.6 ± 1.8	15.0 ± 1.0	$16.5 \pm 1.3^*$	$21.2 \pm 1.5^*$	$20.1 \pm 1.2^*$

* $p < 0.05$ относительно контроля.

4.3.4. Взаимодействие с ЧСА

ЧСА имеет три основных сайта связывания лигандов: (i) сайт I, расположенный в субдомене ПА (сайт связывания варфарина); (ii) сайт II, расположенный в субдомене ША (сайт связывания ибупрофена); (iii) сайт III, расположенный в субдомене ИВ (сайт связывания дигитонина). Для выявления сайтов связывания $C_{60}(\text{OH})_{24}$ с ЧСА были проведены эксперименты по конкурентному связыванию в присутствии маркеров сайтов связывания и использованы зависимости в координатах Хилла ($\lg \frac{F_0 - F}{F}$ от $\lg Q$, где F_0 — интенсивность флуоресценции ЧСА в отсутствие $C_{60}(\text{OH})_{24}$, F — интенсивность

флуоресценции ЧСА в присутствии $C_{60}(OH)_{24}$, Q — концентрация $C_{60}(OH)_{24}$, М). На Рис. 4.20 представлена зависимость в координатах Хилла процесса связывания $C_{60}(OH)_{24}$ с ЧСА отсутствие маркеров сайтов связывания при $T = 298.15$ К. Видно, что наблюдается одна точка перегиба, соответствующая наличию двух различных сайтов связывания [219].

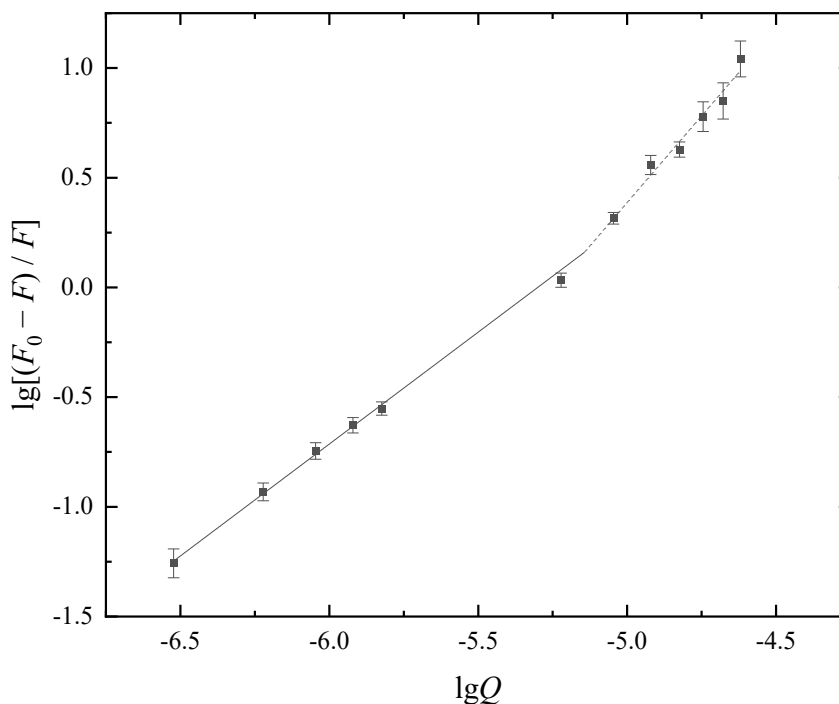


Рис. 4.20. Зависимость в координатах Хилла процесса связывания $C_{60}(OH)_{24}$ с ЧСА отсутствие маркеров сайтов связывания ($T = 298.15$ К).

Для определения констант связывания (K_b) и стехиометрических коэффициентов процесса связывания (n) было использовано Ур. 29 (Табл. 4.14). Из полученных данных видно, что: (i) значения lgK_b и n не изменяются на обоих участках при добавлении варфарина; (ii) на первом концентрационном участке ($C = 0.3 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-6}$ М) наблюдается уменьшение lgK_b и n при добавлении дигитонина; (iii) на втором концентрационном участке ($C = 6.0 \cdot 10^{-6} - 24.0 \cdot 10^{-6}$ М) наблюдается уменьшение lgK_b и n при добавлении ибупрофена. Исходя из значений констант связывания ($2.51 \pm 0.09 \cdot 10^5$ М⁻¹ для первого концентрационного участка и $7.9 \pm 0.5 \cdot 10^2$ М⁻¹ — для второго), можно сделать вывод о том, что фуллеренол образует прочный комплекс с ЧСА в субдомене IB и слабо связывается с субдоменом IIIA.

Табл. 4.14. Значения констант связывания и числа сайтов связывания $C_{60}(\text{OH})_{24}$ с ЧСА при $T = 298.15 \text{ К}$.

Маркер сайта	$C = 0.3 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$		$C = 6.0 \cdot 10^{-6} - 24.0 \cdot 10^{-6} \text{ М}$	
	$\lg K_b, \text{ М}^{-1}$	n	$\lg K_b, \text{ М}^{-1}$	n
Без маркеров	5.4 ± 0.2	1.02 ± 0.03	2.9 ± 0.2	0.56 ± 0.03
Варфарин	5.2 ± 0.2	0.97 ± 0.03	3.3 ± 0.2	0.61 ± 0.04
Ибупрофен	5.1 ± 0.2	0.95 ± 0.04	1.0 ± 0.1	0.15 ± 0.02
Дигитонин	4.5 ± 0.3	0.88 ± 0.05	3.0 ± 0.3	0.52 ± 0.04

4.3.5. Фотовыцветание

Деградацию фотосенсибилизатора оценивали путём измерения констант скорости фотодеградации, значения которых определяли как наклон кинетических кривых в координатах $\ln(A_t / A_0) - t$. В качестве вещества сравнения использовался раствор NaN_3 ($C = 500 \text{ мкМ}$), который является антиоксидантом. На Рис. 4.21 приведены спектры поглощения Радахлорина в присутствии $C_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 2.5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) при облучении (10–50 с) и без облучения.

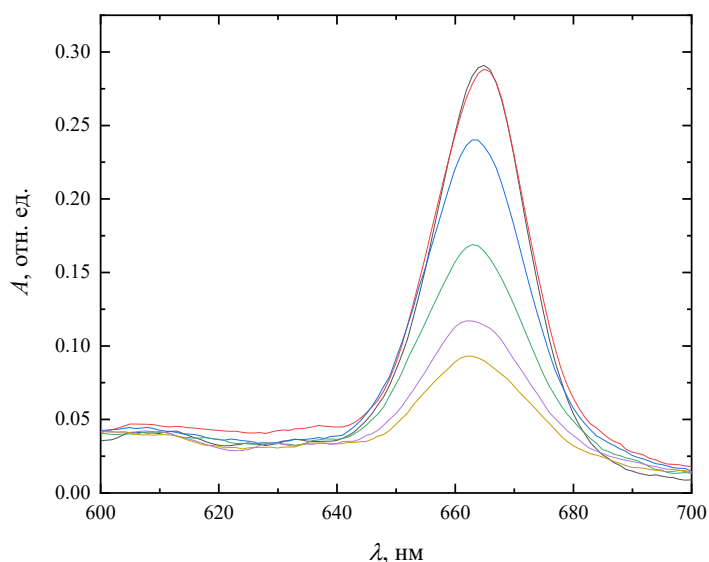


Рис. 4.21. Спектры поглощения Радахлорина + $C_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 2.5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) без облучения (—) и после облучения (— 10 с, — 20 с, — 30 с, — 40 с, — 50 с).

Далее из полученных электронных спектров строили зависимости в координатах $\ln(A_t / A_0) - t$ и вычисляли k_{deg} (Рис. 4.22 и Табл. 4.15). Видно, что добавление $C_{60}(\text{OH})_{24}$ к

Радахлорину приводит к снижению k_{deg} . Таким образом, можно констатировать, что $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ проявляет дозозависимые антиоксидантные свойства при облучении.

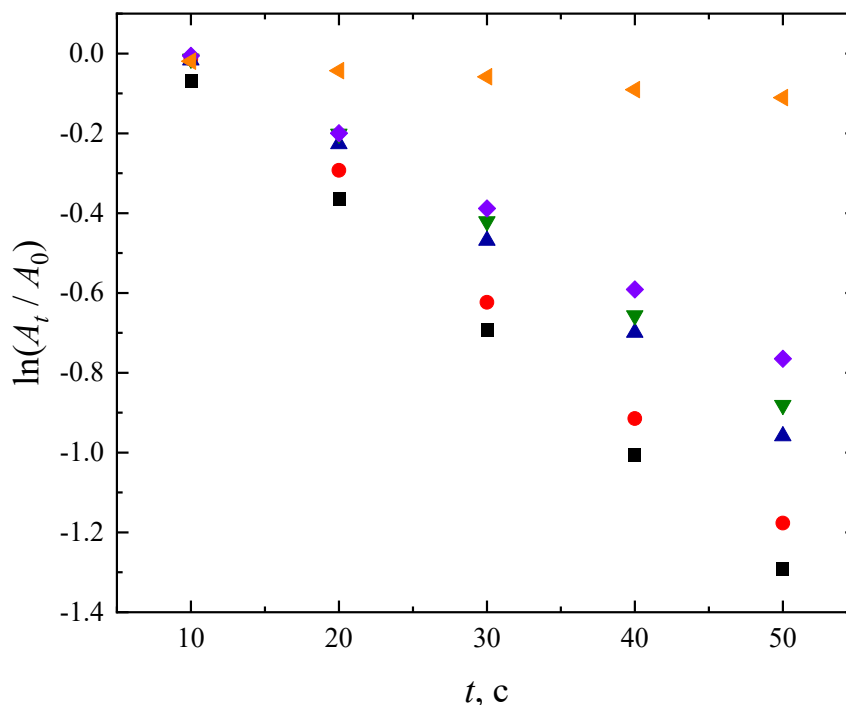


Рис. 4.22. Кинетическая зависимость фотовыцветания Радахлорина в присутствии $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ (● 10 мкМ, ▲ 50 мкМ, ▼ 75 мкМ, ◆ 100 мкМ) и NaN_3 (◄ 500 мкМ). A_t и A_0 оптические плотности растворов Радахлорина при 659 нм до и после облучения.

Табл. 4.15. Значения констант фотобликинга Радахлорина в присутствии NaN_3 и $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$.

Исследуемое соединение	C , мкМ	k_{deg} , c^{-1}
—	—	0.0308 ± 0.0004
$\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$	10	0.0295 ± 0.0006
	50	0.0235 ± 0.0005
	75	0.0219 ± 0.0005
	100	0.0191 ± 0.0002
NaN_3	500	0.0023 ± 0.0001

4.3.6. Взаимодействие с ДНК

На Рис. 4.23 представлены спектры флуоресценции ДНК в отсутствие и в присутствии $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ при 298.15 К.

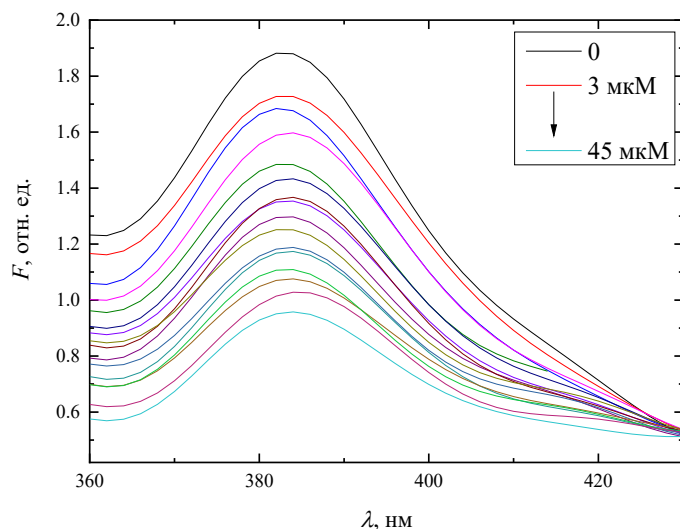


Рис. 4.23. Спектры флуоресценции ДНК в отсутствие и присутствии $C_{60}(OH)_{24}$ ($C = 3\text{--}45$ мкМ) при $T = 303.15$ К.

Для определения констант связывания (K_b), а также стехиометрии реакции связывания (n) использовали Ур. 29. На Рис. 4.24 приведён пример зависимости процесса связывания $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК в координатах Хилла при $T = 303.15$ К.

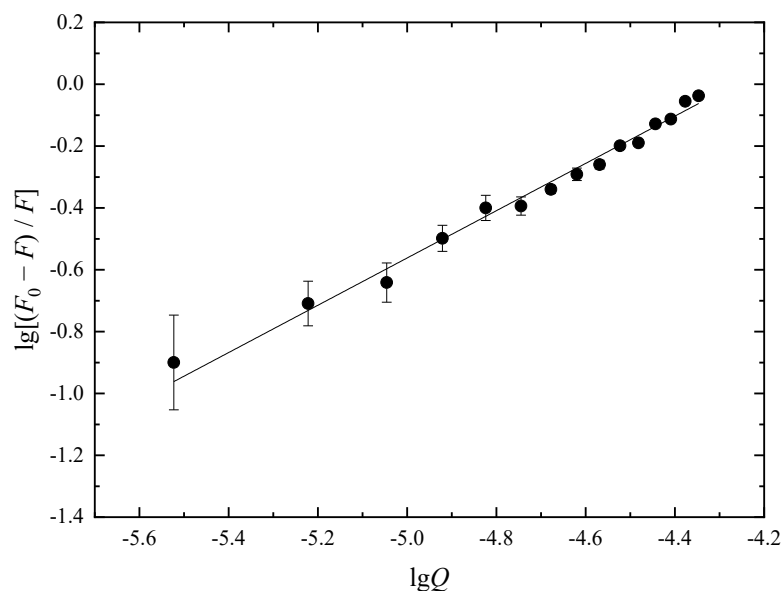


Рис. 4.24. Зависимость в координатах Хилла процесса связывания $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК при 303.15 К.

Рассчитанные значения K_b и n представлены в Табл. 4.16. Порядок полученных значений K_b в интервале температур $T = 303.15\text{--}318.15$ К ($10^3\text{--}10^4$ М $^{-1}$) указывает на

образование прочных комплексов $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК. Изменение энтальпии и энтропии реакции связывания $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК рассчитывали по уравнению Вант-Гоффа без учёта влияния температуры (Табл. 4.16).

Табл. 4.16. Термодинамические параметры реакции связывания $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК в интервале $T = 303.15\text{--}318.15$ К.

T, K	n	$K_b \cdot 10^3, \text{M}^{-1}$	$\Delta G, \text{кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$	$\Delta H, \text{кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$	$\Delta S, \text{Дж} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$
303.15	0.76 ± 0.04	1.8 ± 0.1	-19.0 ± 3.2	115 ± 15	443 ± 46
308.15	0.86 ± 0.04	4.8 ± 0.3	-21.3 ± 3.5		
313.15	0.89 ± 0.03	6.7 ± 0.3	-23.5 ± 3.9		
318.15	0.98 ± 0.07	17.9 ± 1.4	-25.7 ± 4.3		

Отрицательные значения ΔG в интервале температур 303.15–318.15 К свидетельствуют о том, что взаимодействие фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК термодинамически выгодно. Положительные значения ΔH и ΔS характерны для гидрофобных взаимодействий, поэтому можно предположить, что образование комплексов происходит за счёт взаимодействия гидрофобных участков молекулы $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК. В [220] авторы показали, что фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ взаимодействует с фосфатным остовом внешней стороны двойной спирали нативной ДНК, а также с парами азотистых оснований внутри большой бороздки ДНК. Следует отметить, что значения K_b , полученные в работе [220], на один-два порядка превышают значения K_b , представленные в Табл. 4.16. Это связано с тем, что изучение взаимодействия $C_{60}(OH)_{24}$ с ДНК проводилось в различных диапазонах температур, а также с тем, что синтез фуллеренола проводился по разным методикам и, как следствие, синтезированные аддукты имели различный состав.

4.3.7. Генотоксичность

Анализ Табл. 4.17 показывает, что количество повреждений ДНК в присутствии H_2O_2 значительно выше, чем для контрольных клеток. В качестве примера на Рис. 4.25 представлены фотографии ДНК-комет в присутствии H_2O_2 ($C = 100$ мкМ), буферного раствора Дульбекко и $C_{60}(OH)_{24}$ ($C = 10, 50, 75$ и 100 мкМ). Можно сделать вывод, что $C_{60}(OH)_{24}$ обладает умеренным дозозависимым генотоксическим эффектом. Полученные результаты согласуются с литературными. В работе [115] показано, что фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ не оказывает значительного генотоксического действия на клетки CHO-K1

(клетки яичника китайского хомячка К1) и МПКЧ, а также установлен его протекторный эффект при воздействии на ДНК клеток алкилирующего агента Митомицина.

Табл. 4.17. Влияние $C_{60}(OH)_{24}$ на процентное содержание ДНК в хвосте кометы, длину хвоста и момент хвоста комет.

Характеристика	Отрицательный контроль	$C(H_2O_2)$, мкМ		$C(C_{60}(OH)_{24})$, мкМ		
		100.0	10.0	50.0	75.0	100.0
% ДНК	0.84 ± 0.38	82.14 ± 2.03	5.70 ± 1.85	13.18 ± 3.26	17.84 ± 2.60	22.47 ± 3.50
Длина хвоста	28.59 ± 4.27	646.63 ± 67.67	15.08 ± 3.81	25.08 ± 4.51	31.10 ± 6.93	25.25 ± 5.95
Момент хвоста	0.24 ± 0.08	531.14 ± 19.89	0.85 ± 0.28	3.30 ± 0.43	5.54 ± 0.40	5.67 ± 0.21

(a)



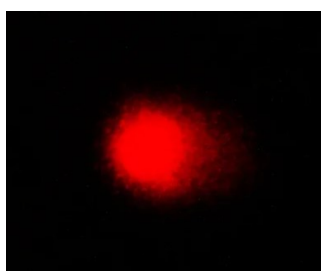
(б)



(в)



(г)



(д)



(е)

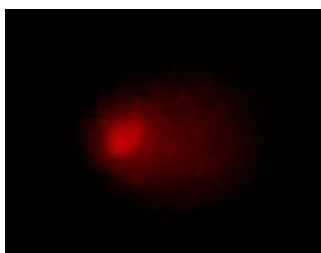


Рис. 4.25. Микрофотографии ДНК-комет после электрофореза МПКЧ в микрогеле: позитивный контроль (H_2O_2) — (а), негативный контроль — (б), $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 10, 50, 75, 100$ мкМ) — (в–е).

Основные результаты и выводы

1. Разработаны масштабируемые одностадийные методики синтеза аддуктов фуллерена C_{60} с L-аминокислотами (глицином, L-метионином, L-гидроксипролином, L-цистеином), приводящие к получению конечного продукта с выходом более 85 %.
2. Проведена идентификация полученных аддуктов с использованием комплекса современных физико-химических методов. Впервые для идентификации водорастворимых производных фуллерена C_{60} применен метод твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Использование данного метода позволило подтвердить ковалентную модификацию фуллерена и установить качественный состав аддуктов.
3. Проведено комплексное изучение физико-химических свойств водных растворов аддуктов фуллерена C_{60} и показано, что синтезированные соединения являются совместимыми с водой и водными растворами; совокупность данных по плотности, вязкости и размерам частиц для модельной системы аддукт фуллерена–вода свидетельствуют об их гемосовместимости. Полученные физико-химические характеристики являются ключевыми для разработки наноматериалов биомедицинского назначения.
4. Показано, что фуллеренол, карбоксилированный фуллерен, аддукты фуллерена C_{60} с L-аминокислотами являются биосовместимыми: не обладают цито- и генотоксичностью, гемосовместимы, проявляют антиоксидантную активность, сопоставимую с промышленным антиоксидантом ионолом.
5. Продемонстрировано УФ-фотопротекторное действие аддукта C_{60} с L-метионином, которое проявляется в дозозависимом ингибировании фотодеградаци и фотосшивания коллагена. Показано, что синтезированное соединение является перспективным для разработки фотопротекторных материалов.
6. В экспериментах *in vitro* установлено, что фуллеренол проявляет выраженные антикоагулянтные и антиагрегантные свойства. Полученные результаты показывают перспективность использования фуллеренолов для создания сердечных клапанов и сосудистых стентов.

Благодарности

Выражаю благодарность научным руководителям Семёнову Константину Николаевичу и Шаройко Владимиру Владимировичу за научное руководство, рецензирование статей и тезисов конференций и ценные замечания, а также заведующему кафедрой химии твёрдого тела Мурину Игорю Васильевичу и коллективу кафедры за организацию научной работы на кафедре и обсуждение полученных результатов.

Идентификация и физико-химическое изучение аддуктов были проведены с использованием оборудования ресурсных центров «Инновационные технологии композитных наноматериалов», «Магнитно-резонансные методы исследования», «Методы анализа состава вещества», Междисциплинарный ресурсный центр по направлению «Нанотехнологии», «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» Научного парка СПбГУ. Проведение биомедицинских исследований осуществлялось на базе кафедры общей и биоорганической химии и лаборатории биомедицинского материаловедения ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Список цитированной литературы

- [1] K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Postnov, V.V. Sharoyko, I.V. Vorotyntsev, M.M. Galagudza, I.V. Murin, Fullerenols: Physicochemical properties and applications, *Prog. Solid State Chem.* 44 (2016) 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.04.002>.
- [2] K.N. Semenov, E. V. Andrusenko, N.A. Charykov, E. V. Litasova, G.G. Panova, A. V. Penkova, I. V. Murin, L.B. Piotrovskiy, Carboxylated fullerenes: Physico-chemical properties and potential applications, *Prog. Solid State Chem.* 47–48 (2017) 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2017.09.001>.
- [3] E.I. Pochkaeva, N.E. Podolskiy, D.N. Zakusilo, A. V. Petrov, N.A. Charykov, T.D. Vlasov, A. V. Penkova, L. V. Vasina, I. V. Murin, V. V. Sharoyko, K.N. Semenov, Fullerene derivatives with amino acids, peptides and proteins: from synthesis to biomedical application, *Prog. Solid State Chem.* (2020) 100255. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2019.100255>.
- [4] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, N.E. Podolskiy, A. V. Petrov, E. V. Litasova, T.D. Vlasov, L. V. Vasina, I. V. Murin, L.B. Piotrovskiy, K.N. Semenov, Biologically active water-soluble fullerene adducts: Das Glasperlenspiel (by H. Hesse)?, *J. Mol. Liq.* 323 (2021) 114990. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114990>.
- [5] V.N. Bezmel'nitsyn, A. V. Elets'kiy, M. V. Okun', Fullerenes in solutions, *Physics-Uspekhi.* 41 (1998) 1091–1114. <https://doi.org/10.1070/PU1998v041n11ABEH000502>.
- [6] D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama, F. Shahidi, *Bio-nanotechnology: A revolution in food, biomedical, and health sciences*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118451915>.
- [7] K. Matsubayashi, K. Kokubo, H. Tategaki, S. Kawahama, T. Oshima, One-step synthesis of water-soluble fullerenols bearing nitrogen-containing substituents, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 17 (2009) 440–456. <https://doi.org/10.1080/01490450903039263>.
- [8] X.L. Yang, C.H. Fan, H.S. Zhu, Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C(60)]fullerene derivatives and its mechanism, *Toxicol. Vit.* 16 (2002) 41–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812638>.
- [9] M.G. Medzhidova, M.V. Abdullaeva, N.E. Fedorova, V.S. Romanova, A.A. Kushch, *In vitro* antiviral activity of fullerene amino acid derivatives in cytomegalovirus infection,

- Antibiot. i Khimioterapiya. 49 (2004) 13–20.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727140>.
- [10] Y.-L. Lin, H.-Y. Lei, Y.-Y. Wen, T.-Y. Luh, C.-K. Chou, H.-S. Liu, Light-independent inactivation of Dengue-2 virus by carboxyfullerene C₃ isomer, *Virology*. 275 (2000) 258–262. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0490>.
- [11] N. Tsao, T.-Y. Luh, C.-K. Chou, J.-J. Wu, Y.-S. Lin, H.-Y. Lei, Inhibition of group A Streptococcus infection by carboxyfullerene, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 1788–1793. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1788-1793.2001>.
- [12] I.C. Wang, L.A. Tai, D.D. Lee, P.P. Kanakamma, C.K.-F. Shen, T.-Y. Luh, C.H. Cheng, K.C. Hwang, C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 4614–4620. <https://doi.org/10.1021/jm990144s>.
- [13] L.L. Dugan, D.M. Turetsky, C. Du, D. Lobner, M. Wheeler, C.R. Almlı, C.K. Shen, T.Y. Luh, D.W. Choi, T.S. Lin, Carboxyfullerenes as neuroprotective agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 9434–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9256500>.
- [14] L.L. Dugan, E.G. Lovett, K.L. Quick, J. Lotharius, T.T. Lin, K.L. O'Malley, Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders, *Parkinsonism Relat. Disord.* 7 (2001) 243–246. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331193>.
- [15] F. Käsermann, C. Kempf, Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses, *Rev. Med. Virol.* 8 (1998) 143–151. <https://doi.org/10.1002/%28SICI%291099-1654%28199807/09%298%3A3<143%3A%3AAID-RMV214>3.0.CO%3B2-B>.
- [16] B. Vileno, A. Sienkiewicz, M. Lekka, A.J. Kulik, L. Forró, *In vitro* assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C₆₀, *Carbon N. Y.* 42 (2004) 1195–1198. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2003.12.042>.
- [17] I.M. Andreev, V.S. Romanova, A.O. Petrukhina, S.M. Andreev, Amino-acid derivatives of fullerene C₆₀ behave as lipophilic ions penetrating through biomembranes, *Phys. Solid State.* 44 (2002) 683–685. <https://doi.org/10.1134/1.1470559>.
- [18] S.H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G.L. Kenyon, Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 6506–6509. <https://doi.org/10.1021/ja00068a005>.
- [19] S.H. Friedman, P.S. Ganapathi, Y. Rubin, G.L. Kenyon, Optimizing the binding of

- fullerene inhibitors of the HIV-1 protease through predicted increases in hydrophobic desolvation, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2424–2429. <https://doi.org/10.1021/jm970689r>.
- [20] M. Bühl, A. Hirsch, Spherical aromaticity of fullerenes, *Chem. Rev.* 101 (2001) 1153–1183. <https://doi.org/10.1021/cr990332q>.
- [21] K. Prassides, H.W. Kroto, R. Taylor, D.R.M. Walton, W.I.F. David, J. Tomkinson, R.C. Haddon, M.J. Rosseinsky, D.W. Murphy, Fullerenes and fullerides in the solid state: Neutron scattering studies, *Carbon* N. Y. 30 (1992) 1277–1286. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(92\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0008-6223(92)90068-8).
- [22] A.V. Eletsii, B.M. Smirnov, Fullerenes and the structures of carbon, *Adv. Phys. Sci.* 165 (1995) 977. <https://doi.org/10.3367/UFNr.0165.199509a.0977>.
- [23] A.H. Francis, *An Atlas of Fullerenes* By P. W. Fowler (University of Exeter), D. E. Manolopoulos (University of Nottingham). Oxford: New York. 1995. viii + 392 pp. \$98.00. ISBN 0-19-855787-6., *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5161–5161. <https://doi.org/10.1021/ja955342x>.
- [24] H. Shinohara, Endohedral metallofullerenes, *Reports Prog. Phys.* 63 (2000) 843–892. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/63/6/201>.
- [25] K.M. Kadish, R.S. Ruoff, eds., *Fullerenes: Chemistry, Physics, and Technology*, Wiley, 2000. <https://www.wiley.com/en-us/Fullerenes%3A+Chemistry%2C+Physics%2C+and+Technology-p-9780471290896>.
- [26] E. Yamamoto, M. Tansho, T. Tomiyama, H. Shinohara, H. Kawahara, Y. Kobayashi, ¹³C-NMR Study on the Structure of Isolated Sc₂@C₈₄ Metallofullerene, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 2293–2294. <https://doi.org/10.1021/ja953393o>.
- [27] R. Kitaura, H. Okimoto, H. Shinohara, T. Nakamura, H. Osawa, Magnetism of the endohedral metallofullerenes M@C₈₂ (M = Gd, Dy) and the corresponding nanoscale peapods: Synchrotron soft x-ray magnetic circular dichroism and density-functional theory calculations, *Phys. Rev. B.* 76 (2007) 172409. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.76.172409>.
- [28] C. Hansch, T. Fujita, ρ-σ-π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616–1626. <https://doi.org/10.1021/ja01062a035>.
- [29] C.T. Jafvert, P.P. Kulkarni, Buckminsterfullerene's (C₆₀) Octanol–Water Partition Coefficient (K_{ow}) and Aqueous Solubility, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5945–5950.

- <https://doi.org/10.1021/es702809a>.
- [30] A. Bagno, S. Claeson, M. Maggini, M.L. Martini, M. Prato, G. Scorrano, [60]Fullerene as a Substituent, *Chem. - A Eur. J.* 8 (2002) 1015. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020301\)8:5<1015::AID-CHEM1015>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020301)8:5<1015::AID-CHEM1015>3.0.CO;2-Q).
- [31] L.B. Piotrovsky, O.I. Kiselev, Fullerenes and viruses, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 12 (2005) 397–403. <https://doi.org/10.1081/FST-120027198>.
- [32] A. Bianco, T. Da Ros, M. Prato, C. Toniolo, Fullerene-based amino acids and peptides, *J. Pept. Sci.* 7 (2001) 208–219. <https://doi.org/10.1002/psc.313>.
- [33] S. Sato, S. Seki, G. Luo, M. Suzuki, J. Lu, S. Nagase, T. Akasaka, Tunable charge-transport properties of I_h -C₈₀ endohedral metallofullerenes: Investigation of La₂@C₈₀, Sc₃N@C₈₀, and Sc₃C₂@C₈₀, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 11681–11686. <https://doi.org/10.1021/ja303660g>.
- [34] A. Rodríguez-Forteza, A.L. Balch, J.M. Poblet, Endohedral metallofullerenes: A unique host-guest association, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 3551–3563. <https://doi.org/10.1039/c0cs00225a>.
- [35] A.A. Popov, Synthesis and molecular structures of endohedral fullerenes, in: *Endohedral Fullerenes Electron Transf. Spin*, 2017: pp. 1–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47049-8_1.
- [36] M. Mędrek, F. Pluciński, A.P. Mazurek, M. Medrek, F. Pluciński, A.P. Mazurek, Endohedral complexes of fullerene C₆₀ with small covalent molecules (H₂O, NH₃, H₂, 2H₂, 3H₂, 4H₂, O₂, O₃) in the context of potential drug transporter system, *Acta Pol. Pharm.* 70 (2013) 659–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23923390>.
- [37] L.J. Wilson, D.W. Cagle, T.P. Thrash, S.J. Kennel, S. Mirzadeh, J.M. Alford, G.J. Ehrhardt, Metallofullerene drug design, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 199–207. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00080-6).
- [38] H. Bin Na, T. Hyeon, Nanostructured T1 MRI contrast agents, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 6267. <https://doi.org/10.1039/b902685a>.
- [39] V. V. Mody, M.I. Nounou, M. Bikram, Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 795–807. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.020>.
- [40] P. Chaudhuri, A. Paraskar, S. Soni, R.A. Mashelkar, S. Sengupta, Fullerenol–cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy, *ACS Nano.* 3 (2009) 2505–2514.

- <https://doi.org/10.1021/nn900318y>.
- [41] P.J. Krusic, E. Wasserman, P.N. Keizer, J.R. Morton, K.F. Preston, Radical reactions of C_{60} , *Science* (80-.). 254 (1991) 1183–1185. <https://doi.org/10.1126/science.254.5035.1183>.
- [42] C.S. Foote, Photophysical and photochemical properties of fullerenes, in: Springer, Berlin, Heidelberg, 1994: pp. 347–363. https://doi.org/10.1007/3-540-57565-0_80.
- [43] J.W. Arbogast, C.S. Foote, Photophysical properties of C_{70} , *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 8886–8889. <https://doi.org/10.1021/ja00023a041>.
- [44] J.W. Arbogast, A.P. Darmany, C.S. Foote, F.N. Diederich, R.L. Whetten, Y. Rubin, M.M. Alvarez, S.J. Anz, Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C_{60}), *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 11–12. <https://doi.org/10.1021/j100154a006>.
- [45] T. Nagano, K. Arakane, A. Ryu, T. Masunaga, K. Shinmoto, S. Mashiko, M. Hirobe, Comparison of singlet oxygen production efficiency of C_{60} with other photosensitizers, based on 1268 nm emission, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 42 (1994) 2291–2294. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.2291>.
- [46] T. Da Ros, G. Spalluto, M. Prato, Biological applications of fullerene derivatives: A brief overview, *Croat. Chem. Acta.* 74 (2001) 743–755. <https://pdfs.semanticscholar.org/66c5/0a3bdc019822a57e33073c4aa2b0b35ece05.pdf>.
- [47] В.В. Лебедев, К.Б. Жогова, Т.А. Быкова, Б.С. Каверин, В.Л. Карнацевич, М.А. Лопатин, Термодинамика фуллерепа C_{60} в области 0–340 К, *Известия Академии Наук. Серия Химическая*. 9 (1996) 2229–2233.
- [48] J. de Bruijn, A. Dworkin, H. Szwarc, J. Godard, R. Céolin, C. Fabre, A. Rassat, Thermodynamic properties of a single crystal of fullerene C_{60} : A DSC study, *Europhys. Lett.* 24 (1993) 551–556. <https://doi.org/10.1209/0295-5075/24/7/008>.
- [49] C.K. Mathews, M.S. Baba, T.S. Lakshmi Narasimhan, R. Balasubramanian, N. Sivaraman, T.G. Srinivasan, P.R. Vasudeva Rao, Vapour pressure and enthalpy of sublimation of C_{70} , *Fuller. Sci. Technol.* 1 (1993) 101–109. <https://doi.org/10.1080/15363839308015519>.
- [50] В.В. Дикий, Г.Я. Кабо, Термодинамические свойства фуллеренов C_{60} и C_{70} , *Успехи Химии*. 69 (2000) 95–104. <http://stacks.iop.org/0036-021X/69/i=2/a=R01?key=crossref.a13cf6b63274c1c4a9230d5cb3b064c3>.
- [51] T. Atake, T. Tanaka, H. Kawaji, K. Kikuchi, K. Saito, S. Suzuki, I. Ikemoto, Y. Achiba,

- Heat capacity measurements and thermodynamic studies of the new compound C_{60} , *Phys. C Supercond.* 185–189 (1991) 427–428. [https://doi.org/10.1016/0921-4534\(91\)92016-5](https://doi.org/10.1016/0921-4534(91)92016-5).
- [52] Y. Jin, J. Cheng, M. Varma-Nair, G. Liang, Y. Fu, B. Wunderlich, X.D. Xiang, R. Mostovoy, A.K. Zettl, Thermodynamic characterization of fullerene C_{60} by differential scanning calorimetry, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 5151–5156. <https://doi.org/10.1021/j100191a073>.
- [53] T. Matsuo, H. Suga, W.I.F. David, R.M. Ibberson, P. Bernier, A. Zahab, C. Fabre, A. Rassat, A. Dworkin, The heat capacity of solid C_{60} , *Solid State Commun.* 83 (1992) 711–715. [https://doi.org/10.1016/0038-1098\(92\)90149-4](https://doi.org/10.1016/0038-1098(92)90149-4).
- [54] К.Б. Жогова, Б.В. Лебедев, Термодинамика фуллерена C_{70} в области 0 – 390 К, *Известия Академии Наук. Серия Химическая.* 4 (1998) 647–649.
- [55] H.P. Diogo, M.E.M. Da Piedade, A.D. Darwish, T.J.S. Dennis, Enthalpy of formation of C_{70} , *J. Phys. Chem. Solids.* 58 (1997) 1965–1971. [https://doi.org/10.1016/S0022-3697\(97\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3697(97)00074-7).
- [56] A.I. Druzhinina, R.M. Varushchenko, S.I. Troyanov, L.N. Sidorov, The standard thermodynamic functions of fullerene chloride, $C_{60}Cl_{30}$, *J. Chem. Thermodyn.* 42 (2010) 165–168. <https://doi.org/10.1016/J.JCT.2009.07.007>.
- [57] A.V. Markin, N.N. Smirnova, T.A. Bykova, V.A. Ruchenin, S.N. Titova, E.A. Gorina, L.V. Kalakutskaya, A.M. Ob'edkov, S.Y. Ketkov, G.A. Domrachev, Thermodynamics of dimer fullerene complex $[(Me_3Si)_3C_{60}]_2$ in the range from $0 \leq T/K \leq 480$, *J. Chem. Thermodyn.* 39 (2007) 798–803. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2006.10.002>.
- [58] A.V. Markin, V.A. Ruchenin, N.N. Smirnova, G.A. Abakumov, G.V. Markin, Y.A. Shevelev, V.A. Kuropatov, M.A. Lopatin, V.K. Cherkasov, G.A. Domrachev, Thermodynamic properties of bis-(η^6 -cumene)chromium fulleride $[(\eta^6\text{-PhCH}(\text{CH}_3)_2)_2\text{Cr}]^+[\text{C}_{60}]^-$ over the range from $T \rightarrow (0 \text{ to } 310) \text{ K}$, *J. Chem. Thermodyn.* 43 (2011) 1495–1499. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2011.05.005>.
- [59] B.V. Lebedev, T.A. Bykova, A.S. Lobach, Thermodynamic properties of hydrofullerene $C_{60}H_{36}$ from 5 to 340 K, *J. Therm. Anal. Calorim.* 62 (2000) 257–265. <https://doi.org/10.1023/A:1010139501374>.
- [60] D.N. Nikolaev, N.E. Podolsky, M.I. Lelet, N.R. Iamalova, O.S. Shemchuk, S.V. Ageev, A.V. Petrov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, L.B. Piotrovskiy, I.V. Murin, Thermodynamic and quantum chemical investigation of the monocarboxylated fullerene

- $C_{60}CHCOOH$, J. Chem. Thermodyn. 140 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.105898>.
- [61] M.I. Lelet, K.N. Semenov, E. V. Andrusenko, N.A. Charykov, I. V. Murin, Thermodynamic and thermal properties of the C_{60} -L-lysine derivative, J. Chem. Thermodyn. 115 (2017) 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.07.017>.
- [62] G.O. Iurev, M.I. Lelet, E.I. Pochkaeva, A. V. Petrov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, N.E. Podolsky, L.L. Dulneva, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, Thermodynamic and thermal properties of the C_{60} -L-Arg derivative, J. Chem. Thermodyn. 127 (2018) 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.07.007>.
- [63] N.E. Podolsky, M.I. Lelet, S. V. Ageev, A.G. Novikov, A. V. Petrov, A.S. Mazur, K.N. Semenov, N.A. Charykov, L. V. Vasina, I. V. Murin, Thermodynamic properties from calorimetry and density functional theory and the thermogravimetric analysis of the fullerene derivative $C_{60}(OH)_{40}$, J. Chem. Eng. Data. 64 (2019) 1480–1487. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b01075>.
- [64] N.E. Podolsky, M.I. Lelet, S. V. Ageev, A. V. Petrov, A.S. Mazur, N.R. Iamalova, D.N. Zakusilo, N.A. Charykov, L. V. Vasina, K.N. Semenov, I. V. Murin, Thermodynamic properties of the $C_{70}(OH)_{12}$ fullerenol in the temperature range $T = 9.2$ K to 304.5 K, J. Chem. Thermodyn. 144 (2020) 106029. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.106029>.
- [65] G. Gigli, G. Balducci, V.Y. Markov, O. V. Boltalina, A.A. Goryunkov, L.N. Sidorov, R. Taylor, Saturated vapor pressure and sublimation enthalpy of $C_{60}F_{18}$, J. Chem. Thermodyn. 34 (2002) 57–61. <https://doi.org/10.1006/jcht.2001.0902>.
- [66] T.S. Papina, V.P. Kolesov, V.A. Lukyanova, O.V. Boltalina, N.A. Galeva, L.N. Sidorov, The standard molar enthalpy of formation of fluorofullerene $C_{60}F_{48}$, J. Chem. Thermodyn. 31 (1999) 1321–1328. <https://doi.org/10.1006/jcht.1999.0544>.
- [67] Л.Б. Пиотровский, О.И. Киселёв, Фуллерены в биологии, Росток, Санкт-Петербург, 2006.
- [68] A. Hirsch, ed., Fullerenes and Related Structures, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1999. <https://doi.org/10.1007/3-540-68117-5>.
- [69] Л.Н. Сидоров, М.А. Юровская, А.Я. Борщевский, И.В. Трушков, И.Н. Иоффе, Фуллерены. Учебное пособие, Издательство “Экзамен,” Москва, 2005. <https://www.labirint.ru/books/67480/>.
- [70] M. Yamada, M.T.H. Liu, S. Nagase, T. Akasaka, New Horizons in Chemical

- Functionalization of Endohedral Metallofullerenes, *Molecules*. 25 (2020) 3626. <https://doi.org/10.3390/molecules25163626>.
- [71] J.C. Hummelen, M. Prato, F. Wudl, There Is a Hole in My Bucky, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7003–7004. <https://doi.org/10.1021/ja00131a024>.
- [72] K. Komatsu, Encapsulation of Molecular Hydrogen in Fullerene C₆₀ by Organic Synthesis, *Science* (80-.). 307 (2005) 238–240. <https://doi.org/10.1126/science.1106185>.
- [73] K. Kurotobi, Y. Murata, A Single Molecule of Water Encapsulated in Fullerene C₆₀, *Science* (80-.). 333 (2011) 613–616. <https://doi.org/10.1126/science.1206376>.
- [74] A. Krachmalnicoff, R. Bounds, S. Mamone, S. Alom, M. Concistrè, B. Meier, K. Kouřil, M.E. Light, M.R. Johnson, S. Rols, A.J. Horsewill, A. Shugai, U. Nagel, T. Rööm, M. Carravetta, M.H. Levitt, R.J. Whitby, The dipolar endofullerene HF@C₆₀, *Nat. Chem.* 8 (2016) 953–957. <https://doi.org/10.1038/nchem.2563>.
- [75] S. Bloodworth, G. Sitinova, S. Alom, S. Vidal, G.R. Bacanu, S.J. Elliott, M.E. Light, J.M. Herniman, G.J. Langley, M.H. Levitt, R.J. Whitby, First Synthesis and Characterization of CH₄@C₆₀, *Angew. Chemie Int. Ed.* 58 (2019) 5038–5043. <https://doi.org/10.1002/anie.201900983>.
- [76] T. Akasaka, S. Nagase, K. Kobayashi, M. Wälchli, K. Yamamoto, H. Funasaka, M. Kako, T. Hoshino, T. Erata, ¹³C and ¹³⁹La NMR Studies of La₂@C₈₀: First Evidence for Circular Motion of Metal Atoms in Endohedral Dimetallofullerenes, *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 36 (1997) 1643–1645. <https://doi.org/10.1002/anie.199716431>.
- [77] V.P. Bubnov, I.E. Kareev, A.I. Kotov, E.B. Yagubsky., New approaches to the synthesis of water-soluble endometallofullerenes with gadolinium, *Hydrog. Mater. Sci. Chem. Carbon Nanomater. X Intern. Conf.* (2007) 1150.
- [78] R. He, H. Zhao, J. Liu, Y. Jiao, Y. Liang, X. Li, C. Chen, Synthesis and Aggregation Studies of Bingel-Hirsch Monoadducts of Gadofullerene, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 21 (2013) 549–559. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2011.643423>.
- [79] N.E. Podolsky, M.A. Marcos, D. Cabaleiro, K.N. Semenov, L. Lugo, A. V. Petrov, N.A. Charykov, V. V. Sharoyko, T.D. Vlasov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of C₆₀(OH)_{22–24} water solutions: Density, viscosity, refraction index, isobaric heat capacity and antioxidant activity, *J. Mol. Liq.* 278 (2019) 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.148>.
- [80] W.J. Blau, H.J. Byrne, D.J. Cardin, T.J. Dennis, J.P. Hare, H.W. Kroto, R. Taylor, D.R.M.

- Walton, Large infrared nonlinear optical response of C_{60} , *Phys. Rev. Lett.* 67 (1991) 1423–1425. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.67.1423>.
- [81] S. Nath, H. Pal, A. V. Sapre, Effect of solvent polarity on the aggregation of C_{60} , *Chem. Phys. Lett.* 327 (2000) 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00863-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00863-0).
- [82] Q. Ying, J. Marecek, B. Chu, Solution behavior of buckminsterfullerene (C_{60}) in benzene, *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 2665–2672. <https://doi.org/10.1063/1.467646>.
- [83] L.A. Bulavin, I.I. Adamenko, V.M. Yashchuk, T.Y. Ogul'chansky, Y.I. Prylutskyy, S.S. Durov, P. Scharff, Self-organization C_{60} nanoparticles in toluene solution, *J. Mol. Liq.* 93 (2001) 187–191. [https://doi.org/10.1016/S0167-7322\(01\)00228-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7322(01)00228-8).
- [84] A.D. Bakare, A. Patnaik., C_{60} aggregate structure and geometry in non-polar o-xylene, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 87–92.
- [85] H.E. Smorenburg, R.M. Crevecoeur, I.M. Schepper, L.A. de Graaf., Structure and dynamics of C_{60} in liquid CS_2 from neutron scattering, *Phys.Rev. E.* 52 (1995) 2742–2752.
- [86] S. Nath, H. Pal, A. V. Sapre, Effect of solvent polarity on the aggregation of fullerenes: A comparison between C_{60} and C_{70} , *Chem. Phys. Lett.* 360 (2002) 422–428. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(02\)00780-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(02)00780-7).
- [87] T. Rudalevige, A.H. Francis, R. Zand, Spectroscopic studies of fullerene aggregates, *J. Phys. Chem. A.* 102 (1998) 9797–9802. <https://doi.org/10.1021/jp9832591>.
- [88] Y.I. Prylutskyy, S.S. Durov, L.A. Bulavin, I.I. Adamenko, K.O. Moroz, A. Graja, A. Bogucki, P. Scharff, Structure, vibrational, and calorical properties of fullerene C_{60} in toluene solution, *Fuller. Sci. Technol.* 9 (2001) 167–174. <https://doi.org/10.1081/FST-100102964>.
- [89] V.V. Golubkov, B.A. Shakhmatkin, N.A. Charykov, B.M. Akselrod., X-ray small-angle scattering of fullerene C_{70} solutions in o-xylene, *Russ. J. Phys. Chem. A.* 75 (2001) 1821–1824.
- [90] D. Torok, V.T. Lebedev, L. Cher., Investigation of anomalous clustering of C_{60} in toluene by small-angle neutron scattering, *Solid State Phys.* 44 (2002) 546–547.
- [91] Q. Ying, J. Marecek, B. Chu, Slow aggregation of buckminsterfullerene (C_{60}) in benzene solution, *Chem. Phys. Lett.* 219 (1994) 214–218. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(94\)87047-0](https://doi.org/10.1016/0009-2614(94)87047-0).
- [92] K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Postnov, V.V. Sharoyko, I.V. Murin, Phase equilibria in fullerene-containing systems as a basis for development of manufacture and

- application processes for nanocarbon materials, *Russ. Chem. Rev.* 85 (2016) 38–59. <https://doi.org/10.1070/RCR4489>.
- [93] N.A. Charykov, K.N. Semenov, E.R. López, J. Fernández, E.B. Serebryakov, V.A. Keskinov, I. V. Murin, Excess thermodynamic functions in aqueous systems containing soluble fullerene derivatives, *J. Mol. Liq.* 256 (2018) 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.177>.
- [94] E.B. Serebryakov, K.N. Semenov, I. V. Stepanyuk, N.A. Charykov, A.N. Mescheryakov, A.N. Zhukov, A. V. Chaplygin, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₇₀-L-lysine aqueous solutions, *J. Mol. Liq.* 256 (2018) 507–518. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.057>.
- [95] K.N. Semenov, N.A. Charykov, I. V. Murin, Y. V. Pukharenko, Physico-chemical properties of the C₆₀-tris-malonic derivative water solutions, *J. Mol. Liq.* 201 (2015) 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.11.019>.
- [96] K.N. Semenov, N.A. Charykov, A.A. Meshcheriakov, E. Lahderanta, A. V. Chaplygin, Y.A. Anufrikov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₆₀-L-threonine water solutions, *J. Mol. Liq.* 242 (2017) 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.098>.
- [97] K.N. Semenov, A.A. Meshcheriakov, N.A. Charykov, M.E. Dmitrenko, V.A. Keskinov, I. V. Murin, G.G. Panova, V. V. Sharoyko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, Physico-chemical and biological properties of C₆₀-L-hydroxyproline water solutions, *RSC Adv.* 7 (2017) 15189–15200. <https://doi.org/10.1039/C6RA26621E>.
- [98] K.N. Semenov, N.A. Charykov, I. V. Murin, Y. V. Pukharenko, Physico-chemical properties of the fulleranol-70 water solutions, *J. Mol. Liq.* 202 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.12.002>.
- [99] E.B. Serebryakov, D.N. Zakusilo, K.N. Semenov, N.A. Charykov, A. V. Akentiev, B.A. Noskov, A. V. Petrov, N.E. Podolsky, A.S. Mazur, L. V. Dul'neva, I. V. Murin, Physico-chemical properties of C₇₀-L-threonine bisadduct (C₇₀(C₄H₉NO₂)₂) aqueous solutions, *J. Mol. Liq.* 279 (2019) 687–699. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.013>.
- [100] D.M. Guldi, M. Prato, Excited-state properties of C₆₀ fullerene derivatives, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 695–703. <https://doi.org/10.1021/ar990144m>.
- [101] A. V. Markin, Y.S. Samosudova, T.G. Ogurtsov, N.N. Smirnova, S. V. Ageev, N.E. Podolsky, A. V. Petrov, I. V. Murin, K.N. Semenov, Heat capacity and standard thermodynamic functions of the fulleranol C₆₀(OH)₂₄, *J. Chem. Thermodyn.* 149 (2020)

106192. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106192>.
- [102] A.A. Shestopalova, K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Postnov, N.M. Ivanova, V. V. Sharoyko, V.A. Keskinov, D.G. Letenko, V.A. Nikitin, V. V. Klepikov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₆₀-arginine water solutions, *J. Mol. Liq.* 211 (2015) 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.07.022>.
- [103] K.N. Semenov, N.A. Charykov, G.O. Iurev, N.M. Ivanova, V.A. Keskinov, D.G. Letenko, V.N. Postnov, V. V. Sharoyko, N.A. Kulenova, I. V. Prikhodko, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₆₀-L-lysine water solutions, *J. Mol. Liq.* 225 (2017) 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.11.003>.
- [104] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A.A. Meshcheriakov, A. V. Akentiev, B.A. Noskov, I.T. Rakipov, N.A. Charykov, N.A. Kulenova, B.K. Shaimardanova, N.E. Podolsky, K.N. Semenov, Physicochemical study of water-soluble C₆₀(OH)₂₄ fulleranol, *J. Mol. Liq.* 311 (2020) 113360. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113360>.
- [105] N.A. Charykov, K.N. Semenov, V.A. Keskinov, N.A. Kulenova, Z.K. Shaimardanov, B.K. Shaimardanova, L.V. Gerasimova, A. Kanbar, D.G. Letenko, Cryometry and excess thermodynamic functions in water soluble of the fulleranol C₆₀(OH)₂₄, *Nanosyst. Physics, Chem. Math.* 11 (2020) 205–213. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2020-11-2-205-213>.
- [106] E.I. Pochkaeva, A.A. Meshcheriakov, S. V. Ageev, N.E. Podolsky, A. V. Petrov, N.A. Charykov, L. V. Vasina, O.Y. Nikolaeva, I.N. Gaponenko, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, K.N. Semenov, Polythermal density and viscosity, nanoparticle size distribution, binding with human serum albumin and radical scavenging activity of the C₆₀-L-arginine (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈) aqueous solutions, *J. Mol. Liq.* 297 (2020) 111915. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111915>.
- [107] A.A. Meshcheriakov, G.O. Iurev, M.D. Luttsev, N.E. Podolsky, S. V. Ageev, A. V. Petrov, L. V. Vasina, I.L. Solovtsova, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, K.N. Semenov, Physicochemical properties, biological activity and biocompatibility of water-soluble C₆₀-Hyp adduct, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 196 (2020) 111338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111338>.
- [108] C.T. Chien, P.H. Lee, C.F. Chen, M.C. Ma, M.K. Lai, S.M. Hsu, *De Novo* Demonstration and Co-localization of Free-Radical Production and Apoptosis Formation in Rat Kidney Subjected to Ischemia/Reperfusion, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (2001) 973–982.

- <https://doi.org/10.1681/ASN.V125973>.
- [109] L.Y. Chiang, R.B. Upasani, J.W. Swirczewski, Versatile nitronium chemistry for C₆₀ fullerene functionalization, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10154–10157. <https://doi.org/10.1021/ja00052a010>.
- [110] H.-S. Lai, W. Chen, L.Y. Chiang, Free radical scavenging activity of fulleranol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs, *World J. Surg.* 24 (2000) 450–454. <https://doi.org/10.1007/s002689910071>.
- [111] M.-C.C. Tsai, Y.H. Chen, L.Y. Chiang, Polyhydroxylated C₆₀, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro., *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 438–45. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06821.x>.
- [112] S.M. Mirkov, A.N. Djordjevic, N.L. Andric, S.A. Andric, T.S. Kostic, G.M. Bogdanovic, M.B. Vojinovic-Miloradov, R.Z. Kovacevic, Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fulleranol, C₆₀(OH)₂₄, *Nitric Oxide.* 11 (2004) 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.08.003>.
- [113] Y. Zha, B. Yang, M. Tang, Q. Guo, J. Chen, L. Wen, M. Wang, Concentration-dependent effects of fulleranol on cultured hippocampal neuron viability, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 3099–109. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30934>.
- [114] S. Ye, M. Chen, Y. Jiang, M. Chen, Y. Wang, Z. Hou, L. Ren, T. Zhou, Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system, *Int. J. Nanomedicine.* (2014) 2073. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56973>.
- [115] J. Mrđanović, S. Šolajić, V. Bogdanović, K. Stankov, G. Bogdanović, A. Djordjevic, Effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 680 (2009) 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.08.008>.
- [116] Y. Saitoh, A. Miyanishi, H. Mizuno, S. Kato, H. Aoshima, K. Kokubo, N. Miwa, Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS generation and DNA damages, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 102 (2011) 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.09.006>.
- [117] L.-H. Lu, Y.-T. Lee, H.-W. Chen, L.Y. Chiang, H.-C. Huang, The possible mechanisms

- of the antiproliferative effect of fulleranol, polyhydroxylated C₆₀, on vascular smooth muscle cells, *Br. J. Pharmacol.* 123 (1998) 1097–1102. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701722>.
- [118] H.C. Huang, T.R. Jan, S.F. Yeh, Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation, *Eur. J. Pharmacol.* 221 (1992) 381–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1426014>.
- [119] H.C. Huang, Y.L. Huang, J.H. Chang, C.C. Chen, Y.T. Lee, Possible mechanism of immunosuppressive effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin), *Eur. J. Pharmacol.* 217 (1992) 143–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425935>.
- [120] H.-C. Huang, C.-R. Lee, Y.-I. Weng, M.-C. Lee, Y.-T. Lee, Vasodilator effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) from a Chinese herb, *Eur. J. Pharmacol.* 218 (1992) 123–128. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90155-W](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90155-W).
- [121] H.-C. Huang, L.-M. Hsieh, H.-W. Chen, Y.-S. Lin, J.-S. Chen, Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells, *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 268 (1994) 73–78. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90121-X](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90121-X).
- [122] H.-C. Huang, M.-W. Lai, H.-R. Wang, Y.-L. Chung, L.-M. Hsieh, C.-C. Chen, Antiproliferative effect of esculetin on vascular smooth muscle cells: possible roles of signal transduction pathways, *Eur. J. Pharmacol.* 237 (1993) 39–44. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90090-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90090-5).
- [123] H.-C. Huang, H.-R. Wang, L.-M. Hsieh, Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell, *Eur. J. Pharmacol.* 251 (1994) 91–93. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90447-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90447-2).
- [124] M.G. Alvarez, C. Prucca, M.E. Milanesio, E.N. Durantini, V. Rivarola, Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C₆₀ dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2006) 2092–2101. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.019>.
- [125] I. Nakanishi, S. Fukuzumi, T. Konishi, K. Ohkubo, M. Fujitsuka, O. Ito, N. Miyata, DNA cleavage via electron transfer from NADH to molecular oxygen photosensitized by γ -cyclodextrin-bicapped C₆₀, in: *Fullerenes New Millenn.*, The Electrochemical Society, Inc., 2001: pp. 138–151. https://books.google.ru/books?id=sqOb5ORTKRkC&printsec=frontcover&redir_esc=y#

v=onepage&q&f=false.

- [126] Y. Yamakoshi, N. Umezawa, A. Ryu, K. Arakane, N. Miyata, Y. Goda, T. Masumizu, T. Nagano, Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂^{-*} versus ¹O₂, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 12803–12809. <https://doi.org/10.1021/ja0355574>.
- [127] A. Ikeda, Y. Doi, M. Hashizume, J. Kikuchi, T. Konishi, An extremely effective DNA photocleavage utilizing functionalized liposomes with a fullerene-enriched lipid bilayer, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 4140–4141. <https://doi.org/10.1021/ja070243s>.
- [128] A. Ikeda, T. Hatano, M. Kawaguchi, S. Shinkai, H. Suenaga, Water-soluble [60]fullerene-cationic homooxalix[3]arene complex which is applicable to the photocleavage of DNA, *Chem. Commun.* 0 (1999) 1403–1404. <https://doi.org/10.1039/a903872h>.
- [129] R. Bernstein, F. Prat, C.S. Foote, On the mechanism of DNA cleavage by fullerenes investigated in model systems: Electron transfer from guanosine and 8-oxo-guanosine derivatives to C₆₀, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1998) 464–465. <https://doi.org/10.1021/JA983335D>.
- [130] Y. Liu, Y.-L. Zhao, Y. Chen, P. Liang, L. Li, A water-soluble β-cyclodextrin derivative possessing a fullerene tether as an efficient photodriven DNA-cleavage reagent, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 2507–2511. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.01.181>.
- [131] G.W. Buchko, J.R. Wagner, J. Cadet, S. Raoul, M. Weinfeld, Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1263 (1995) 17–24. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(95\)00078-U](https://doi.org/10.1016/0167-4781(95)00078-U).
- [132] T. Da Ros, G. Spalluto, A.S. Boutorine, M. Prato, Current chemistry: Fullerene derivatives as potential DNA photoprobes, *Aust. J. Chem.* 54 (2001) 223–224. <https://doi.org/10.1071/CH01058>.
- [133] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 761–770. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763058>.
- [134] J.P. Kamat, T.P.A. Devasagayam, K.I. Priyadarsini, H. Mohan, Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications, *Toxicology.* 155 (2000) 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00277-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00277-8).
- [135] Z. Hu, C. Zhang, Y. Huang, S. Sun, W. Guan, Y. Yao, Photodynamic anticancer activities

- of water-soluble C₆₀ derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line, *Chem. Biol. Interact.* 195 (2012) 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.11.003>.
- [136] A.M. Vaiserman, O. V. Lushchak, A.K. Koliada, Anti-aging pharmacology: Promises and pitfalls, *Ageing Res. Rev.* 31 (2016) 9–35. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.004>.
- [137] F. Beuerle, P. Witte, U. Hartnagel, R. Lebovitz, C. Parng, A. Hirsch, Cytoprotective activities of water-soluble fullerenes in zebrafish models, *J. Exp. Nanosci.* 2 (2007) 147–170. <https://doi.org/10.1080/17458080701502091>.
- [138] L.B. Piotrovsky, O.I. Kiselev, *Fullerenes in biology*, Rostok, Saint Petersburg, 2006.
- [139] G.A. Burley, P.A. Keller, S.G. Pyne, [60]Fullerene Amino Acids and Related Derivatives, *Fuller. Sci. Technol.* 7 (1999) 973–1001. <https://doi.org/10.1080/10641229909350301>.
- [140] M. Bjelaković, T. Kop, V. Maslak, D. Milić, Synthesis and characterization of highly ordered self-assembled bioactive fulleropeptides, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 739–747. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9396-z>.
- [141] H.M. Huang, H.C. Ou, S.J. Hsieh, L.Y. Chiang, Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fullereneol-1, carboxylate C₆₀ in PC12 cells, *Life Sci.* 66 (2000) 1525–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794500>.
- [142] A.S. Basso, D. Frenkel, F.J. Quintana, F.A. Costa-Pinto, S. Petrovic-Stojkovic, L. Puckett, A. Monsonego, A. Bar-Shir, Y. Engel, M. Gozin, H.L. Weiner, Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1532–1543. <https://doi.org/10.1172/JCI33464>.
- [143] S.S. Ali, J.I. Hardt, L.L. Dugan, SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: A structure-activity study, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 4 (2008) 283–94. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.05.003>.
- [144] L.L. Dugan, L. Tian, K.L. Quick, J.I. Hardt, M. Karimi, C. Brown, S. Loftin, H. Flores, S.M. Moerlein, J. Polich, S.D. Tabbal, J.W. Mink, J.S. Perlmutter, Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in Parkinsonian nonhuman primates, *Ann. Neurol.* 76 (2014) 393–402. <https://doi.org/10.1002/ana.24220>.
- [145] F. Moussa, P. Chretien, P. Dubois, L. Chuniaud, M. Dessante, F. Trivin, P.-Y. Sizaret, V. Agafonov, R. Céolin, H. Szwarc, V. Greugny, C. Fabre, A. Rassat, The influence of C₆₀ powders on cultured human leukocytes, *Fuller. Sci. Technol.* 3 (1995) 333–342. <https://doi.org/10.1080/153638X9508543788>.
- [146] F. Moussa, F. Trivin, R. Céolin, M. Hadchouel, P.Y. Sizaret, V. Greugny, C. Fabre, A.

- Rassat, H. Szwarc, Early effects of C₆₀ administration in swiss mice: A preliminary account for *in vivo* C₆₀ toxicity, Fuller. Sci. Technol. 4 (1996) 21–29. <https://doi.org/10.1080/10641229608001534>.
- [147] L.B. Piotrovskii, Fullerenes in the drug design, Nanotechnologies Russ. 4 (2009) 541–555. <https://doi.org/10.1134/S1995078009090018>.
- [148] O.D. Hendrickson, O. V. Morozova, A. V. Zherdev, A.I. Yaropolov, S.G. Klochkov, S.O. Bachurin, B.B. Dzantiev, Study of distribution and biological effects of fullerene C₆₀ after single and multiple intragastrical administrations to rats, Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures. 23 (2015) 658–668. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2014.949695>.
- [149] J. Gao, H.L. Wang, A. Shreve, R. Iyer, Fullerene derivatives induce premature senescence: A new toxicity paradigm or novel biomedical applications, Toxicol. Appl. Pharmacol. 244 (2010) 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.025>.
- [150] A. Trpkovic, B. Todorovic-Markovic, V. Trajkovic, Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress, Arch. Toxicol. 86 (2012) 1809–1827. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0859-6>.
- [151] G. Andrievsky, V. Klochkov, L. Derevyanchenko, Is the C₆₀ Fullerene Molecule Toxic?!, Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures. 13 (2005) 363–376. <https://doi.org/10.1080/15363830500237267>.
- [152] T. Baati, F. Bourasset, N. Gharbi, L. Njim, M. Abderrabba, A. Kerkeni, H. Szwarc, F. Moussa, The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene, Biomaterials. 33 (2012) 4936–4946. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>.
- [153] J.-Y. Xu, Y.-Y. Su, J.-S. Cheng, S.-X. Li, R. Liu, W.-X. Li, G.-T. Xu, Q.-N. Li, Protective effects of fullerenol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats, Carbon N. Y. 48 (2010) 1388–1396. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.12.029>.
- [154] M. Slavic, A. Djordjevic, R. Radojicic, S. Milovanovic, Z. Orescanin-Dusic, Z. Rakocevic, M.B. Spasic, D. Blagojevic, Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction, J. Nanoparticle Res. 15 (2013) 1650. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1650-1>.
- [155] A. Isakovic, Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, N. Nikolic, S. Vranjes-Djuric, M. Mirkovic, M. Dramicanin, L. Harhaji, N. Raicevic, Z. Nikolic, V. Trajkovic, Distinct

- cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene, *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 173–183. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj127>.
- [156] R. Injac, M. Perse, M. Boskovic, V. Djordjevic-Milic, A. Djordjevic, A. Hvala, A. Cerar, B. Strukelj, Cardioprotective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ on a single dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm, *Technol. Cancer Res. Treat.* 7 (2008) 15–25. <https://doi.org/10.1177/153303460800700102>.
- [157] V. Djordjević-Milić, A. Djordjević, S. Dobrić, R. Injac, D. Vučković, K. Stankov, V. Dragojević-Simić, L. Suvajdžić, Influence of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ on doxorubicin induced cardiotoxicity in rats, *Mater. Sci. Forum.* 518 (2006) 525–530. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.518.525>.
- [158] R. Injac, M. Boskovic, M. Perse, E. Koprivec-Furlan, A. Cerar, A. Djordjevic, B. Strukelj, Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fulleranol C₆₀(OH)₂₄ *via* suppression of oxidative stress, *Pharmacol. Rep.* 60 (2008) 742–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066422>.
- [159] R. Injac, M. Perse, N. Obermajer, V. Djordjevic-Milic, M. Prijatelj, A. Djordjevic, A. Cerar, B. Strukelj, Potential hepatoprotective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas, *Biomaterials.* 29 (2008) 3451–3460. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.048>.
- [160] J.G. Saathoff, A.O. Inman, X.R. Xia, J.E. Riviere, N.A. Monteiro-Riviere, *In vitro* toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells, *Toxicol. Vitro.* 25 (2011) 2105–2112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.013>.
- [161] D. Xu, M. Liu, Q. Huang, J. Chen, H. Huang, F. Deng, J. Tian, Y. Wen, X. Zhang, Y. Wei, A novel method for the preparation of fluorescent C₆₀ poly(amino acid) composites and their biological imaging, *J. Colloid Interface Sci.* 516 (2018) 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.01.085>.
- [162] J.G. Rouse, J. Yang, A.R. Barron, N.A. Monteiro-Riviere, Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes, *Toxicol. Vitro.* 20 (2006) 1313–1320. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.04.004>.
- [163] M. Lucafò, S. Pacor, C. Fabbro, T. Da Ros, S. Zorzet, M. Prato, G. Sava, Study of a potential drug delivery system based on carbon nanoparticles: Effects of fullerene derivatives in MCF7 mammary carcinoma cells, *J. Nanoparticle Res.* 14 (2012) 830. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0830-8>.

- [164] M. Chen, X. Qin, G. Zeng, Biodegradation of carbon nanotubes, graphene, and their derivatives, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 836–846. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.001>.
- [165] B.L. Allen, G.P. Kotchey, Y. Chen, N.V.K. Yanamala, J. Klein-Seetharaman, V.E. Kagan, A. Star, Mechanistic investigations of horseradish peroxidase-catalyzed degradation of single-walled carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 17194–17205. <https://doi.org/10.1021/ja9083623>.
- [166] V.E. Kagan, A.A. Kapralov, C.M. St. Croix, S.C. Watkins, E.R. Kisin, G.P. Kotchey, K. Balasubramanian, I.I. Vlasova, J. Yu, K. Kim, W. Seo, R.K. Mallampalli, A. Star, A.A. Shvedova, Lung macrophages “digest” carbon nanotubes using a superoxide/peroxynitrite oxidative pathway, *ACS Nano.* 8 (2014) 5610–5621. <https://doi.org/10.1021/nn406484b>.
- [167] D. Li, J.D. Fortner, D.R. Johnson, C. Chen, Q. Li, P.J.J. Alvarez, Bioaccumulation of ^{14}C 60 by the Earthworm *Eisenia fetida*, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 9170–9175. <https://doi.org/10.1021/es1024405>.
- [168] R. Avansi, W.A. Jackson, B. Sherwin, J.F. Mudge, T.A. Anderson, C_{60} fullerene soil sorption, biodegradation, and plant uptake, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 2792–2797. <https://doi.org/10.1021/es405306w>.
- [169] D.A. Navarro, R.S. Kookana, M.J. McLaughlin, J.K. Kirby, Fate of radiolabeled C_{60} fullerenes in aged soils, *Environ. Pollut.* 221 (2017) 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.077>.
- [170] T.D. Berry, T.R. Filley, A.P. Clavijo, M. Bischoff Gray, R. Turco, Degradation and Microbial Uptake of C_{60} Fullerols in Contrasting Agricultural Soils, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 1387–1394. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04637>.
- [171] D.A. Navarro, R.S. Kookana, M.J. McLaughlin, J.K. Kirby, Fullerol as a potential pathway for mineralization of fullerene nanoparticles in biosolid-amended soils, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3 (2016) 7–12. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00292>.
- [172] A.J. Tiwari, J.R. Morris, E.P. Vejerano, M.F. Hochella, L.C. Marr, Oxidation of C_{60} aerosols by atmospherically relevant levels of O_3 , *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 2706–2714. <https://doi.org/10.1021/es4045693>.
- [173] J.D. Fortner, D. Il Kim, A.M. Boyd, J.C. Falkner, S. Moran, V.L. Colvin, J.B. Hughes, J.-H.H. Kim, Reaction of water-stable C_{60} aggregates with ozone, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 7497–7502. <https://doi.org/10.1021/es0708058>.

- [174] J. Sanchís, Y. Aminot, E. Abad, A.N. Jha, J.W. Readman, M. Farré, Transformation of C₆₀ fullerene aggregates suspended and weathered under realistic environmental conditions, *Carbon* N. Y. 128 (2018) 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.11.060>.
- [175] I. Gitsov, A. Simonyan, L. Wang, A. Krastanov, S.W. Tanenbaum, D. Kiemle, Polymer-assisted biocatalysis: Unprecedented enzymatic oxidation of fullerene in aqueous medium, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 50 (2012) 119–126. <https://doi.org/10.1002/pola.24995>.
- [176] E.V. Litasova, V.V. Iljin, A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev, M.A. Dumpis, L.B. Piotrovskiy, The biodegradation of fullerene C₆₀ by myeloperoxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.* 471 (2016) 417–420. <https://doi.org/10.1134/S1607672916060119>.
- [177] J.A. Brant, J. Labille, J.Y. Bottero, M.R. Wiesner, Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry, *Langmuir.* 22 (2006) 3878–3885. <https://doi.org/10.1021/la053293o>.
- [178] T. Li, C.Z. Zhang, X. Fan, Y. Li, M. Song, Degradation of oxidized multi-walled carbon nanotubes in water via photo-Fenton method and its degradation mechanism, *Chem. Eng. J.* 323 (2017) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.081>.
- [179] T. Li, C.Z. Zhang, D. Ding, X. Fan, Y. Li, Experimental and theoretical study on degradation of oxidized C₆₀ in water *via* photo-Fenton method, *Chem. Eng. J.* 334 (2018) 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.062>.
- [180] S. Trajković, S. Dobrić, V. Jaćević, V. Dragojević-Simić, Z. Milovanović, A. Đorđević, Tissue-protective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 58 (2007) 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.005>.
- [181] J. Grebowski, P. Kazmierska, G. Litwinienko, A. Lankoff, M. Wolszczak, A. Krokosz, Fulleranol C₆₀(OH)₃₆ protects human erythrocyte membrane against high-energy electrons, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 1528–1536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.005>.
- [182] M.A. Orlova, T.P. Trofimova, A.P. Orlov, O.A. Shatalov, Y.K. Napolov, A.A. Svistunov, V.P. Chekhonin, Fullerene and apoptosis, *Oncohematology.* 8 (2014) 65–71. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2013-8-1-65-71>.
- [183] P. Mroz, G.P. Tegos, H. Gali, T. Wharton, T. Sarna, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy

- with fullerenes, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 1139–1149. <https://doi.org/10.1039/b711141j>.
- [184] G. Jiang, F. Yin, J. Duan, G. Li, Synthesis and properties of novel water-soluble fullerene–glycine derivatives as new materials for cancer therapy, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 24. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5348-4>.
- [185] L.B. Piotrovskiy, E.V. Litasova, M.A. Dumpis, D.N. Nikolaev, E.E. Yakovleva, O.A. Dravolina, A.Y. Bepalov, Enhanced brain penetration of hexamethonium in complexes with derivatives of fullerene C₆₀, *Dokl. Biochem. Biophys.* 468 (2016) 173–175. <https://doi.org/10.1134/S1607672916030030>.
- [186] F.-Y. Hsieh, A. V. Zhilenkov, I.I. Voronov, E.A. Khakina, D. V. Mischenko, P.A. Troshin, S. Hsu, Water-soluble fullerene derivatives as brain medicine: Surface chemistry determines if they are neuroprotective and antitumor, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 11482–11492. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01077>.
- [187] S.M. Rezayat, S.V. Boushehri, B. Salmanian, A.H. Omidvari, S. Tarighat, S. Esmaili, S. Sarkar, N. Amirshahi, R.N. Alyautdin, M.A. Orlova, I.V. Trushkov, A.L. Buchachenko, K.C. Liu, D.A. Kuznetsov, The porphyrin–fullerene nanoparticles to promote the ATP overproduction in myocardium: ²⁵Mg²⁺-magnetic isotope effect, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1554–1569. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.07.030>.
- [188] N. Amirshahi, R.N. Alyautdin, S. Sarkar, S.M. Rezayat, M.A. Orlova, I. V. Trushkov, A.L. Buchachenko, D.A. Kuznetsov, Fullerene-based low toxic nanocationite particles (porphyrin adducts of cyclohexyl fullerene-C₆₀) to treat hypoxia-induced mitochondrial dysfunction in mammalian heart muscle, *Arch. Med. Res.* 39 (2008) 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.05.007>.
- [189] Y. Ma, Y. Li, M. Guan, C₈₄-carboxyfullerenes as efficient photosensitizers against cancer cells, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.216>.
- [190] Q. Liu, M. Guan, L. Xu, C. Shu, C. Jin, J. Zheng, X. Fang, Y. Yang, C. Wang, Structural effect and mechanism of C₇₀-carboxyfullerenes as efficient sensitizers against cancer cells, *Small.* 8 (2012) 2070–2077. <https://doi.org/10.1002/sml.201200158>.
- [191] W. Li, L. Zhao, T. Wei, Y. Zhao, C. Chen, The inhibition of death receptor mediated apoptosis through lysosome stabilization following internalization of carboxyfullerene nanoparticles, *Biomaterials.* 32 (2011) 4030–4041. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.008>.

- [192] M.L. Agazzi, M.B. Spesia, N.S. Gsponer, M.E. Milanesio, E.N. Durantini, Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a fulleropyrrolidine bearing a basic amino group and its dicationic analog against *Staphylococcus aureus*, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 310 (2015) 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.05.022>.
- [193] L. Huang, B. Bhayana, W. Xuan, R.P. Sanchez, B.J. McCulloch, S. Lalwani, M.R. Hamblin, Comparison of two functionalized fullerenes for antimicrobial photodynamic inactivation: Potentiation by potassium iodide and photochemical mechanisms, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 186 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.027>.
- [194] G.P. Tegos, T.N. Demidova, D. Arcila-Lopez, H. Lee, T. Wharton, H. Gali, M.R. Hamblin, Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers, *Chem. Biol.* 12 (2005) 1127–1135. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.08.014>.
- [195] M.B. Ballatore, M.B. Spesia, M.E. Milanesio, E.N. Durantini, Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Med. Chem.* 83 (2014) 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.077>.
- [196] L.-Y. Yang, S.-Y. Hua, Z.-Q. Zhou, G.-C. Wang, F.-L. Jiang, Y. Liu, Characterization of fullerene-protein interactions and an extended investigation on cytotoxicity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 157 (2017) 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.065>.
- [197] B. Belgorodsky, L. Fadeev, V. Ittah, H. Benyamini, S. Zelner, D. Huppert, A.B. Kotlyar, M. Gozin, Formation and characterization of stable human serum albumin–tris-malonic acid [C₆₀]fullerene complex, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 1058–1062. <https://doi.org/10.1021/BC050103C>.
- [198] H. Benyamini, A. Shulman-Peleg, H.J. Wolfson, B. Belgorodsky, L. Fadeev, M. Gozin, Interaction of C₆₀-fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 378–386. <https://doi.org/10.1021/bc050299g>.
- [199] P.A. Troshin, A.S. Astakhova, R.N. Lyubovskaya, Synthesis of Fullerenols from Halofullerenes, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 13 (2005) 331–343. <https://doi.org/10.1080/15363830500237192>.
- [200] A. Djordjević, M. Vojinović-Miloradov, N. Petranović, A. Devečerski, D. Lazar, B. Ribar,

- Catalytic preparation and characterization of $C_{60}Br_{24}$, Fuller. Sci. Technol. 6 (1998) 689–694. <https://doi.org/10.1080/10641229809350229>.
- [201] A. Hirsch, I. Lamparth, H.R. Karfunkel, Fullerene Chemistry in Three Dimensions: Isolation of Seven Regioisomeric Bisadducts and Chiral Trisadducts of C_{60} and Di(ethoxycarbonyl)methylene, Angew. Chemie Int. Ed. English. 33 (1994) 437–438. <https://doi.org/10.1002/ANIE.199404371>.
- [202] I. Lamparth, A. Hirsch, Water-soluble malonic acid derivatives of C_{60} with a defined three-dimensional structure, J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1994) 1727–1728. <https://doi.org/10.1039/C39940001727>.
- [203] S. V. Ageev, G.O. Iurev, N.E. Podolsky, I.T. Rakipov, L. V. Vasina, B.A. Noskov, A. V. Akentiev, N.A. Charykov, I. V. Murin, K.N. Semenov, Density, speed of sound, viscosity, refractive index, surface tension and solubility of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, J. Mol. Liq. 291 (2019) 111256. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111256>.
- [204] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A.A. Meshcheriakov, N.E. Podolsky, J.P. Vallejo, L. Lugo, I.T. Rakipov, A. V. Petrov, A. V. Ivanova, N.A. Charykov, K.N. Semenov, Physicochemical investigation of water-soluble $C_{60}(C_2NH_4O_2)_4H_4$ (C_{60} -Gly) adduct, J. Mol. Liq. 344 (2021) 117658. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117658>.
- [205] E.G. Vlakh, E.V. Grachova, D.D. Zhukovsky, A.V. Hubina, A.S. Mikhailova, J.R. Shakirova, V.V. Sharoyko, S.P. Tunik, T.B. Tennikova, Self-assemble nanoparticles based on polypeptides containing C-terminal luminescent Pt-cysteine complex, Sci. Rep. 7 (2017) 41991. <https://doi.org/10.1038/srep41991>.
- [206] I.N. Gaponenko, S. V. Ageev, G.O. Iurev, O.S. Shemchuk, A.A. Meshcheriakov, A. V. Petrov, I.L. Solovtsova, L. V. Vasina, T.B. Tennikova, I. V. Murin, K.N. Semenov, V. V. Sharoyko, Biological evaluation and molecular dynamics simulation of water-soluble fullerene derivative $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, Toxicol. Vitr. 62 (2020) 104683. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104683>.
- [207] V. V. Sharoyko, N.R. Iamalova, S. V. Ageev, A.A. Meshcheriakov, G.O. Iurev, A. V. Petrov, D.A. Nerukh, V.S. Farafonov, L. V. Vasina, A. V. Penkova, K.N. Semenov, *In Vitro* and *In Silico* Investigation of Water-Soluble Fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$: Bioactivity and Biocompatibility, J. Phys. Chem. B. 125 (2021) 9197–9212. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03332>.
- [208] C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van den Bergh, G. Wagnières,

- Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 45 (1998) 170–178. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00177-8).
- [209] L. V. Galebskaya, I.L. Solovtsova, E.B. Miroshnikova, I.A. Mikhailova, M.E. Sushkin, A. V. Razumny, A. V. Babina, V.A. Fomina, The importance of a photosensitizer bleaching registration for the evaluation of mechanism of preparation action on the photo-induced hemolysis, *Biomed. Photonics.* 6 (2017) 33–38. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2017-6-3-33-38>.
- [210] V. V. Sharoyko, O.S. Shemchuk, A.A. Meshcheriakov, L. V. Vasina, N.R. Iamalova, M.D. Luttsev, D.A. Ivanova, A. V. Petrov, D.N. Maystrenko, O.E. Molchanov, K.N. Semenov, Biocompatibility, antioxidant activity and collagen photoprotection properties of C₆₀ fullerene adduct with L-methionine, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 40 (2022) 102500. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102500>.
- [211] G.A. Glushnev, A. Kanbar, V.A. Keskinov, N.A. Charykov, K.N. Semenov, Z.K. Shaimardanov, B.K. Shaimardanova, N.A. Kulenova, D.G. Letenko, Solubility phase equilibrium in ternary system fullerenol C₆₀(OH)₂₄ and praseodymium salt: PrCl₃–C₆₀(OH)₂₄–H₂O at 25 °C, *Nanosyst. Physics, Chem. Math.* 11 (2020) 462–467. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2020-11-4-462-467>.
- [212] D. Cabaleiro, C. Gracia-Fernández, J.L. Legido, L. Lugo, Specific heat of metal oxide nanofluids at high concentrations for heat transfer, *Int. J. Heat Mass Transf.* 88 (2015) 872–879. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2015.04.107>.
- [213] M.A. Marcos, D. Cabaleiro, M.J.G. Guimarey, M.J.P. Comuñas, L. Fedele, J. Fernández, L. Lugo, PEG 400-based phase change materials nano-enhanced with functionalized graphene nanoplatelets, *Nanomater. (Basel, Switzerland)*. 8 (2017) 16. <https://doi.org/10.3390/nano8010016>.
- [214] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability, *Biochemistry.* 20 (1981) 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- [215] F. Awan, E. Bulger, R.M. Berry, K.C. Tam, Enhanced radical scavenging activity of polyhydroxylated C₆₀ functionalized cellulose nanocrystals, *Cellulose.* 23 (2016) 3589–3599. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1057-0>.

- [216] M. V. Parkhats, V.A. Galievsky, A.S. Stashevsky, T. V. Trukhacheva, B.M. Dzhagarov, Dynamics and efficiency of the photosensitized singlet oxygen formation by chlorin e₆: The effects of the solution pH and polyvinylpyrrolidone, *Opt. Spectrosc.* 107 (2009) 974–980. <https://doi.org/10.1134/S0030400X09120200>.
- [217] F. Vargas, Y. Díaz, Yartsev Viatcheslav, A. Marcano, Lappa Alexander, Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media, *Ciencia.* 12 (2004) 70–77. https://www.researchgate.net/publication/228372391_Photophysical_properties_of_novel_PDT_photosensitizer_Radachlorin_in_different_media.
- [218] Z.R. Huang, S.C. Hua, Y.L. Yang, J.Y. Fang, Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion, *Acta Pharmacol. Sin.* 29 (2008) 1094–1102. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00829.x>.
- [219] J. Tang, F. Luan, X. Chen, Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3210–3217. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.12.034>.
- [220] C. Ungurenasu, Pinteala, Dascalu, Binding fullereneol C₆₀(OH)₂₄ to dsDNA, *Int. J. Nanomedicine.* 4 (2009) 193. <https://www.dovepress.com/binding-fullereneol-c60oh24-to-dsdna-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>.

Saint Petersburg State University

Manuscript copyright

Meshcheriakov Anatolii Anatolevich

Functionalisation of fullerene C₆₀ for obtaining materials for biomedical purposes

Scientific specialisation 1.4.15. Solid state chemistry

PhD Thesis is submitted for the degree of Candidate of Chemical Sciences

Translation from Russian

Academic Supervisors:

Doctor of Chemical Sciences, Associate Professor,
Semenov Konstantin Nikolaevich

Doctor of Biological Sciences, Associate Professor,
Sharoyko Vladimir Vladimirovich

Saint Petersburg

2022

Table of contents

Introduction.....	168
Chapter 1. Literature Review.....	173
1.1. Features of the structure of fullerenes.....	173
1.2. Thermodynamic properties of fullerenes and their derivatives.....	177
1.3. Chemical properties of fullerenes.....	181
1.4. Physicochemical properties of solutions of fullerenes and their derivatives.....	184
1.5. Biological activity and prospects for the use of water-soluble fullerene adducts.....	187
1.5.1. Antioxidant and cytoprotective properties.....	187
1.5.2. Toxicity of fullerenes.....	192
1.5.3. Biodegradation of fullerenes.....	196
1.5.4. Radioprotective properties.....	197
1.5.5. Delivery of medicine.....	198
1.5.6. Antioxidant properties upon irradiation.....	200
1.5.7. Interaction with proteins.....	204
Chapter 2. Experimental part.....	205
2.1. Reagents and their characteristics.....	205
2.2. Synthesis of water-soluble C ₆₀ fullerene adducts.....	206
2.2.1. Synthesis of amino acid adducts of fullerene C ₆₀	206
2.2.2. Synthesis of polyhydroxylated fullerene C ₆₀ (OH) ₂₄	207
2.2.3. Synthesis of carboxylated fullerene C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃	207
2.3. Identification of water-soluble C ₆₀ fullerene derivatives.....	208
2.4. Study of the physicochemical properties of C ₆₀ fullerene adducts.....	209
2.5. Biocompatibility of C ₆₀ fullerene adducts.....	209
2.5.1. Spontaneous haemolysis.....	209
2.5.2. Platelet aggregation.....	210
2.5.3. Plasma coagulation haemostasis.....	210
2.5.4. Interaction with DNA.....	210
2.5.5. Antiradical activity.....	213
2.5.6. Cytotoxicity.....	213
2.5.7. Interaction with HSA.....	214
2.5.8. Esterase activity of HSA.....	214

2.5.9. Genotoxicity.....	214
2.5.10. Photobleaching.....	215
2.5.11. Interaction with collagen.....	215
2.5.12. Protective effect of C ₆₀ -Met in UV-damaged collagen.....	215
Chapter 3. Results and discussion.....	216
3.1. Identification of C ₆₀ fullerene derivatives	216
3.1.1. Identification of C ₆₀ fullerene derivatives with L-amino acids.....	216
3.1.2. Identification of polyhydroxylated fullerene C ₆₀ (OH) ₂₄	224
3.1.3. Identification of carboxylated fullerene C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃	227
3.2. Physicochemical properties of derivatives	232
3.2.1. Density of aqueous solutions of C ₆₀ -Gly	232
3.2.2. Speed of sound in aqueous solutions of C ₆₀ -Gly	239
3.2.3. Viscosity of aqueous solutions of C ₆₀ -Gly.....	243
3.2.4. Isobaric heat capacity	248
3.2.5. Size distribution of C ₆₀ -Gly nanoparticles in aqueous solution and ζ-potentials ...	250
3.3. Correlation of temperature and concentration dependences of density, viscosity and speed of sound of C ₆₀ -Gly aqueous solutions.....	252
Chapter 4. Study of the biocompatibility of water-soluble adducts of fullerene C ₆₀ with L-amino acids, fullerenol and carboxylated fullerene.....	256
4.1. Biocompatibility of fullerene C ₆₀ adducts with L-amino acids	256
4.1.1. Spontaneous haemolysis	256
4.1.2. Platelet aggregation.....	258
4.1.3. Interaction with DNA.....	259
4.1.4. Antiradical activity.....	262
4.1.5. Cytotoxicity.....	265
4.1.6. Interaction of C ₆₀ -Met with collagen	267
4.1.7. Protective effect of C ₆₀ -Met.....	270
4.2. Biocompatibility of carboxylated fullerene C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃	272
4.2.1. Spontaneous haemolysis	272
4.2.2. Platelet aggregation.....	273
4.2.3. Interaction with HSA	274
4.2.4. Antiradical activity.....	276

4.2.5. Photobleaching.....	278
4.2.6. Cytotoxicity.....	279
4.2.7. Genotoxicity.....	280
4.3. Biocompatibility of polyhydroxylated fullerene C ₆₀ (OH) ₂₄	281
4.3.1. Spontaneous haemolysis	281
4.3.2. Platelet aggregation.....	282
4.3.3. Plasma coagulation haemostasis	283
4.3.4. Interaction with HSA	283
4.3.5. Photobleaching.....	285
4.3.6. Interaction with DNA.....	286
4.3.7. Genotoxicity.....	288
Main results and conclusions	291
Acknowledgment	292
List of cited literature.....	293

Introduction

One of the most promising areas for the use of fullerenes and their derivatives is biology and medicine. This is due to the fact that fullerenes are highly reactive due to the presence of double bonds capable of attaching various radicals, and demonstrate high antioxidant activity, the ability to penetrate through the lipid bilayer, and modulate transmembrane ion transport [1–4].

The problem of fullerene solubility is particularly acute due to its potential use in medicine; it is practically insoluble in an aqueous medium ($<10^{-11}$ g/l) [5,6] which is due to its high hydrophobicity.

A great achievement in the chemistry of fullerenes is that in recent years approaches have been developed that allow the synthesis of fullerene adducts with water solubility acceptable for medical use: 10–200 mg/ml and more [1–3,7].

Since the beginning of the discovery of the preparative method for obtaining fullerene, an urgent task has been the synthesis of water-soluble fullerene adducts, which have a wide range of biological activity: antitumour [8], antiviral [9,10], antimicrobial [11], antioxidant [12], neuroprotective [13,14], photodynamic [15,16], membranotropic [17]; in addition, they can be used as inhibitors of enzymes and apoptosis, as well as radioprotectors (Fig. 1).

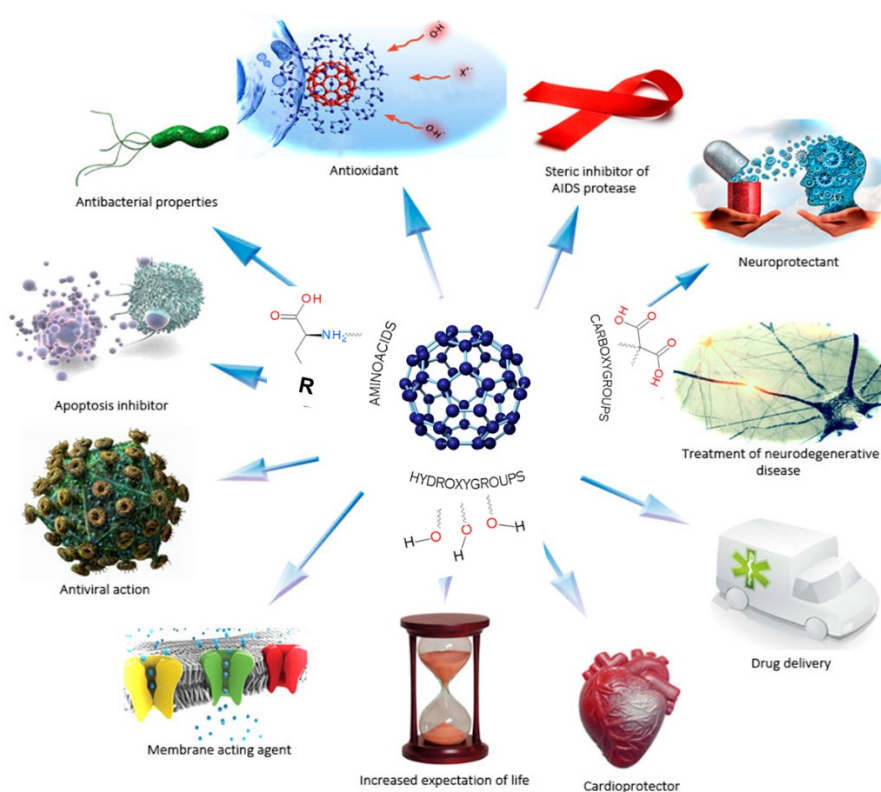


Fig. 1. Main biological properties of water-soluble fullerene adducts.

All this suggests that fullerenes and its derivatives can be the basis for the creation of new high-tech medical materials and drugs. For example, it was shown in [18,19] that fullerene derivatives can act as steric inhibitors of the protease of the HIV virus due to the insertion into the cavity of the active site of the enzyme (Fig. 2).

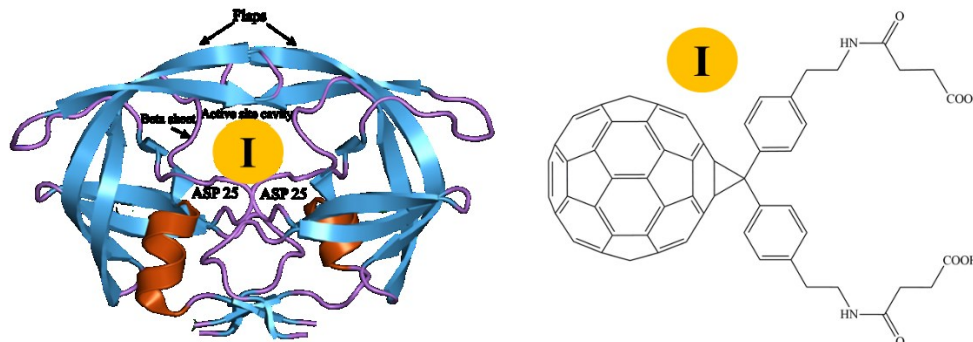


Fig. 2. Crystal structure of HIV-1 protease containing an inhibitor in the cavity.

Objective

The aim of the work is to develop methods for the synthesis, study of the physicochemical properties and biocompatibility of water-soluble adducts of fullerene C_{60} with L-amino acids (glycine, L-methionine, L-hydroxyproline, L-cysteine), fullerenol and carboxylated fullerene, which have prospects for use in nanobiomedicine.

To achieve this goal, the following tasks were solved:

1. Development of scalable one-step procedures for the synthesis of C_{60} fullerene adducts with L-amino acids.
2. Identification of the synthesised nanomaterials (adducts of C_{60} fullerene with L-amino acids, fullerenol and carboxylated fullerene) using a complex of physicochemical methods: IR, UV, ^{13}C NMR spectroscopy, elemental analysis, thermogravimetry, liquid chromatography.
3. Study of the physicochemical properties of aqueous solutions of the synthesised C_{60} fullerene adducts, namely: temperature and concentration dependences of density, viscosity, sound velocity, heat capacity, as well as the study of association processes in aqueous solutions.
4. Study of the biocompatibility of the synthesised water-soluble C_{60} fullerene adducts, including the study of cyto- and genotoxicity, haemocompatibility, and antioxidant activity.
5. Results of studying the UV photoprotective properties of the C_{60} adduct with L-methionine.

Scientific novelty of the results

1. One-stage scalable procedures for obtaining water-soluble C_{60} fullerene adducts with glycine, L-hydroxyproline, L-cysteine, and L-methionine have been developed, which make it possible to obtain the final product with a yield of more than 85 %.

2. An array of experimental data on the study of the physicochemical properties of solutions of the synthesised C₆₀ fullerene adducts is the basis for the creation of materials for biomedical purposes.

3. It was shown that the synthesised water-soluble adducts of fullerene C₆₀ with L-amino acids, fulleranol and carboxylated fullerene are biocompatible on the basis of data on the study of haemolysis, platelet aggregation, binding to human serum albumin (HSA), antioxidant activity, cyto- and genotoxicity.

4. Based on the study of the physicochemical properties and biocompatibility of adducts of fullerene C₆₀ with L-amino acids, fulleranol and carboxylated fullerene, it was found that the obtained nanomaterials can be used to create photoprotectors, antioxidants, coatings for heart valves and stents, systems for targeted drug delivery, bioimaging, and theranostics.

Reliability and approbation of research results

The results were published in seven papers in peer-reviewed scientific journals and presented at six international and all-Russian scientific conferences.

List of publications

1. V. V. Sharoyko, O. S. Shemchuk, A. A. Meshcheriakov, L. V. Vasina, N. R. Iamalova, M. D. Luttsev, D. A. Ivanova, A. V. Petrov, D. N. Maystrenko, O. E. Molchanov, K. N. Semenov, Biocompatibility, antioxidant activity and collagen photoprotection properties of C₆₀ fullerene adduct with L-methionine, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 40 (2022) 102500. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102500> (Q1, IF 6.458).

2. V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A. A. Meshcheriakov, N. E. Podolsky, J. P. Vallejo, L. Lugo, I. T. Rakipov, A. V. Petrov, A. V. Ivanova, N. A. Charykov, K. N. Semenov, Physicochemical investigation of water-soluble C₆₀(C₂NH₄O₂)₄H₄ (C₆₀-Gly) adduct, *J. Mol. Liq.* 344 (2021) 117658. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117658> (Q1, IF 6.633).

3. V. V. Sharoyko, N. R. Iamalova, S. V. Ageev, A. A. Meshcheriakov, G. O. Iurev, A. V. Petrov, D. A. Nerukh, V. S. Farafonov, L. V. Vasina, A. V. Penkova, K. N. Semenov, *In Vitro and In Silico* Investigation of Water-Soluble Fulleranol C₆₀(OH)₂₄: Bioactivity and Biocompatibility, *J. Phys. Chem. B.* 125 (2021) 9197–9212. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03332> (Q1, IF 3.466).

4. A. A. Meshcheriakov, G. O. Iurev, M. D. Luttsev, N. E. Podolsky, S. V. Ageev, A. V. Petrov, L. V. Vasina, I. L. Solovtsova, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, K. N. Semenov, Physicochemical properties, biological activity and biocompatibility of water-soluble C₆₀-Hyp adduct, *Colloids*

Surfaces B Biointerfaces. 196 (2020) 111338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111338> (Q1, IF 5.999).

5. V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A. A. Meshcheriakov, A. V. Akentiev, B. A. Noskov, I. T. Rakipov, N. A. Charykov, N. A. Kulenova, B. K. Shaimardanova, N. E. Podolsky, K. N. Semenov, Physicochemical study of water-soluble $C_{60}(OH)_{24}$ fulleranol, *J. Mol. Liq.* 311 (2020) 113360. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113360> (Q1, IF 6.633).

6. I. N. Gaponenko, S. V. Ageev, G. O. Iurev, O. S. Shemchuk, A. A. Meshcheriakov, A. V. Petrov, I. L. Solovtsova, L. V. Vasina, T. B. Tennikova, I. V. Murin, K. N. Semenov, V. V. Sharoyko, Biological evaluation and molecular dynamics simulation of water-soluble fullerene derivative $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, *Toxicol. Vitro.* 62 (2020) 104683. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104683> (Q2, IF 3.685).

7. K. N. Semenov, A. A. Meshcheriakov, N. A. Charykov, M. E. Dmitrenko, V. A. Keskinov, I. V. Murin, G. G. Panova, V. V. Sharoyko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, Physicochemical and biological properties of C_{60} -L-hydroxyproline water solutions, *RSC Adv.* 7 (2017) 15189–15200. <https://doi.org/10.1039/C6RA26621E> (Q1, IF 4.036).

List of conferences

1. Shemchuk O. S., Meshcheriakov A. A. Synthesis, identification and study of the biological activity of C_{60} fullerene modified with L-methionine. XXVIII International Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists ‘Lomonosov-2021’, Moscow, 2021.
2. Meshcheriakov A. A. Fullerene derivatives $C_{60}(Gly)_4$, $C_{60}(Lys)_2$, $C_{60}(Hyp)_2$: synthesis, identification, biological activity. LXXXI scientific and practical conference of students and young scientists ‘Topical issues of experimental and clinical medicine — 2020’, St. Petersburg, 2020.
3. Meshcheriakov A. A. Photoprotective effect of C_{60} fullerene derivative with L-hydroxyproline. VIII International Youth Medical Congress, St. Petersburg, 2019.
4. Meshcheriakov A. A. Study of the physicochemical properties and biological activity of C_{60} fullerene derivatives with L-lysine and L-hydroxyproline. IX Scientific and technical conference of students, graduate students, young scientists "Science Week - 2019", St. Petersburg, 2019.
5. Meshcheriakov A. A. Cytotoxicity and protein binding of C_{60} fullerene derivatives with L-lysine and L-hydroxyproline. VI Interuniversity competition-conference of scientific works of students named after A. A. Iakovkin (with international participation) ‘Physical chemistry as a basis of new technologies and materials’, St. Petersburg, 2018.

6. Pochkaeva E. I., Meshcheriakov A. A., IUriev G. O., Pechnikova N. A. Study of haemocompatibility of water-soluble adducts of light fullerenes *in vitro*. LXXIX Scientific and practical conference 'Actual issues of experimental and clinical medicine', St. Petersburg, 2018. **The work was supported** by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 19-315-90122) of the Russian Foundation for Basic Research.

Provisions for defence

1. A scalable one-stage procedure for the synthesis of water-soluble C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids, which makes it possible to obtain the final product with a yield of 85 %.
2. Identification of the synthesised C₆₀ fullerene adducts using physicochemical methods.
3. Data on the study of physicochemical properties of solutions in binary systems fullerene adduct C₆₀–water.
4. Results of *in vitro* biocompatibility studies of synthesised C₆₀ fullerene adducts.

Thesis structure

The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusion; the first chapter presents a review of the literature, the second chapter describes research methods, the third chapter discusses the results obtained on the synthesis, identification, physical and chemical properties, the fourth chapter discusses the results on the biological activity of water-soluble derivatives of C₆₀ fullerene. The dissertation is presented on 152 pages of typewritten text, contains 72 figures, 32 tables and 220 references.

The personal contribution of the author consisted in the synthesis and identification of adducts of fullerene C₆₀ with L-amino acids, fullerenol and carboxylated fullerene, the study of the physicochemical properties and biocompatibility of the synthesised compounds, the preparation of scientific publications.

Chapter 1. Literature Review

1.1. Features of the structure of fullerenes

Studies of closed carbon structures have been developing for more than three decades in the direction of studying higher homologues, spatial isomers, exohedral and endohedral complexes, starting with the most common spherically symmetric fullerene C_{60} . Being a truncated icosahedron with twenty hexagonal and twelve pentagonal faces, C_{60} has the most stable structure in comparison with molecules of the C_{70} , C_{76} , C_{78} , C_{80} , C_{82} , C_{84} series, etc. [20]. This gives advantages to C_{60} fullerene when used in biomedicine, and it is quite easy to convert it into a water-soluble form, for example, by adding hydroxyl groups. Attention to fullerenes as a basis for creating drugs is due to the following properties: size, lipophilicity, the presence of internal volume, chemical and photophysical properties. Fullerene C_{60} (Fig. 1.1) has a cubic structure $Fm\bar{3}m$ ($T > 260$ K) and $Pa\bar{3}$ ($T < 260$ K). Carbon cell diameter 7.1 Å, bond lengths C=C 1.391 Å, C–C 1.455 Å, distance between C_{60} molecules in crystals 3.1 Å, density $1.65 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, electron affinity 2.6–2.8 eV, ionisation energy 7.6 eV, band gap 1.9 eV, refractive index 2.2 (630 nm) [21].

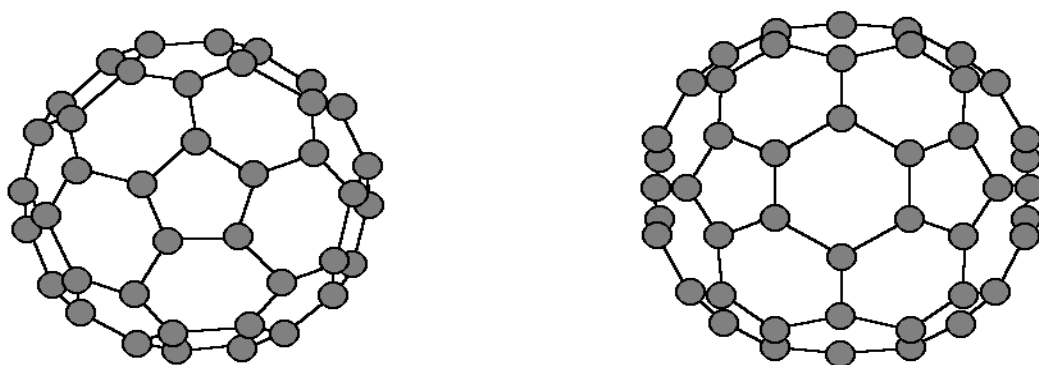


Fig. 1.1. Molecular structure of fullerenes C_{60} (left) and C_{70} (right).

In turn, fullerene C_{70} (Fig. 1.1) has a structure with an ellipsoidal shape, described by the symmetry group D_{5h} . Formally, the D_{5h} - C_{70} fullerene can be obtained from two halves of the C_{60} fullerene by inserting five pairs of carbon atoms in the equatorial plane. The total number of bonds between the atoms of this molecule is 105, among them eight groups of different bonds are distinguished (Fig. 1.2 and Table 1.1) [22]. The ‘height’ of the molecule is 7.8 Å. The equatorial part of C_{70} has a diameter of 6.94 Å.

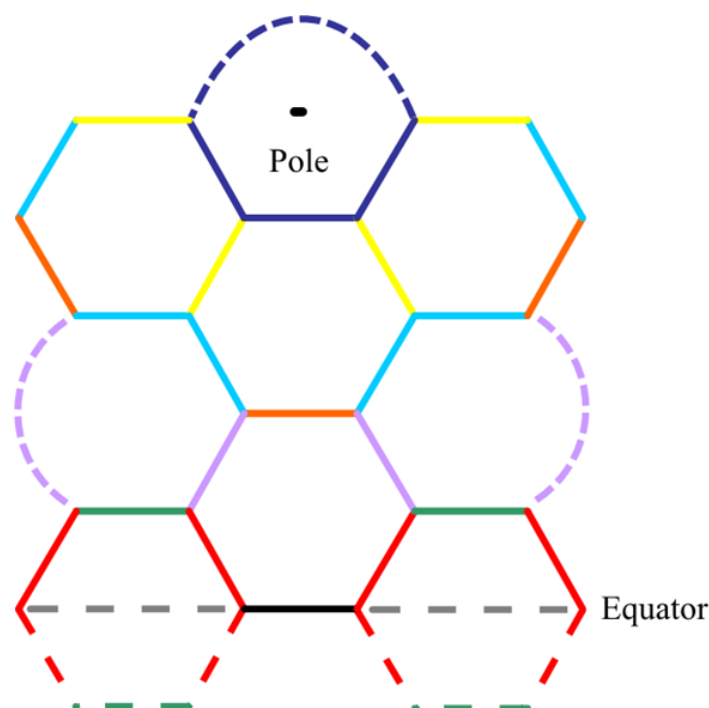


Fig. 1.2. Types of bonds in the C_{70} molecule (see Table 1.1).

Table 1.1. Characteristics of C–C bond types in the C_{70} molecule (Fig. 1.2) [22].

No.	Colour	Number of links of this type	Bond category	Bond length, nm
1	—	5	Hexagon–hexagon	0.141 ± 0.002
2	—	20	Hexagon–hexagon	0.139 ± 0.001
3	—	10	Hexagon–pentagon	0.147 ± 0.002
4	—	20	Hexagon–pentagon	0.146 ± 0.002
5	—	10	Hexagon–pentagon	0.137 ± 0.002
6	—	20	Hexagon–pentagon	0.147 ± 0.002
7	—	10	Hexagon–pentagon	0.137 ± 0.002
8	—	10	Hexagon–pentagon	0.1464 ± 0.00092

In the case of higher fullerenes, it is necessary to take into account the presence of structural isomers that are stable under the isolated-pentagon rule (IPR) surrounded by hexagons in the core [23]. The most stable are fullerenes C_{60} and C_{70} . Further, the number of isomers satisfying the IPR rule increases with the fullerene mass: five for C_{78} , seven for C_{80} , nine for C_{82} and 24 for C_{84} [23]. For endohedral fullerenes, the IPR rule continues to operate, but the transfer of electron density from the metal atom to the carbon cage affects the stability, electronic and magnetic properties of the molecule [24–27].

The dimensions of the C_{60} fullerene molecule are comparable to those of ordinary organic molecules and smaller than those of complex organic molecules. It follows from this that

fullerene molecules are quite compatible with biological targets, whether they are enzyme binding sites or receptor recognition sites. Therefore, it can be assumed that among the variety of biological structures there may be structures capable of complementary interactions with fullerene molecules.

An important characteristic of fullerene molecules, which determines their use, for example, in biology and medicine, is lipophilicity, which is estimated from the distribution coefficient of this substance between the lipophilic and hydrophilic phases ($\lg P$). Hansh *et al.* [28] introduced the constant π to quantify the relationship between structure and biological activity. Unmodified fullerene C_{60} has a high lipophilicity; its partition coefficient in the octanol–water system ($\lg P_{ow}$) is 6.67 [29]. In addition, the distribution constant for C_{60} adducts was calculated. For example, for the adduct of fullerene with benzoic acid ($\lg P > 4$), the constant π turned out to be greater than three, which indicates that the introduction of the fullerene residue leads to a strong increase in the hydrophobicity of benzoic acid [30]. Lipophilicity determines the membranotropic mechanism of the antiviral action of fullerene and its adducts, and also underlies the creation of sorbents based on it for protein affinity chromatography [10,31,32].

Of particular interest is the presence of internal volume in fullerene molecules and their ability to form endohedral compounds. As mentioned above, inside fullerene molecules (especially higher fullerenes C_{74} , C_{76} , C_{78} , C_{80} , C_{82} , C_{84}) there is enough space for metal atoms, clusters, and even small molecules [33–36].

An important property of endohedral fullerenes is that the metal atom embedded inside the fullerene core is isolated from the environment and is not capable of exhibiting a toxic effect. The basis of paramagnetic contrast agents used in magnetic resonance imaging is gadolinium Gd^{3+} . The disadvantage of conventional contrast agents (chelate complexes $Gd(III)$ -DTPA (Omniscan) or $Gd(III)$ -DOTA (ProHance)) is their instability and toxicity. In this compound, the gadolinium ion is located inside the carbon shell and cannot be toxic. But for the practical use of this class of compounds, it is necessary to create their water-soluble forms [37–39]. The prospects of these studies are due to the fact that endometallofullerenes (EMF) have the potential to be used in photodynamic therapy, hyperthermia, radiation and chemotherapy, as well as for antiviral treatment of blood products. Fullerenes with a unique electronic structure have pronounced donor-acceptor properties. When excited by a light quantum, they are able to act as electron donors [40], and in the ground state they exhibit electron-withdrawing properties [41].

The electronic structure of fullerenes makes possible the occurrence of radical addition reactions. Krusic *et al.* [41] showed that 34 methyl or 15 benzyl radicals attach to one C_{60} molecule, which allowed the authors to call this molecule a ‘radical sponge’. Since reactions involving free radicals in biological systems are predominantly oxidation reactions, one of the biological properties of fullerene C_{60} and its adducts is antioxidant activity. Fig. 1.3 shows an example of the interaction of fullerene C_{60} with benzyl radicals.

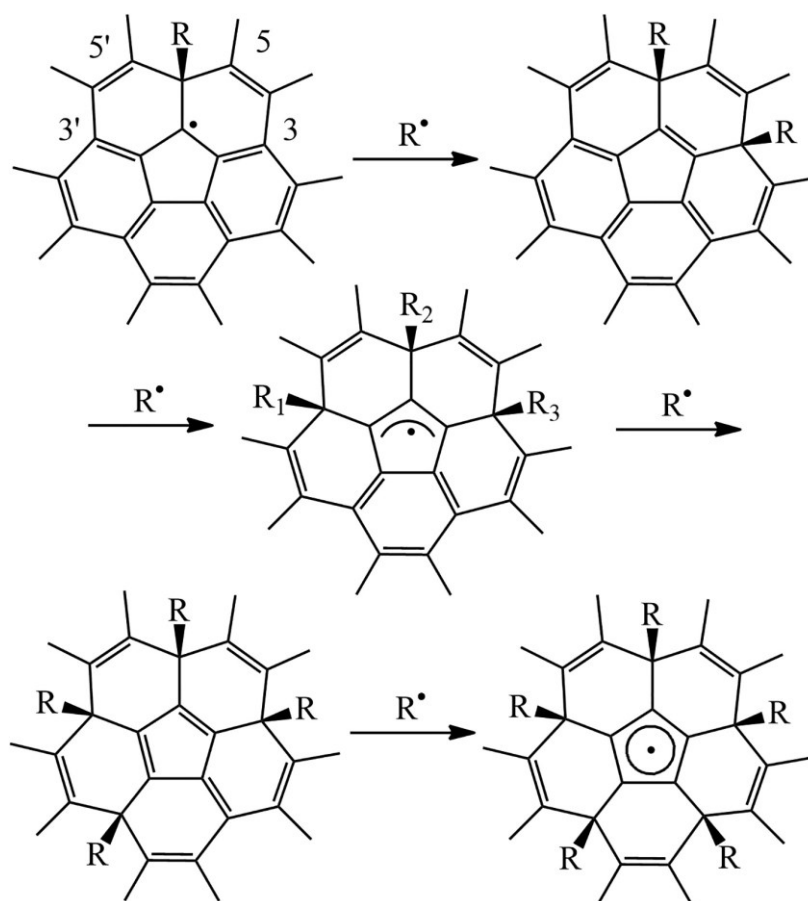


Fig. 1.3. Addition reaction of five benzyl radicals to a fullerene molecule.

The photophysical and chemical properties of fullerene are determined by the presence of conjugated double bonds in the molecule, i.e., they are the fundamental properties of the fullerene core itself. For example, under the action of visible or UV irradiation, fullerene molecules promote the conversion of triplet oxygen into singlet oxygen [42–44], thus acting as a “generator” of singlet oxygen. This is due to the fact that the C_{60} fullerene molecule in the ground state ($^1C_{60}$) upon irradiation with UV and visible light easily transforms into an excited singlet state ($^1C_{60}^*$), which transforms into an excited triplet state ($^3C_{60}^*$) with a high quantum yield. In turn, the excited triplet state ($^3C_{60}^*$) transfers energy to the ordinary triplet oxygen molecule 3O_2 , turning it into singlet oxygen 1O_2 [43,45,46]. Fullerene in the excited triplet state is an excellent electron acceptor, and the reduced triplet fullerene ($^3C_{60}$) can easily transfer an electron to

molecular oxygen, forming a superoxide radical anion (${}^{-}\text{O}_2^{\bullet}$). The formation mechanisms of ${}^{-}\text{O}_2^{\bullet}$ and singlet oxygen are presented in Fig. 1.4.

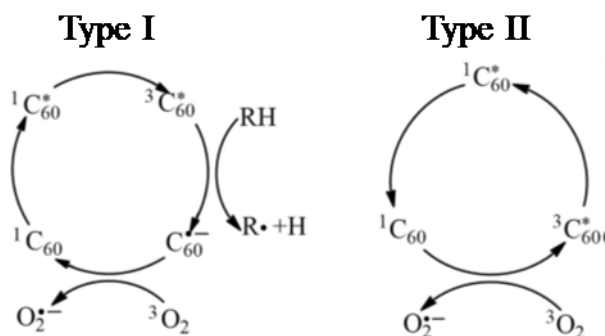


Fig. 1.4. Schemes of photochemical mechanisms: type I — charge transfer, type II — energy transfer.

The formation of singlet oxygen upon photoexcitation of fullerenes is an example of two conjugated reactions: the first is the transition of the triplet state ${}^3\text{C}_{60}^*$ to the ground singlet state ${}^1\text{C}_{60}$, and the second is the transformation of triplet oxygen ${}^3\text{O}_2$ into singlet ${}^1\text{O}_2$ using the transition energy ${}^3\text{C}_{60}^* - {}^1\text{C}_{60}$. An essential feature of this process is that, as a result of all reactions, the fullerene molecule does not undergo any chemical transformations and can repeatedly participate in this cycle, i.e., it acts as a kind of “catalyst” for the formation of singlet oxygen. It should be emphasised that this distinguishes it from many other photosensitisers whose molecules decompose upon the formation of singlet oxygen. Thus, the ability of one compound to act as both an antioxidant and a pro-oxidant confirms the uniqueness of light fullerenes.

1.2. Thermodynamic properties of fullerenes and their derivatives

Let us consider the main thermodynamic properties of light fullerenes C_{60} and C_{70} . Enthalpies of combustion and formation of fullerenes C_{60} and C_{70} under standard conditions, as well as entropy values, Gibbs energies and logarithms of the equilibrium constants of the reactions of formation of fullerenes C_{60} and C_{70} from graphite are given in Table 1.2.

Table 1.2. Enthalpies of combustion ($\Delta_c H^\circ$) and formation ($\Delta_f H^\circ$) of fullerenes C_{60} and C_{70} under standard conditions, as well as entropies ($\Delta_f S^\circ$), Gibbs energies ($\Delta_f G^\circ$) and logarithms of the equilibrium constants ($\lg K_f^\circ$) of the reactions of formation of fullerenes C_{60} and C_{70} from graphite [47].

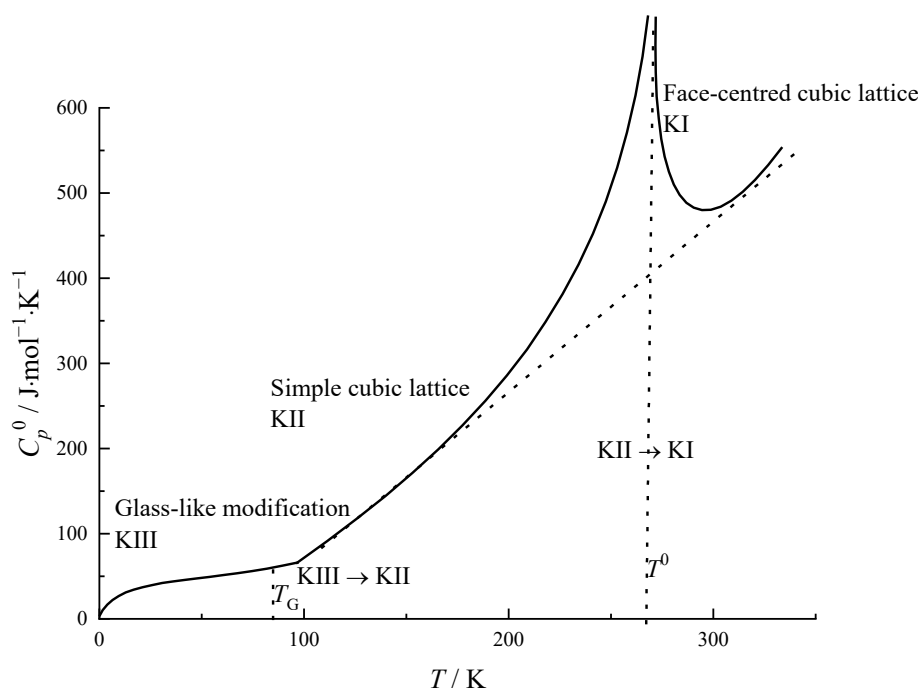
$\Delta_c H^\circ / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_f H^\circ / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_f S^\circ / \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\Delta_f G^\circ / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\lg K_f^\circ$
Fullerene C_{60}				

-25937 ± 17	2327 ± 16	420.8 ± 1.2	2202 ± 17	0.306
Fullerene C ₇₀				
-30101 ± 10	2555 ± 12	62.94 ± 1.41	2536 ± 12	-445

Fig. 1.5*a* shows the temperature dependence of the isobaric heat capacity of fullerene C₆₀. It can be seen that, depending on the temperature, C₆₀ fullerene exists in the following modifications: (i) plastic crystals (KI in Fig. 1.5*a*) with a face-centred cubic lattice, at the nodes of which C₆₀ molecules perform almost free rotation; (ii) crystals (KII in Fig. 1.5*a*) having a simple cubic lattice; (iii) glassy crystals (KIII in Fig. 1.5*a*). It can be seen that two phase transitions are observed in the range of 0–340 K: the second-order phase transition KIII→KII (at 86 K) and the first-order phase transition KII→KI (at 260.7 K). The thermodynamic functions of C₆₀ fullerene in a wide temperature range are presented in the works [47–53].

Fig. 1.5*b* shows the temperature dependence of the isobaric heat capacity of fullerene C₇₀. It can be seen that, depending on the temperature, the fullerene C₇₀ exists in the following modifications: (i) crystals (KI in Fig. 1.5*b*), which have a hexagonal lattice, at the nodes of which the C₇₀ molecules perform almost free rotation; (ii) hexagonal crystals (KII in Fig. 1.5*b*) characterised by orientational ordering of C₇₀ molecules in the crystal lattice; (iii) monoclinic crystals (KIII in Fig. 1.5*b*), in which a complete orientational ordering of C₇₀ molecules is observed. Thus, in the studied temperature range, the KIII→KII and KII→KI phase transitions are observed, which are difficult to qualify unambiguously. The thermodynamic functions of fullerene C₇₀ in a wide temperature range are presented in the works [54,55].

(a)



(b)

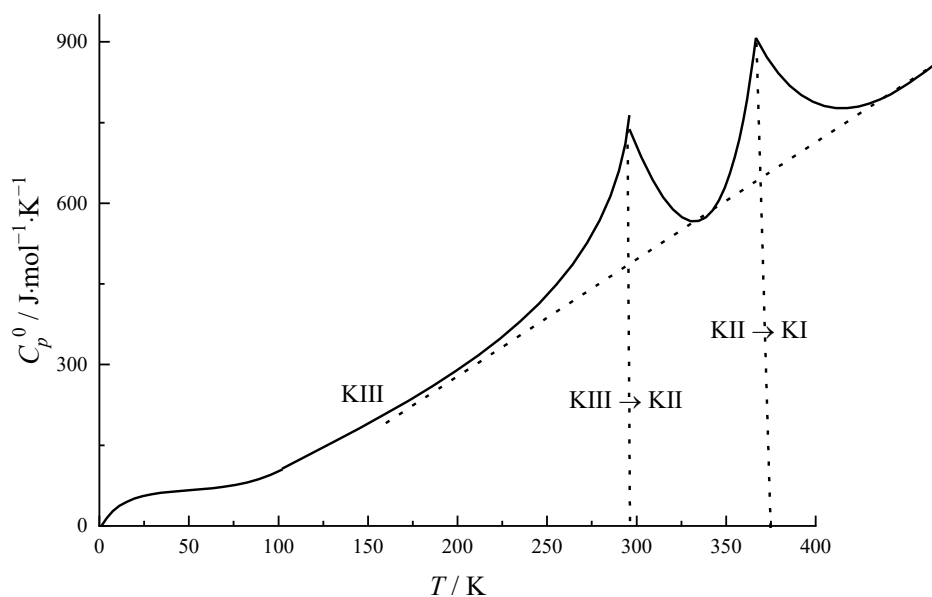


Fig. 1.5. Temperature dependences of the isobaric heat capacities of light fullerenes C_{60} — (a) and C_{70} — (b).

An analysis of the literature shows a limited number of works devoted to the thermodynamic study of derivatives of light fullerenes. Let us briefly dwell on the data obtained: — temperature dependences of isobaric heat capacity of $C_{60}Cl_{30} \cdot 0.09Cl_2$ crystal solvate [56], dimer complex $[(MeSi_3)_3C_{60}]_2$ [57], crystalline complexes of bis- $(\eta^6\text{-cumene})$ with chromium

fulleride[58], fullerene hydride $C_{60}H_{36}$ [59], monocarboxylated fullerene $C_{60}CHCOOH$ [60], water-soluble adducts of light fullerenes with L-lysine ($C_{60}(C_6H_{14}N_2O_2)_2$) [61], L-arginine ($C_{60}(C_6H_{14}N_4O_2)_8$) [62], water-soluble fullerenols $C_{60}(OH)_{40}$ [63] and $C_{70}(OH)_{12}$ [64] over a wide temperature range. In these works, the values of standard thermodynamic functions were calculated. As an example, Fig. 1.6 shows the experimental temperature dependence of the isobaric heat capacity of fulleranol $C_{60}(OH)_{40}$, as well as the temperature dependences of the isobaric heat capacity of $C_{60}(OH)_{40}$ with a uniform distribution of hydroxyl groups (uniform), and an isomer in which hydroxyl groups are located in the equatorial region (Saturn-like), calculated by the DFT method. It can be seen that, in contrast to fullerene C_{60} , the temperature dependence of the isobaric heat capacity does not show phase transitions.

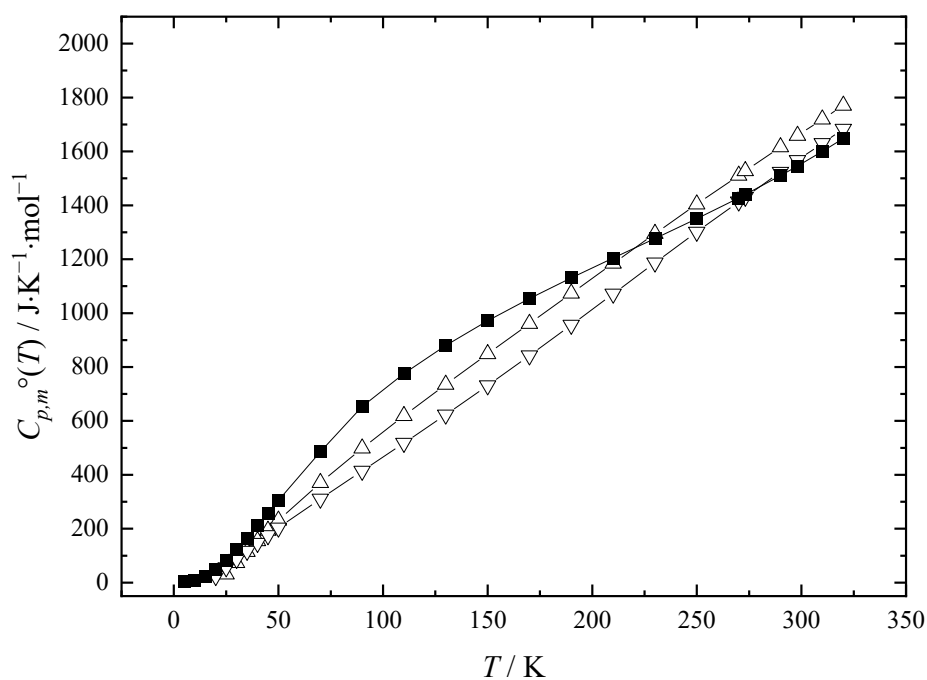


Fig. 1.6. Temperature dependence of the isobaric heat capacity of $C_{60}(OH)_{40}$ in the temperature range $T = 5\text{--}326$ K [64]. ■ — experimental data, ▽ — calculation by the DFT method for fulleranol with a uniform distribution of hydroxyl groups; △ — DFT calculation for fulleranol from fullerene, in which hydroxyl groups are located in the equatorial region.

— the authors of [65] used the Knudsen effusion method to study the temperature dependence of the saturation vapour pressure of the $C_{60}F_{18}$ derivative in the temperature range $T = 591\text{--}671$ K;

— the authors of [66] determined the standard molar enthalpy of combustion and calculated the standard molar enthalpies of formation in the solid and gaseous states of the derivative $C_{60}F_{48}$.

1.3. Chemical properties of fullerenes

As noted above, the C_{60} fullerene molecule has two types of bonds: between six-membered and five-membered rings (bonds 6–5) and shorter bonds between two six-membered rings (bonds 6–6), which are usually considered as double. The reason for the significant localisation of double bonds in the C_{60} fullerene molecule is the deviation of the double bond geometry from the normal planar one. Due to the rigidity of the fullerene framework, the cyclohexatriene fragments in the C_{60} molecule remain planar despite significant pyramidalisation. The stress resulting from pyramidalisation is the reason for the relatively high reactivity of fullerenes compared to other forms of carbon.

It is known that fullerenes are capable of forming several types of derivatives: exohedral (products in which the ligand is attached to the outer sphere of the fullerene), endohedral (products in which the ligand is contained inside the fullerene molecule), homofullerenes (formed when one or more bonds of the fullerene skeleton are broken), and fullerides (charge-transfer complexes) [67].

Fullerenes are characterised by nucleophilic addition reactions, radical addition reactions, cycloaddition reactions, electrophilic addition reactions, electron transfer reactions, etc. A diagram illustrating the chemical properties of fullerenes using C_{60} fullerene as an example is shown in Fig. 1.7.

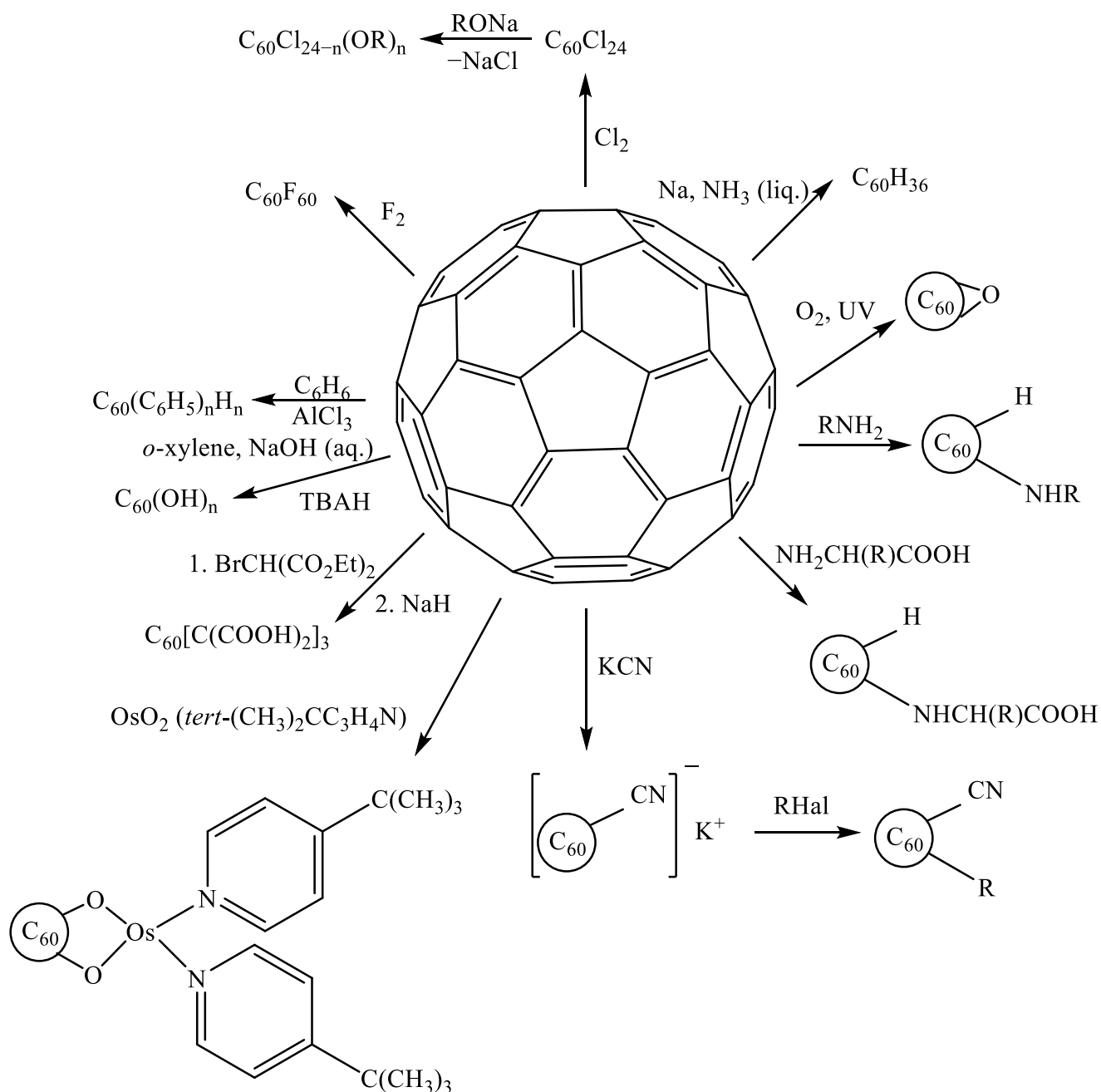


Fig. 1.7. Chemical properties of fullerenes on the example of C_{60} [68,69].

A separate promising area is the development of methods for the functionalisation of EMF, since these methods underlie the production of promising materials for biomedical purposes (theranostics, contrast agents). EMF reactions fall into three main classes: EMF core-opening reactions, selective EMF bifunctionalisation, and single-binding EMF functionalisation (Fig. 1.8) [70].

(a)

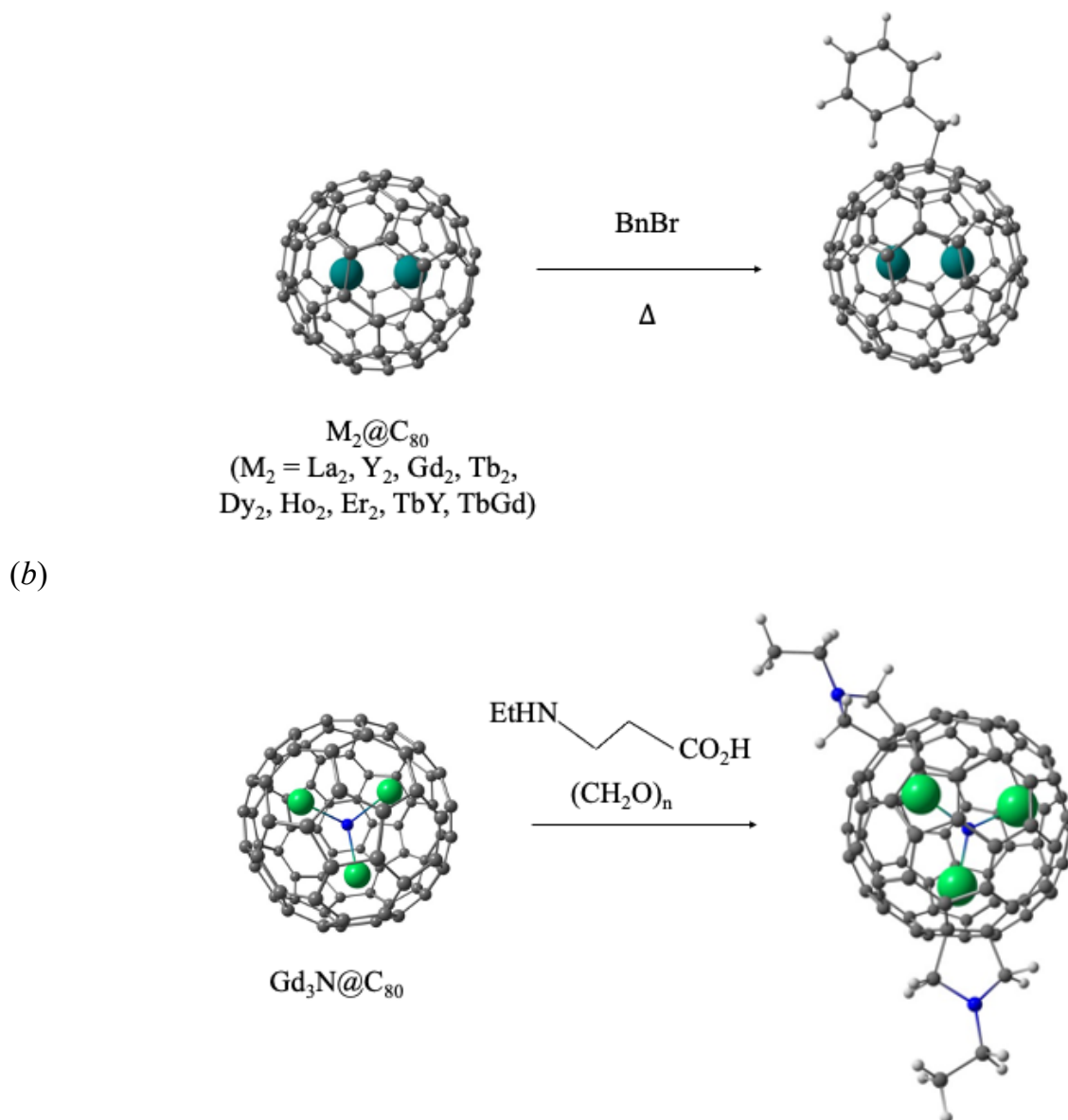


Fig. 1.8. Examples of EMF functionalisation reactions with single binding (a) and selective bifunctionalisation (b) [70].

Among the various ways of functionalising fullerenes, the core opening reactions allow access to the interior of the ‘blocked’ carbon sphere. Woodle et al. first introduced the concept of creating a hole in a carbon skeleton in 1995 (Fig. 1.9) [71].

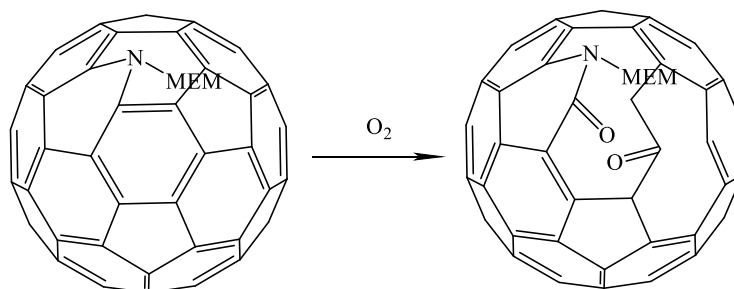


Fig. 1.9. Reaction with the opening of the carbon skeleton [71].

Since then, several reactions have been developed with the discovery of C_{60} and C_{70} . An important result is the fact that open-cage fullerenes are available that allow the encapsulation of small molecules such as H_2 [72], H_2O [73], HF [74] and even CH_4 [75]. As an example, Fig. 1.8a shows the reaction of the endohedral metallofullerene $La_2@D_2C_{72}$ with 5,6-diphenyl-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazine [76].

Functionalisation of EMF with single binding is the most common way to functionalise EMF. This is how the main classes of adducts are obtained: fullerlenols and carboxylated adducts. Based on EMF with gadolinium, water-soluble esters, $Gd@C_{2n}(C(COOC_2H_5)_2)_x$ were obtained and identified using a DMF extract of $Gd@C_{2n}$ [77]. Also, using the Bingel reaction, a new malonic acid ester monoadduct $EMFGd@C_{82}[C(COOCH_2CH_3)_2]$ was synthesised (Fig. 1.10). The resulting product was purified by HPLC and then hydrolysed in an alkaline medium to a water-soluble $Gd@C_{82}[C(COONa)_2]$.

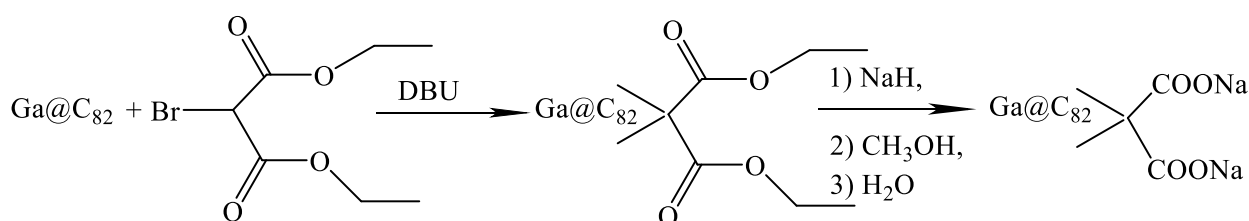


Fig. 1.10. Scheme for the synthesis of Bingel–Hirsch monoadducts $Gd@C_{82}$ [78].

Of the many methods for the functionalisation of fullerenes and EMF, the methods for obtaining fullerlenols containing from 1–4 to 40–45 hydroxyls on the fullerene surface are the most developed. Interest in the study of fullerlenols is due to the fact that these compounds exhibit antioxidant, antimutagenic, antitumor and other properties [4,64,79].

At present, the most promising for further practical application are adducts of light fullerenes with amino acids, peptides, as well as fullerlenols and carboxylated fullerenes. The study of these compounds has been carried out for many years at the Department of Solid State Chemistry of the Institute of Chemistry of St. Petersburg State University in the scientific group of Professor I. V. Murin. The main approaches to the synthesis of these compounds are summarised in several reviews published by our scientific group in Progress in Solid State Chemistry, Journal of Molecular Liquids [1–4].

1.4. Physicochemical properties of solutions of fullerenes and their derivatives

Fullerenes and endofullerenes are soluble in non-polar and weakly polar organic media, which is associated with the specifics of the structure and interactions of these objects with each other and with solvent molecules. Fullerenes C_{60} , bound in the lattice by van der Waals forces,

preferentially pass into media with aromatic molecules related to fullerenes in the structure of five- and six-membered cycles of the carbon framework. In aromatic hydrocarbons, π - π interactions between fullerene and solvent molecules play a significant role. Another important factor is the polarity of the solvent. For example, switching from benzene to dichlorobenzene has the effect of improving the solubility of C_{60} [5]. As a rule, fullerenes are organised into clusters consisting of 10^1 – 10^4 molecules, which leads to a nonlinear optical susceptibility [80], and a solvatochromic effect [81] in solutions. C_{60} Clustering has been observed in nonpolar aromatic solvents, benzene [78,82], and toluene [83], where, near the solubility limit, the aggregates grow exponentially in mass in time, but are easily destroyed when the solution is stirred. Structuring of C_{60} occurs not only in aromatic solvents, such as *o*-xylene [84,85], but also in the nonpolar solvent CS_2 [85]. The neutron scattering data showed that the solvation of fullerenes proceeds by growing a single layer of solvent molecules on their surface [85]. Therefore, the observed radius of gyration of fullerene C_{60} in CS_2 , $r_G = 0.391$ nm, is greater than its geometric radius $r = 0.348$ nm. This is consistent with a decrease in the rate of diffusion of fullerenes, which is retarded by the solvate shell. The formation of fullerene clusters has a threshold character depending on their concentration and the polarity of solvents (mixtures), which is determined by the dielectric constant ϵ [86]. Clustering of fullerenes was analysed by the methods of light, X-ray and neutron scattering, and optical absorption [87–90], studying the kinetics of aggregate growth and the relationship between their mass and size (fractal dimension). For example, for C_{60} in benzene, the growth of clusters with a fractal dimension of ~ 2.1 was recorded over times of ≤ 100 days [91]. Thus, the self-organisation of fullerenes in solutions is their fundamental property, which also extends to EMFs and their derivatives.

The study of phase equilibria in systems containing fullerenes is of great importance for developing methods for their isolation from fullerene soot or a fullerene mixture, for studying chemical reactions with their participation, and also for optimising the methods of their application. It should be noted that due to the incompatibility of individual fullerenes with water and aqueous solutions, the possibilities of their practical application are significantly limited. Therefore, the development of new methods for the functionalisation of fullerenes, leading to the production of water-soluble adducts, is topical. In turn, the study of their physical and chemical properties will make it possible to predict the possibilities of practical use in various fields of science and technology [92,93].

An analysis of the literature shows a limited amount of data on the physicochemical properties of solutions of water-soluble fullerene derivatives, while several areas of research can be distinguished:

— the authors of [1–3,60,61,63,64,83,97–107] studied the physicochemical properties of such fullerene derivatives as fullerenols, carboxylated fullerenes, derivatives of light fullerenes with L-amino acids and obtained experimental data on the concentration dependences of excess thermodynamic functions, heat capacities, densities, refractive indices, electrical conductivities, dissociation constants, apparent degree of dissociation, particle size distribution, diffusion coefficients, viscosity, etc., and studied solubility diagrams in binary and ternary systems containing water-soluble fullerene derivatives. The use of the semi-empirical VD-AS (Virial Decomposition Asymmetric Model) model for describing the thermodynamic behavior of water-soluble fullerene derivatives in fullerene-water adduct binary systems deserves special attention. This model is based on the virial expansion of the excess molar Gibbs energy of the solution in mole fractions of the components [93]:

$$\frac{G^{ex}}{RT} = (n_1 + n_2) \sum_{i=1} \sum_{j=1} x_1^i x_2^j \cdot \lambda_{ij} = \frac{\sum_{i=1} \sum_{j=1} n_1^i n_2^j \cdot \lambda_{ij}}{(n_1 + n_2)^{i+j-1}}, \quad (1)$$

where G^{ex} is total molar excess Gibbs energy of solution, $R = 8.31 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$, T is temperature (K), n_i and x_i are the number of moles and the mole fraction of the i -th component, respectively, λ_{ij} is ij -th virial coefficient in the expansion of $\frac{G^{ex}}{RT}$ in mole numbers of components, the upper summation limits are generally not limited and can be arbitrary.

Based on this model, excess thermodynamic functions and limits of loss of diffusion stability were calculated for binary systems containing fullerenols and adducts of light fullerenes with L-amino acids [94,96,99,104,105].

— several works are devoted to computer simulation of systems containing derivatives of light fullerenes with amino acids, namely: the study of reactions of C_{60} with amino acids, the calculation of dissociation constants (pK_a) of fullerene derivatives with amino acids, the study of the structure, spectral and thermodynamic characteristics, solvation mechanisms, optical properties, etc. [99,106,107].

1.5. Biological activity and prospects for the use of water-soluble fullerene adducts

1.5.1. Antioxidant and cytoprotective properties

In the last decade, the biological properties of fullerenols have become the subject of intensive research. Let us first dwell on the antioxidant and cytoprotective properties of one of the most studied fullerene adducts, polyhydroxylated fullerenes (fullerenol). Fullerene adducts can be considered promising compounds for the prevention and correction of ischemic damage. It is known that oxygen radicals play an important role in the pathogenesis of ischemic and reperfusion injury [108]. That is why a large number of studies of the antioxidant effect of various functionalised fullerenes, including fullerenols, were carried out on the ischemia-reperfusion model. For example, the antioxidant activity of fullerenol $C_{60}(OH)_{18-20}$ obtained according to [109] was demonstrated in experiments on small intestine transplantation in dogs [110]. It was found that both prophylactic and therapeutic injections reduced the level of free radicals formed as a result of post-ischemic reperfusion injury. The same effect of $C_{60}(OH)_{18-20}$ fullerenol was also demonstrated in ischemia-reperfusion injury of the intestine [110].

Tsai *et al.* [111] showed that fullerenol blocks hydrogen peroxide-induced inhibition of signalling by rat hippocampal neurons *in vitro*. The ability of $C_{60}(OH)_{24}$ to capture the nitroxide radical was demonstrated by Mirkov *et al.* [112]. Preliminary administration of $C_{60}(OH)_{24}$ to rats prevented the decrease in the activity of enzymes such as catalase, glutathione transferase, and glutathione peroxidase induced by the nitroxy-radical. Also, fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ reduced the formation of reactive forms of thiobarbituric acid, thereby exhibiting antioxidant properties. In terms of effectiveness, it was comparable to the action of such a well-known antioxidant as butylhydroxytoluene. There is evidence that in the test using the xanthine-xanthine oxidase system, fullerenol is able to capture the superoxide anion radical [112]. Zha *et al.* [113] showed that the directed biological action and possible toxicity of fullerenol are related to its local concentration. These data were obtained by studying the effect of various concentrations of fullerenol on cultured rat hippocampal neurons. At the same time, depending on the concentration, fullerenol either promoted cell death or protected them from damage. One of the possible mechanisms of the antioxidant action of fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ is its stimulating effect on the NRF2 transcription factor. NRF2 is a transcription factor that controls the expression of antioxidant enzymes. For example, the authors of [114] presented data indicating the cytoprotective and antiapoptotic properties of fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$, due to its ability to induce NRF2-dependent expression of genes encoding the enzymes hemoxygenase-1, NADPH:

quinine oxidoreductase 1, and γ -glutamate–cysteine ligase. Despite the fact that various biological effects of fullerenols have been established to date, little is known about their possible genotoxic effects. Analysis of chromosomal aberrations and blocking of cytokinesis showed that fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ at concentrations of 11–221 μ M does not have a genotoxic effect on Chinese hamster ovary cells [115].

The free radical scavenging effect and cytoprotective action of three fullereneol samples ($C_{60}(OH)_{6-12}$, $C_{60}(OH)_{32-34} \cdot 7H_2O$, and $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$) were studied on human keratinocytes (NaCaT) exposed to UV radiation [116]. It was found that damage to NaCaT caused by UVB (280–315 nm) or UVA (315–400 nm) was more strongly suppressed by fullereneol with the highest content of hydroxyl groups: $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$. As a result of UVB irradiation, the level of intracellular oxidative stress in NaCaT cells rapidly increased, cyclobutanepyrimidine dimers formed, and chromatin condensed. All these effects were suppressed in the presence of $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$. Thus, the damaging effect of UVB irradiation on keratinocytes can be prevented using fullereneol $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$, the cytoprotective effect of which is associated with the absorption of ROS.

When comparing the effects of fullereneol $C_{60}(OH)_{18-20}$ with the effects of ascorbic acid in order to elucidate the mechanism of its antioxidant action, it was found that both compounds inhibit the proliferation of rat vascular smooth muscle cells, human coronary artery smooth muscle cells, and some other cell types. It is noteworthy that fullereneol (to a greater extent than ascorbic acid) inhibited alloxan-induced formation of superoxide anion radicals and dose-dependently reduced the activity of cytosolic protein kinase C and tyrosine protein kinase [117]. It is possible that the suppression of vascular cell proliferation by fullereneol may be, at least in part, due to its ability to directly inhibit tyrosine protein kinase. The polyphenols curcumin, esculetin, scoparon, and baicalein are known to inhibit the proliferation of vascular smooth muscle and mononuclear cells *in vitro* [118–123]. This indicates the similarity of the biological activity of phenols and fullereneol, which, in principle, is a polyhydroxylated olefin.

Of particular interest are the pronounced prooxidant properties of fullerenes, which make it possible to use fullerenes as photosensitisers for PDT. Due to their photodynamic activity, fullerenes are potential antitumor agents. PDT is a method of local light activation of a photosensitiser that accumulates in a tumour, which, in the presence of tissue oxygen, leads to the development of photochemical reactions that destroy tumour cells. In oxygen deficiency,

fullerene is able to produce free radicals, which also leads to the death of the cell line of human laryngeal adenocarcinoma (Hep-2) through a caspase-3-dependent mechanism [124].

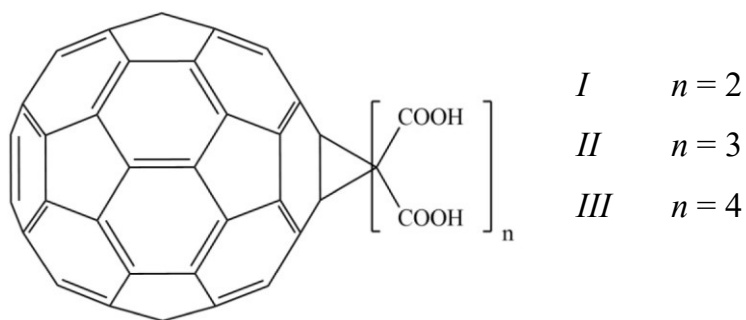
As a result of studying the mechanisms of the antitumor action of fullerenes, data were obtained on the ability of fullerenes and their adducts to cause damage to nucleic acids. At the same time, both native fullerenes solubilised with cyclodextrin [125], polyvinylpyrrolidone [126] and liposomes [127], and chemically modified fullerene adducts [128] caused DNA damage. It has been shown that fullerenes can cause DNA chain breakage only when irradiated with UV or visible light and in the presence of electron donors. In the dark, DNA damage does not occur, and in the absence of an electron donor, the photodynamic efficiency of fullerene drops sharply. It should be noted that DNA damage occurs precisely at guanosine residues [129], and damage can occur both through singlet oxygen and through superoxide anion radicals; no damage occurs in the absence of oxygen [130]. It has been established that the mechanism of photodynamic oxygen-mediated DNA damage is realised due to the cycloaddition reaction of an oxygen molecule to the purine base of guanosine with the formation of an unstable endoperoxide [131]. The course of subsequent reactions, as well as the composition of the final products, depend on the position of guanosine in the DNA double strand. Attempts have been made to create a hybrid fullerenol-oligonucleotide molecule for targeted delivery and damage to certain DNA regions due to the photodynamic action of the fullerene moiety.

The authors of [132] synthesised triple hybrid compounds of oligonucleotide- C_{60} -trimethoxyindole (an antibiotic and antitumor drug of the duocarmycin series) with the aim of specific binding to DNA sites and formation of stable triple helices. It has been shown that these compounds form triple helices with DNA, but the resulting complexes have low stability. As a result of photoexcitation, fullerene C_{60} and fullerenol $C_{60}(OH)_{18}$ can generate active oxygen and cause significant lipid peroxidation and protein oxidation in membranes. In addition to damage to aromatic amino acids in proteins due to the cycloaddition reaction, singlet oxygen is able to selectively react with the amino acids cysteine and methionine, since the sulphur atoms in their composition have a relatively high electron density [133].

It was shown on rat liver microsomes [134] that the photoinduced effect of fullerenol exceeds the effect of fullerene C_{60} , while the damaging agent in the photodynamic effect of C_{60} is singlet oxygen, and in the case of fullerenol $C_{60}(OH)_{18}$, it is the superoxide anion radical. These phenomena can be prevented by adding endogenous natural antioxidants (glutathione,

ascorbic acid and tocopherol) to the system under study. Antioxidant activity was also found in no less promising adducts of light fullerenes — carboxylated fullerenes.

Previously, it was believed that C_3 exhibits radical scavenging properties [12,13]. In [135], the photoinduced cytotoxicity of dimalonic acid C_{60} (*I*), trimalonic acid C_{60} (*II*), and quadromalonic acid C_{60} (*III*) was studied. In cultured HeLa cells, all these adducts ($C = 40 \mu\text{M}$) exhibited photoinduced cytotoxicity, which decreased with an increase in the amount of malonic acid residues. In the absence of illumination, no effects were observed. Dimalonic acid C_{60} showed a cytotoxic effect on HeLa cells under illumination, and this effect increased in a dose-dependent manner with increasing concentration. It was noted that as a result of the photoinduced action of compound *I*, significant cell damage occurred. In the absence of illumination, the cytotoxic effect of compound *I* was not observed even at a concentration of $60 \mu\text{M}$.



The same compounds were used to study the cytoprotective effect of carboxyfullerenes on myoblast cells (C2C12). Among these compounds, C_{70} quadromalonate effectively protected C2C12 cells from oxidative stress induced by H_2O_2 [136].

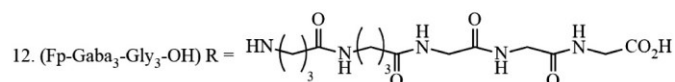
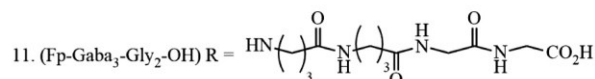
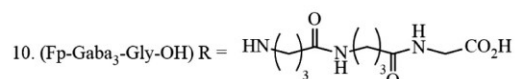
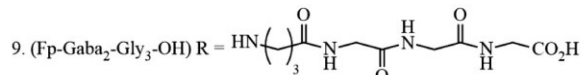
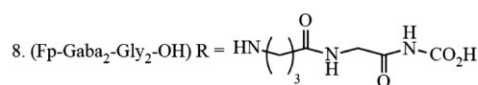
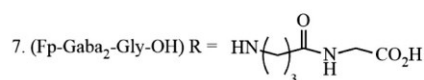
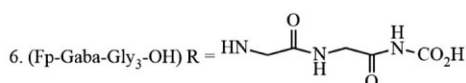
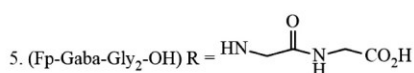
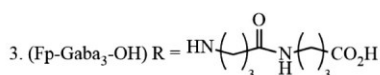
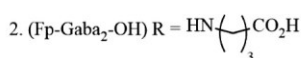
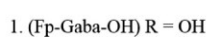
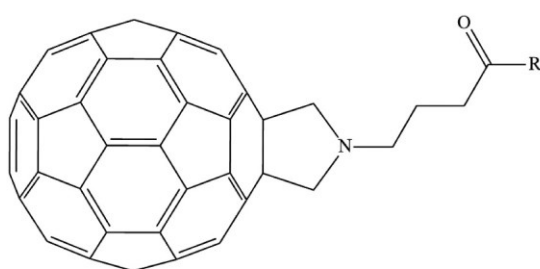
The authors of [137] compared the cytoprotective activity of twelve water-soluble C_{60} fullerene adducts on *Danio rerio* fish embryos. This series included C_3 , a series of monosubstituted dendrofullerenes, a series of C_3 -like fullerenes, and two oxoaminofullerenes. It was noted that C_3 had the strongest protective effect on the model of gentamicin-induced cytotoxicity.

The next class of compounds with antioxidant properties are fullerenes functionalised with various amino acids, peptides, and proteins. There are many approaches to obtaining fullerene amino acid adducts, including direct amination of fullerene with amino acids [32,138,139].

Adducts of fullerenes with peptides, due to the presence of a fullerene core, have the following set of properties: three-dimensional architectonics of molecules; high lipophilicity;

unique electronic properties. Conversely, the peptide moiety provides structural diversity depending on length and amino acid composition; realisation of various charge states; molecular recognition ability. At present, the question of the effect of the fullerene core on the transmembrane transport of adducts, as well as their effect on cell viability and antimicrobial activity, remains poorly understood.

Bjelaković *et al.* [140] conducted a comparative evaluation of the antioxidant activity of *N*-substituted fulleropyrrolidines containing a side peptide chain (*IV*) using the FOX antioxidant analysis. It is shown that all compounds have a more pronounced antioxidant activity than vitamin C.



IV

Oxidative stress is known to play an important role in the development of neurodegenerative diseases. Based on this, compounds with antioxidant activity are attracting the attention of researchers as potential drugs for the treatment of neurodegenerative diseases. Studies [141,142] have shown that the neuroprotective activity of functionalised fullerenes is due to their ability to act as ROS traps. There is evidence of a correlation between the neuroprotective efficacy of various carboxyfullerenes and their antioxidant activity [143]. Six different carboxyfullerenes, superoxide dismutase mimetics, were investigated. As a model for

evaluating the structural-functional relationship between superoxide reactivity and neuronal protection, the authors considered neurotoxicity mediated by NMDA receptors, which involve intracellular superoxides. A correlation has also been established between the neuroprotective activity of functionalised fullerenes and their dipole moment. In [144] it is stated that carboxyfullerene is a promising therapeutic agent for the treatment of Parkinson's disease due to its antioxidant properties, which was confirmed in *in vivo* studies on a model of Parkinson's disease in primates (*Macaque fascicularis*).

The neuroprotective activity of fullerene adducts also includes anti-amyloid action. According to the 'amyloid hypothesis' of the occurrence and development of Alzheimer's disease, polymerisation and deposition of β -amyloid is one of the main causes that disrupt the functioning, and subsequently the integrity of neurons.

1.5.2. Toxicity of fullerenes

The first studies of fullerene toxicity appeared in 1995–1996 [145,146]. When studying acute toxicity, it was shown that when fullerene was administered to mice at a dose of 2.5 g/kg, it did not cause death and behavioural disorders in experimental animals for eight weeks. Numerous further studies also did not reveal any undesirable or toxic manifestations during the action of fullerene on the body. According to the toxicological classification, substances that exhibit toxicity at doses above 1 g/kg belong to the class of non-toxic substances. Thus, the data on the introduction of crystalline fullerene at a dose of 2.5 g/kg indicate that this is a non-toxic compound [147].

It was shown in [148] that fullerenes do not irritate the skin and mucous membranes of the eyes, do not exhibit sensitising properties, and do not penetrate into the deeper layers of the skin. No significant toxic effects are observed with oral administration of fullerene, which indicates a low degree of absorption of fullerene from the gastrointestinal tract and its effective excretion.

When interacting with water, fullerene is able to form associates of various sizes and, accordingly, various degrees of toxicity. Therefore, along with the increasing attractiveness of fullerenes for medical applications, there is also some uncertainty about their toxicity and consequences of their use. Functionalisation of C_{60} with a decrease in apparent toxicity can significantly affect the nature of the interaction of fullerenes with biological systems [149]. Under certain conditions, C_{60} can cause lysis of human erythrocytes in a dose- and time-dependent manner, which could be stopped by the administration of *N*-acetyl-L-cysteine, which

indicates the role of ROS in this process [150]. It has been shown that C₆₀ fullerene in the form of an aqueous colloidal dispersion does not exhibit toxic properties, but exhibits only antioxidant properties [151]. This conclusion is based on more than a decade of biological tests of fullerene dispersions in various *in vitro* and *in vivo* experiments that did not reveal any toxic effects (at concentrations $C = 10^{-9}$ – 10^{-4} mol l⁻¹ and at total doses up to 25 mg/kg). Thus, the above data, obtained by different researchers on different models *in vitro* and *in vivo*, indicate that C₆₀, when applied topically and intraperitoneally, does not show acute toxicity.

To study chronic toxicity, a long-term experiment was carried out on rats [152], whose diet was supplemented with fullerene in the form of a solution in olive oil. Diets supplemented only with olive oil and water were used as controls. Fullerene almost doubled the lifespan of rats (Fig. 1.11).

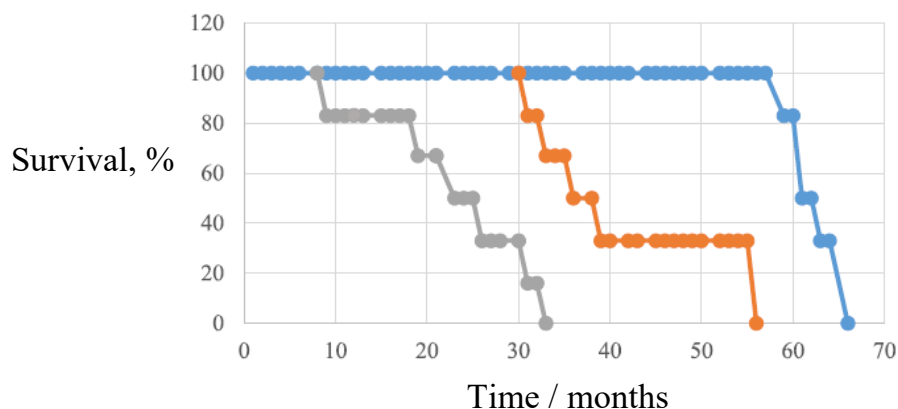


Fig. 1.11. Survival of rats fed with water (control group) (●), olive oil (●) and fullerene C₆₀ solution in olive oil (●).

Different diets did not affect the dynamics of animal weight, which also indicates the absence of toxic effects in C₆₀. An analysis of the mechanisms of action of solutions of C₆₀ in olive oil in an experimental model of rats with carbon tetrachloride showed that the effect on lifespan is mainly associated with the suppression of oxidative stress. Fullerenol C₆₀(OH)_{22–24} has a similar effect. Rats were preliminarily injected with C₆₀(OH)_{22–24} and then also exposed to carbon tetrachloride, which led to the formation of the trichloromethyl radical CCl₃• [153]. It is known that CCl₃• in the presence of oxygen forms trichloromethylperoxy radicals of the CCl₃OO• type, which lead to rapid oxidation of fats in cells. It was found that the preliminary administration of fullerenol C₆₀(OH)_{22–24} stopped the accumulation of serum markers of damage to these organs and, accordingly, the development of histological signs of damage to the liver and kidneys. In addition, pretreatment with fullerenol led to an increase in the reduced/oxidised

glutathione ratio. Thus, fullereneol $C_{60}(OH)_{22-24}$, being a trap for free radicals, has a nephro- and hepatoprotective effect, protecting liver and kidney cells from the toxic effect of carbon tetrachloride.

The authors of [154] studied the effect of $C_{60}(OH)_{24}$ fullereneol on a model of an isolated rat uterus. Also, when using a fullereneol solution, it reduced the activity of Cu/Zn-superoxide dismutase and prevented the induced increase in the activity of glutathione reductase in the presence of dimethyl sulphoxide.

The authors of [155] characterised the mechanisms of cytotoxicity of C_{60} fullerene and its polyhydroxylated fullereneol adduct against various cell cultures: L929 mouse fibrosarcoma cells, C6 rat glioma cells, and U251 human glioma cells. The cytotoxicity of fullerene was higher than that of fullereneol, while C_{60} caused rapid necrosis (by the mechanism of photoreactive oxidation) of cells without DNA fragmentation, and fullereneol induced apoptosis, DNA fragmentation, and damage to cell membranes. It can be assumed that, unlike fullerene, for which the photoinduced production of free radicals is the main mechanism of action on cells, the hydroxylated adduct in high doses apparently affects the intracellular molecular mechanisms of apoptosis associated with limited proteolysis processes triggered by caspase activation.

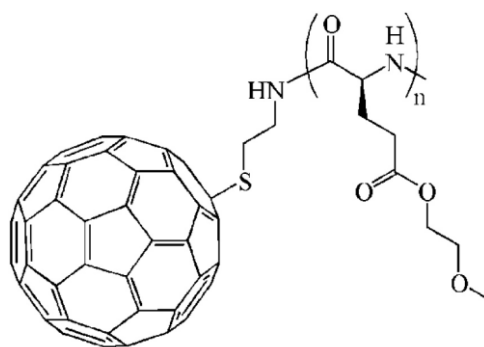
In vivo experiments have shown the potential protective function of $C_{60}(OH)_{24}$ fullereneol in the toxic effect of doxorubicin on liver, kidney, and heart cells [156–159]. The authors found that fullereneol exhibits the properties of hepato-, cardio- and nephroprotectors.

It is known that doxorubicin is a common anticancer drug, but its use is limited due to its low selectivity and cardiotoxicity. It was shown that the conjugate of doxorubicin with fullerene C_{60} accumulates in the nuclei of tumour cells much faster than doxorubicin without a vector. Penetration of the complex of doxorubicin with fullerene into cells increases by 20–30 % compared to that without fullerene. In experiments *in vivo* on mice with transplanted tumours, the complex of doxorubicin with fullerene C_{60} led to a 2.5-fold increase in lifespan and a decrease in tumour volume by 63 % compared to doxorubicin alone. It is important to note that the increase in the effectiveness of the drug did not lead to an increase in side effects, which was shown by morphological analysis.

To determine the potential toxicity of fullereneols, let us dwell on the results of work [160], in which human epidermal keratinocytes were exposed to fullereneols with low ($C_{60}(OH)_{20}$), medium ($C_{60}(OH)_{24}$), and high ($C_{60}(OH)_{32}$) hydroxyl content. groups in the concentration range $C = 0.0005$ – 42.5 $\mu\text{g/ml}$ for 24 and 48 h. A statistically significant decrease in cell viability was

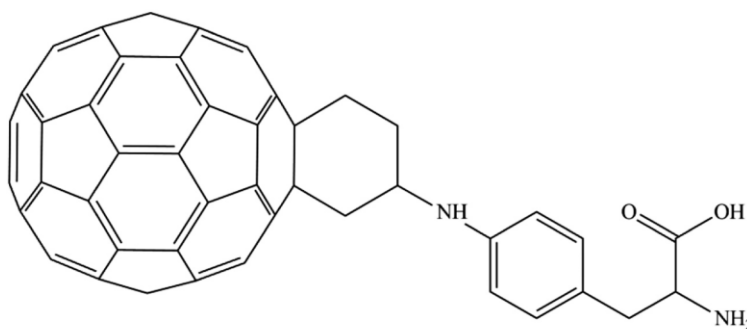
observed only when fullereneol with a high content of $C_{60}(OH)_{32}$ in 24 h. The authors came to the conclusion that various adducts of hydroxylated fullerenes do not cause inflammatory or cytotoxic effects when using solutions with a concentration of not more than $8.55 \mu\text{g/ml}$.

Xu *et al.* [161] studied the effect of C_{60} -GluEG (*V*) adduct at various concentrations and incubation for 12 and 24 h on the HeLa cell line and showed that C_{60} -GluEG also has low cytotoxicity and high biocompatibility.



V

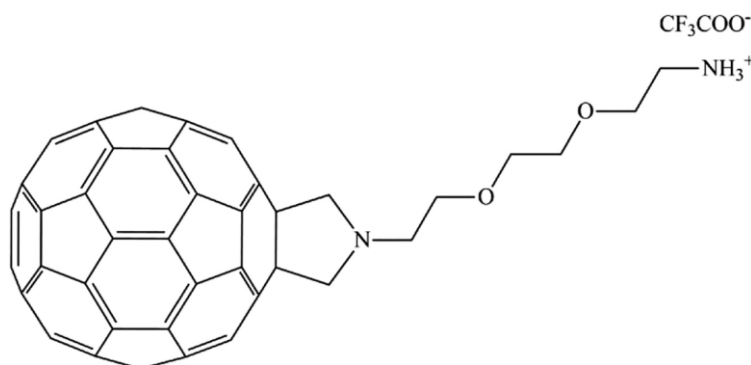
Rouse *et al.* [162] studied the effect of the fullerene peptide (Baa-Lys (FITC)-NLS) (*VI*) on the HEK-293 cell line in the concentration range $C = 0.00004\text{--}0.4 \text{ mg/ml}$. It was found that cell viability, measured by the MTT method after 48 h of incubation, significantly decreases ($p < 0.05$) at Baa-Lys (FITC)-NLS concentrations of 0.04 and 0.4 mg/ml.



VI

Lucafò *et al.* [163] conducted an *in vitro* study of the biological properties of the cationic adduct of fullerene (*VII*), belonging to the class of aminofullerenes, on a model of a cell line of human breast adenocarcinoma (MCF7). In the study of cytotoxicity, this adduct did not cause cell death. It was shown that, due to the presence of a hydrophilic chain, *VII* penetrates into MCF7 cells by passive diffusion and is evenly distributed in the cytoplasm of cells. It also does not accumulate in the nucleus and organelles regardless of the cell exposure time. Cationic fullerene does not penetrate into lysosomes and mitochondria of cells, which makes it possible

to limit and, in some cases, even avoid its enzymatic degradation. In this regard, functionalised fullerenes have broad prospects for use as carriers for targeted delivery of anticancer drugs to tumour cells.



VII

Thus, when assessing the toxicity of fullerene adducts, one should take into account not only the administered dose, but also a number of other parameters: the degree of aggregation, the method of solubilisation, the presence of cosolvents, the amount and structure of ligands.

1.5.3. Biodegradation of fullerenes

It is known that carbon nanostructures, namely nanotubes and graphene, undergo biodegradation [164]. For example, oxidised carbon nanotubes can be completely destroyed by plant enzymes such as horseradish peroxidase, etc. [165,166]. Aromatic molecules such as benzaldehyde, benzyl alcohol, catechol (1,2-dihydroxybenzene) and phloroglucinum (phloroglucinol, 1,3,5-trihydroxybenzene) have been identified in the degradation products. In turn, when studying the degradation of fullerene, different authors note the stability of the fullerene core [167–175]. Even the use of C₆₀ fullerene labelled with ¹⁴C atoms did not allow establishing its detectable transformation in the soil or in the body of worms, and it was noted that the size of the molecule itself prevents the capture of fullerene and its bioaccumulation [167]. An extremely slow mineralisation of ¹⁴C–C₆₀ in soil was shown in [168], where it was also noted that fullerene C₆₀ can accumulate in plants, especially in roots. During the biodegradation of fullerenes, the intermediate formation of fullerenols occurs predominantly [169–171]. The above works testify to the resistance of fullerene C₆₀ to the action of biological factors. In a number of studies, it was noted that in biological systems, fullerene undergoes changes under the influence of various substances, while the reactions proceed mainly on the surface of the nucleus with the formation of epoxides, hemiacetals, and hydroxyl adducts and do not lead to a violation of the topology of the molecule [172–175].

It was previously shown that under the influence of myeloperoxidase, an enzyme of mammalian neutrophils, there is a deep degradation of fullerene molecules C_{60} [176]. Nanosized molecular colloidal dispersions of C_{60} obtained by mixing C_{60} in a toluene solution with water using ultrasound were subjected to biodegradation [177]. This biodegradation, caused by the reaction of fullerene with hypochlorite generated by the enzyme, leads to the destruction of the fullerene core, the signs of which are a change in the colour of the solution, the disappearance of absorption in the region above 300 nm of the electronic (UV/Vis) spectrum and the disappearance of 'fullerene' bands in the IR spectra [176].

Photodegradation of nanotubes and fullerenes under the action of Fenton's reagent was studied in the works [178,179]. In both cases, the first stages of the process were the hydroxylation of both C_{60} fullerene and carbon nanotubes. Therefore, it is not surprising that subsequent transformations lead to polycyclic saturated adducts. In the case of nanotubes, 2-hydroxyethane-1,1,2-tricarboxylic acid, oxalic acid, and complete oxidation products are noted as end products — CO_2 and H_2O [178]. In the case of fullerene C_{60} , the resulting polycyclic fragments during ring opening lead to the formation of various hydroxyl-substituted α,ω -diacids, the further oxidation of which leads to the formation of acetic acid, ethanol and propylene, as well as oxidation products [179].

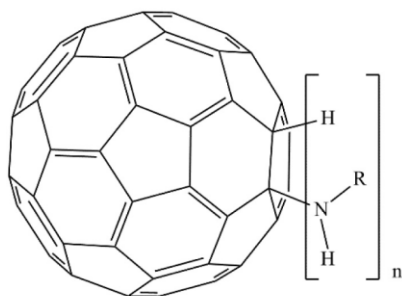
1.5.4. Radioprotective properties

Fullerenols can be used as radioprotectors. In [180], the effectiveness of fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$ ($C = 10$ and 100 mg/kg) and the standard radioprotector amifostine ($C = 300$ mg/kg) in protecting rats from exposure to ionising radiation was compared. It has been established that fulleranol is better than amifostine in preventing radiation-induced decrease in the level of leukocytes (granulocytes and lymphocytes), especially during the first seven days after irradiation. A pathomorphological study revealed that the radioprotective effect of fulleranol (compared to amifostine) is more pronounced in the spleen, small intestine and lungs, while amifostine surpasses fulleranol in radioprotective properties in protecting the heart, liver and kidneys.

The authors of [181] studied the ability of $C_{60}(OH)_{36}$ fulleranol to reduce damage caused by high-energy electrons (6 MeV) in human erythrocyte membranes. As a result of the studies, the authors found the following effects: reduction of post-radiation haemolysis, potassium efflux and oxidation of thiol groups, prevention of radiation-induced increase in membrane fluidity and

changes in protein conformation. It is concluded that the radioprotective properties of fullereneol are associated with its ability to absorb ROS.

As noted earlier, under certain conditions, fullerene adducts are able to protect cells from the action of ultraviolet radiation and other types of radiation [182,183]. Hu *et al.* [135] studied the biological effects of C₆₀ fullerene adducts with folacin (VIII) and the amino acids L-phenylalanine (VIII) and L-arginine (VIII) on the HeLa tumour cell line. It has been shown that when HeLa cells are irradiated with visible light, there is a decrease in the mitochondrial membrane potential, cell viability, activity of SOD, catalase, and glutathione peroxidase enzymes, which together leads to the activation of caspase-3 and, accordingly, to the launch of the cell apoptosis program.



1. R = CH₂COOH n = 1
2. R = *p*C₆H₄COOH n = 1
3. R = (CH₂)₅COOH n = 1
4. R = (CH₂)₅COONa
5. R = (CH₂)₃COOH n = 1
6. R = (CH₂)₅COONa
7. R = C₄H₆COOH
8. R = (CH₂)₂COOH n = 1
9. R = L,D-CH(CH₃)COOCH₃ n = 1
10. R = L,D-C(CH₂OH)COOH n = 1
11. R = L,D-C(=NH)NH(CH₂)₃CH(NH₂)COOH n = 1
12. R = CH₃-CH(CH₃)CHCOOH n = 1
13. R = C₅H₉NO₂S₂COOH n = 1
14. R = C₈H₈COOH n = 1
15. R = C₈H₅OCOOH n = 4
16. R = C₉H₁₀O₄SCO₂H n = 3

VIII

Jiang *et al.* [184] studied the biological effect of the fullerene-glycine (VIII) adduct on HeLa and Lm8 cell lines. As a result of the studies, it was found that the fullerene adduct with glycine upon irradiation ($\lambda = 500\text{--}600\text{ nm}$) causes dose-dependent death of the Lm8 cell line and induces apoptosis in the HeLa cell line. According to the authors, cell death occurs mainly due to damage to phospholipids and proteins of cell membranes. Under the action of light, the adduct of fullerene with glycine passes from an excited singlet state to an excited triplet state by a mechanism similar to that of unmodified fullerene. Then singlet oxygen instantly reacts with proteins, nucleic acids and membrane phospholipids, which leads to cell damage and death.

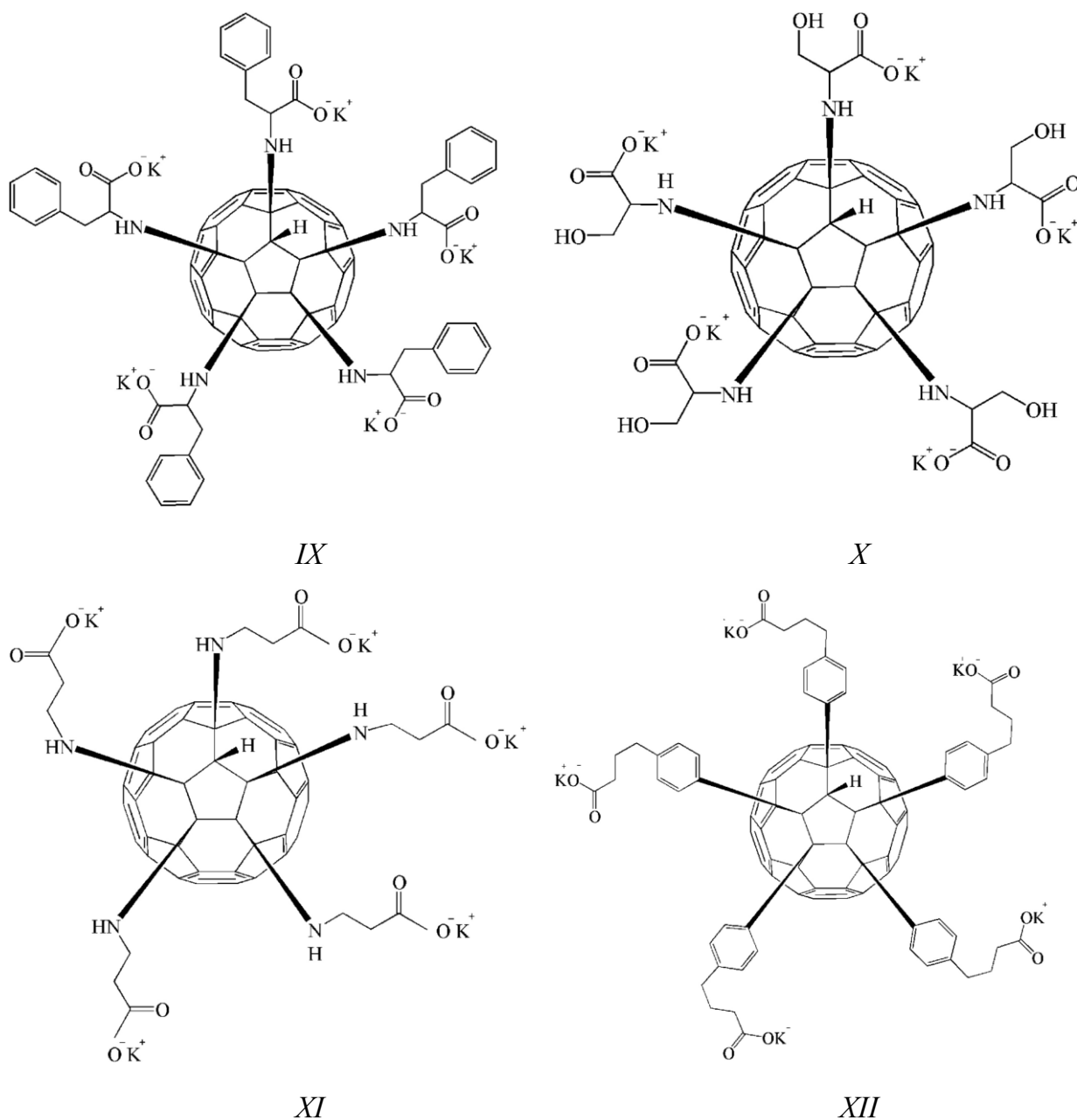
1.5.5. Delivery of medicine

One of the most important areas of modern medicinal chemistry and pharmacology is targeted drug delivery. The unique properties of nanomaterials based on light fullerenes and their

biological activity can be used for targeted delivery of drugs and vaccines to the central nervous system, to combat oncological, cardiological and other diseases.

Fullerene adducts with amino acids effectively penetrate the blood-brain barrier and act as drug carriers to the nervous tissue. An *in vivo* study [185] in mice and rats showed that the complex of C₆₀ fullerene with hexamethonium blocked the effects of the central N-cholinomimetic nicotine, exhibiting anticonvulsant activity and influencing locomotor activity induced by nicotine administration. The balance of hydrophilic and lipophilic properties of the supramolecular complex of hexamethonium with functionalised fullerenes suggests the possibility of creating systems for the delivery of polar substances to the CNS based on functionalised C₆₀ fullerene molecules.

The ability of fullerene adducts with amino acids to penetrate the blood-brain barrier and act as drug carriers into the nervous tissue was also described in [186]. In experiments *in vitro* and *in vivo*, the authors found that C₆₀ fullerene adducts with various amino acids: L-phenylalanine (*IX*), L-serine (*X*), and β -alanine (*XI*) and with γ -phenylbutyric acid residues (*XII*), suppress the proliferation of glioblastoma cells and reduce the rate of their growth in the *Danio rerio* fish model. It was also revealed that the C₆₀ fullerene adduct with L-phenylalanine inhibits the growth of glioblastoma without slowing down the recovery of neurons and without affecting neural stem cells. Presumably, the antitumor mechanism of action of C₆₀ fullerene adducts with amino acids is explained by their participation in the regulation of free radical processes. In particular, the C₆₀ fullerene adduct with γ -phenylbutyric acid had a significant effect on the proliferation of neural stem cells and their recovery, without affecting tumour growth. It should be noted that surface functional groups determine the properties and interactions of C₆₀ adducts with neural stem cells and glioma cells. The authors suggested that different terminal solubilising groups can affect the solubility, size, and self-assembly of water-soluble fullerene adducts with amino acids [186].



Fullerenes functionalised with porphyrins also have the ability to deliver drugs. In [187,188] the cardioprotective properties of ^{25}Mg -PMC16 were studied. This nanoparticle, having low toxicity, is suitable for targeted delivery of $^{25}\text{Mg}^{2+}$ cations necessary for activation of ATP synthesis to the heart muscle.

1.5.6. Antioxidant properties upon irradiation

The authors of [189] synthesised C_{84} fullerene adducts with two, three, and four malonic acid residues and tested them as photosensitisers for PDT on the HeLa cell line. Of all the studied adducts, the C_{84} fullerene modified with four malonic acid residues (quadromalonate) showed the highest efficiency. This compound was able to reduce HeLa cell proliferation by up to 80 % under the action of visible light (400–700 nm) in the presence of oxygen. In this regard, the

authors came to the conclusion that the synthesised fullerene quadromalonate has prospects as a phototherapeutic agent.

When studying the effectiveness of various water-soluble carboxyfullerenes as photosensitisers, six compounds were used: dimalonates C_{60} and C_{70} (DM), trismalonates C_{60} and C_{70} (TM), and quadromalonates C_{60} and C_{70} (QM) (Fig. 1.12). The assessment was carried out according to their photodynamic effect on HeLa cells [190]. It turned out that of the six carboxyfullerenes, TM70 turned out to be the most effective, and the general series in terms of the ability to cause photodynamic damage is as follows: TM70 > DM70 > QM70 > TM60 \approx DM60 > QM60.

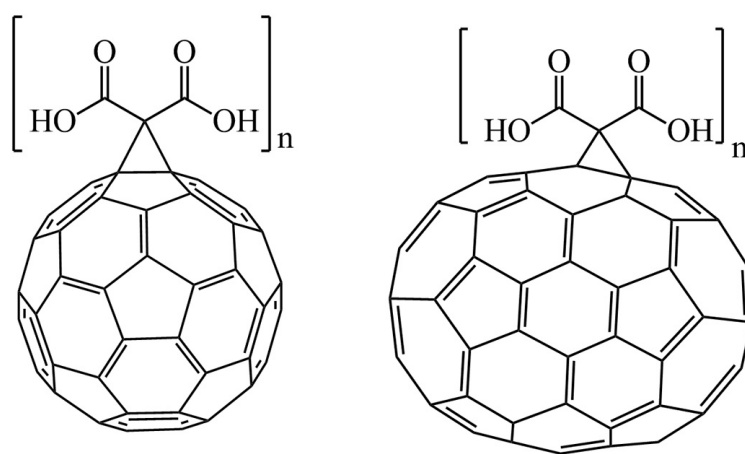
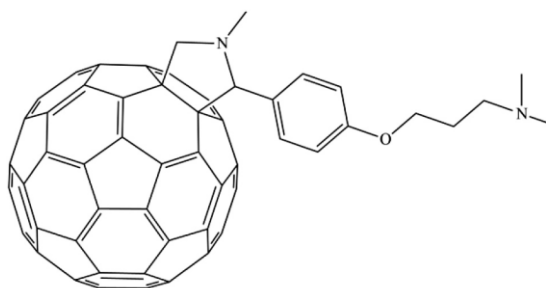


Fig. 1.12. Structures of C_{60} carboxyfullerenes (left) and C_{70} carboxyfullerenes (right) with different amounts of adducts ($n=2-4$).

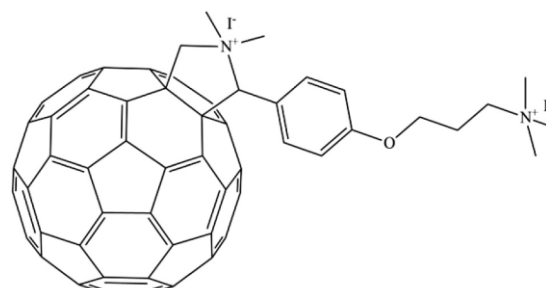
Therefore, given the high potential of these compounds for photodynamic therapy, the mechanism of their phototoxicity was studied. Experiments have shown that TM70 is phagocytosed by HeLa cells in the form of small clusters that accumulate predominantly in endosome-like organelles. The high PDT effect of TM70 observed in these studies is probably associated with the acidity of the environment in these organelles (for example, lysosomes), which contributes to the disaggregation of nanoparticles with the formation of smaller associates, down to individual molecules [191]. Direct measurements of the particle sizes of three C_{70} carboxyfullerenes by dynamic light scattering at a concentration of $2.5 \mu\text{M}$ in a nutrient medium showed that TM70 forms particles with a hydrodynamic diameter of about 52 nm, i.e., less than DM70 and KM70. Thus, it turns out that it is the pronounced 'size effect' for TM70 that can promote the formation of ROS and accelerate photoinduced cell death compared to DM70 and KM70. However, in these works, a detailed study of the structure of the studied compounds was

not carried out. Therefore, it cannot be ruled out that the work was carried out not with individual substances, but with a mixture of regioisomers.

Agazzi *et al.* [192] studied the photosensitising ability of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) inactivation with water-soluble aminoadducts of fullerenes. Compound MPC₆₀ (XIII) was obtained by 1,3-dipolar cycloaddition of azidamine to a C₆₀ fullerene molecule. Compound DPC₆₀²⁺ (XIV) was synthesised by a methylation reaction using DMSO. It was shown that the cationic form XIV is an effective photosensitiser during the decomposition of tryptophan. As a result of an *in vitro* study, photoinduced death of *S. aureus* cells was observed in the presence of 0.5 μM MPC₆₀ and DPC₆₀²⁺. The results of this work indicate the possibility of using these C₆₀ amino adducts for photoinactivation of microbial cells.

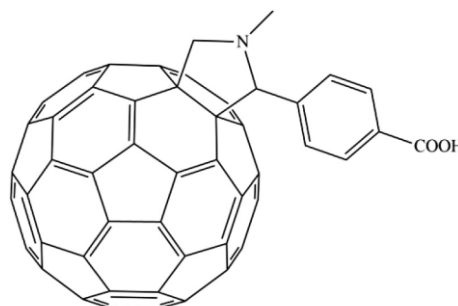
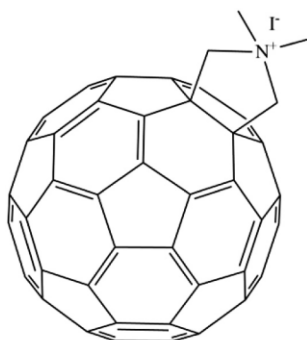


XIII



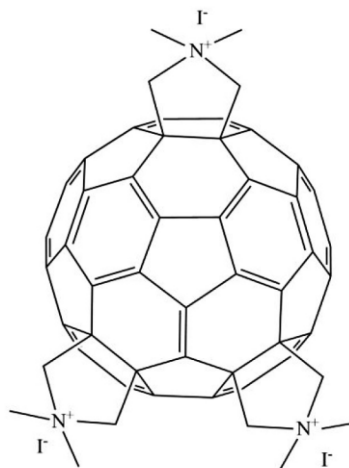
XIV

Huang *et al.* and Tegos *et al.* studied the possibility of using water-soluble cationic fullerenes BB4 (XV), BB4-PPBA (XVI), and BB6 (XVII) as photosensitisers for antimicrobial PDT to kill infectious agents: bacteria, protozoa, fungi, and viruses [193,194]. The antimicrobial activity of cationic fullerenes *in vitro* was evaluated by PDT by adding gram-positive methicillin-resistant *S. aureus*, gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), and the fungus *Candida albicans* (*C. albicans*) to cell suspensions. Using *S. aureus* as an example, it was found that compounds XV and XVI have high activity, and compound XV exhibits greater activity due to its higher solubility and lower tendency to form associates. Moreover, compounds XV and XVI do not inhibit the growth of *E. coli* and *C. albican*.



XV

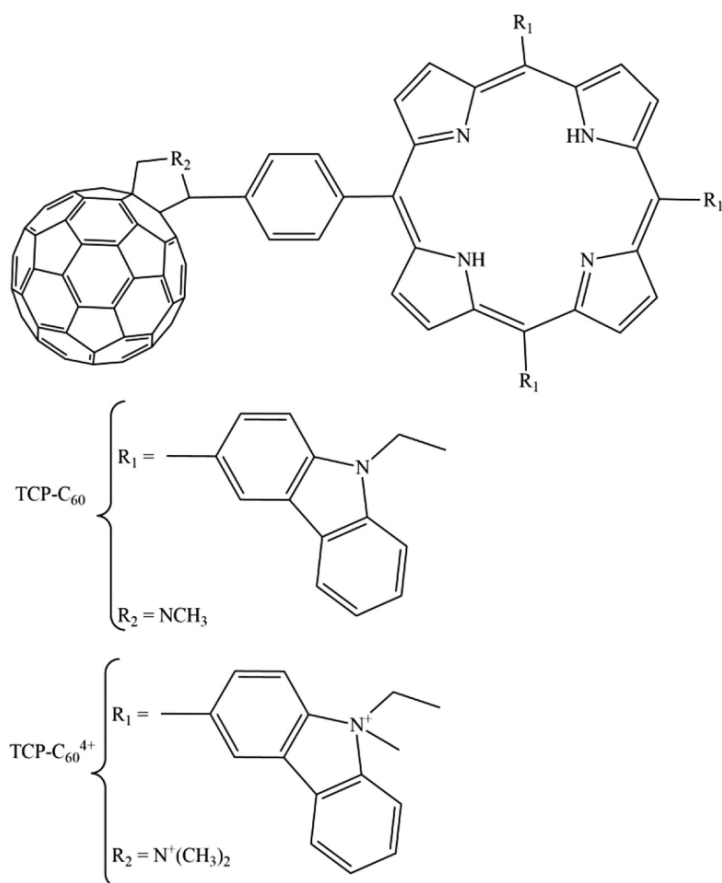
XVI



XVII

The development of the concept of using fullerene adducts as promising photodynamic agents that cause DNA cleavage and have a cytostatic effect is associated, among other things, with the development of systems for targeted delivery of a photosensitiser (using a fullerene core) to DNA [147].

The authors of [195] studied fullerene-porphyrin dyads: TCP-C₆₀ and TCP-C₆₀⁴⁺ (XVIII) as photosensitisers for photoinactivation of *S. aureus*. *In vitro* studies have shown that both dyads have a phototoxic effect *in vitro*, and for TCP-C₆₀⁴⁺ it was greater than for TCP-C₆₀.



XVIII

1.5.7. Interaction with proteins

The interaction of C₆₀(OH)₄₄ fullereneol with bovine serum albumin (BSA) and γ -globulin was studied in [196]. It was found that C₆₀(OH)₄₄ is able to effectively quench the internal fluorescence of proteins by a dynamic mechanism. Binding constants were calculated from the fluorescence quenching data (the values are on the order of 10⁴). It has been established that the binding of fullereneol to proteins is an exothermic process. The cytotoxicity of the studied fullereneol on the gastric epithelium cell line GES-1 was also studied and it was found that it can have a toxic effect in the absence of bovine serum in the culture medium. The authors note that the addition of γ -globulins contributed to a decrease in the toxic effect of fullereneol.

There is direct evidence for the formation of supramolecular complexes of proteins and fullerenes [197]. In particular, docking of carboxyfullerene C₃ with four proteins (HIV protease, fullerene-specific antibodies, HSA and BSA) was carried out in [198]. The main conclusion from the work was that a high degree of binding site homology was found in HIV, HSA, and BSA proteases.

Chapter 2. Experimental part

2.1. Reagents and their characteristics

Chemical reagents used for the synthesis of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids, fullerenol, carboxylated fullerene, as well as reagents used to study the biocompatibility of the synthesised substances, are presented in Table. 2.1.

Table 2.1. Characteristics of the reagents used.

Reagent	Supplier/manufacturer	Purity/qualification
C ₆₀ Fullerene	RPC 'NeoTechProduct'	99.9 %
<i>o</i> -Xylene	JSC VEKTON	extra pure
Sodium hydroxide	JSC VEKTON	extra pure
Glycine	Sigma-Aldrich	98 %
L-Hydroxyproline	Sigma-Aldrich	98 %
L-Methionine	Sigma-Aldrich	98 %
L-Cysteine	Sigma-Aldrich	98 %
Argon	Lenspetsgaz LLC	99.999 %
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	Sigma-Aldrich	99 %
Diethylbrommalonate	Sigma-Aldrich	92 %
Bromine	JSC VEKTON	for synthesis
Iron(III) bromide	Sigma-Aldrich	98 %
Sodium hydride	Sigma-Aldrich	90 %
Sulphuric acid	JSC VEKTON	extra pure
ADP	Sigma-Aldrich	95 %
Diazabicycloundecene (DBU)	Sigma-Aldrich	99 %
Warfarin	Sigma-Aldrich	>97 %
Ibuprofen	Sigma-Aldrich	>98 %
Digitonin	Sigma-Aldrich	>97 %
D-Glucose	JSC VEKTON	for synthesis
Citric acid	JSC VEKTON	extra pure
Sodium citrate	JSC VEKTON	for synthesis
<i>p</i> -Nitrophenylacetate	JSC VEKTON	99.5 %
HSA	Sigma-Aldrich	>98 %

DNA from salmon sperm with an average mass of 350 kDa (gel electrophoresis method)	TechnoMedService LLC	>98 %
Collagen	Biolot LLC	—

2.2. Synthesis of water-soluble C₆₀ fullerene adducts

2.2.1. Synthesis of amino acid adducts of fullerene C₆₀

The synthesis of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids was carried out in accordance with the developed procedure. To carry out the synthesis, sodium hydroxide (14.75 g) was dissolved in water (54 ml), after cooling the solution, L-amino acid (26.7 mmol) and ethanol (270 ml) were added. Then, a saturated solution of fullerene C₆₀ (1 g) in *o*-xylene (131.5 ml) was added to the resulting solution, and the reaction mixture was stirred at room temperature for seven days under argon. The reaction scheme of the interaction of C₆₀ fullerene with L-amino acids is shown in Fig. 2.1.

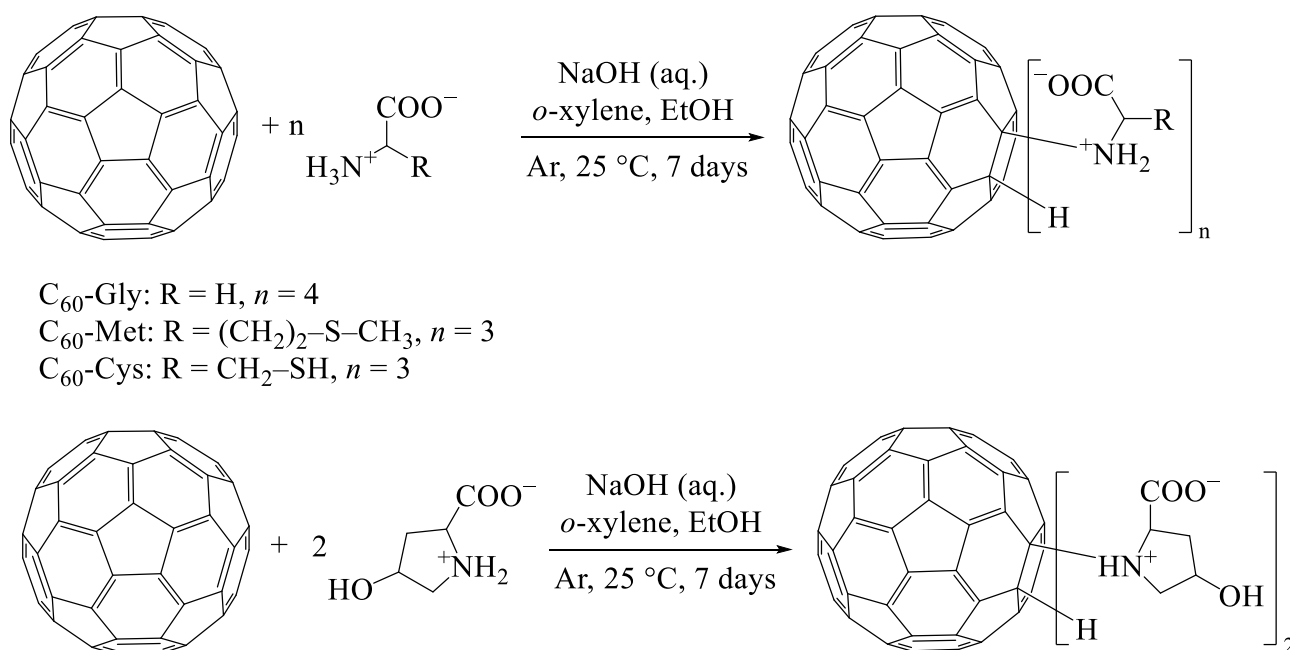


Fig. 2.1. Reaction scheme for the synthesis of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids (glycine, L-hydroxyproline, L-methionine, and L-cysteine)).

Next, solvents (water, ethanol, *o*-xylene) were removed from the reaction mixture using an RV3V rotary evaporator (IKA, Germany), while the temperature was not raised above 65 °C. To remove unreacted fullerene, the precipitate was dissolved in water, and the resulting heterogeneous system was filtered (blue ribbon filter). The solution was then neutralised with hydrochloric acid to pH = 7 and purified by dialysis using dialysis membranes (Viscase, USA, 1 kDa cut-off) against deionised water. Next, water was removed from the resulting solution on

a rotary evaporator. The resulting precipitate was dried at 65 °C for 4 h. The yield of reaction products is shown in Table. 2.2.

Table 2.2. Yields of synthesis reaction products of various C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids.

Substance name	Yield / %
C ₆₀ -Gly	91
C ₆₀ -Hyp	85
C ₆₀ -Cys	87
C ₆₀ -Met	85

2.2.2. Synthesis of polyhydroxylated fullerene C₆₀(OH)₂₄

Synthesis of fullerenol C₆₀(OH)₂₄ was carried out in two stages according to the method proposed in the work [199]. First, the bromo derivative C₆₀Br₂₄ was obtained by the reaction between C₆₀ and bromine in the presence of a FeBr₃ catalyst [200], after which the resulting product was hydrolysed with an aqueous solution of NaOH; the reaction scheme is shown in Fig. 2.2. Excess alkali was removed by dialysis using dialysis membranes (Viscase, USA, cut-off by mass 1 kDa) against deionised water. The yield of the final product was 95 %.

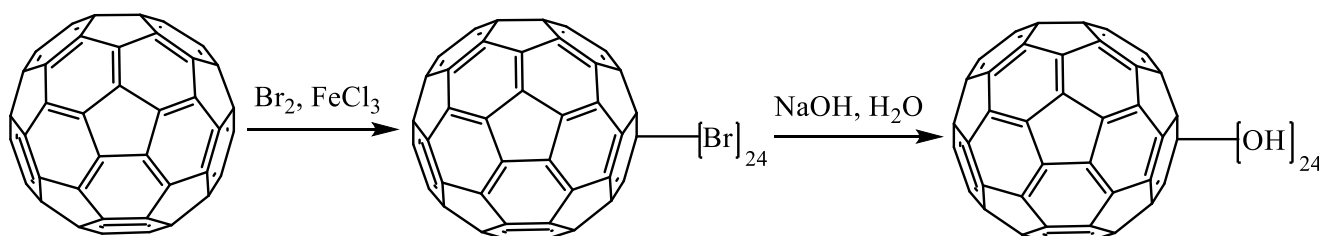


Fig. 2.2. C₆₀(OH)₂₄ Fullerenol synthesis reaction scheme.

2.2.3. Synthesis of carboxylated fullerene C₆₀[C(COOH)₂]₃

The synthesis of C₆₀[C(COOH)₂]₃ took place in two stages according to the procedures described in the works [201,202]. First, a cyclopropanation reaction was carried out by treating fullerene C₆₀ with diethyl bromomalonate in the presence of a base (DBU), resulting in an ester derivative, which was then subjected to hydrolysis and obtained the final product. The yield of the final product was 65 %. The scheme for the synthesis of C₆₀[C(COOH)₂]₃ is shown in Fig. 2.3.

(a)

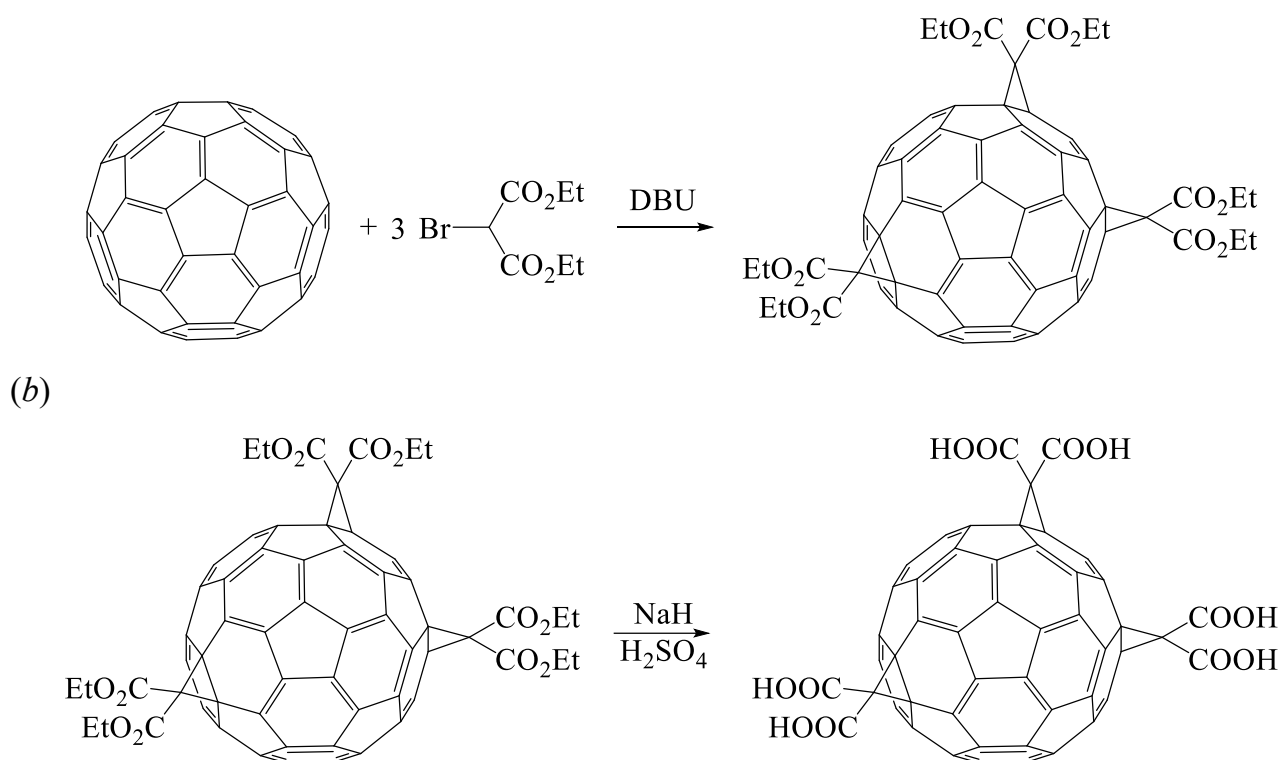


Fig. 2.3. Reaction scheme for the synthesis of C₆₀[C(COOH)₂]₃: cyclopropanation of C₆₀ — (a); hydrolysis of the ester derivative of fullerene C₆₀ — (b).

2.3. Identification of water-soluble C₆₀ fullerene derivatives

To determine the content of C, H, N in the obtained samples, an elemental analyser EuroEA3028-HT (Eurovector SpA, Italy) was used.

The ¹³C spectra were recorded using a cross-polarisation excitation pulse sequence (CP/MAS method), as well as the direct excitation method (DE method). The choice of the solid-state variant of NMR spectroscopy is due to the fact that derivatives form large associates in aqueous solutions, which makes it impossible to obtain high-resolution spectra in the liquid phase. NMR spectra were measured on an Avance III 400 WB spectrometer, Bruker USA (operating frequency 100.64 MHz for ¹³C). The sample under study was placed in a rotor with a diameter of 4 mm, made of zirconium oxide, and rotated at a frequency of 12.5 kHz at a magic angle to the direction of the constant magnetic field, which made it possible to average the anisotropic part of the screening tensor, thereby ensuring high resolution of the NMR spectra even of amorphous samples.

IR spectra of C₆₀ fullerene adducts in KBr pellets were obtained on a Shimadzu FTIR-8400S spectrometer (Shimadzu, Japan) in the wavelength range 400–4000 cm⁻¹.

Electronic absorption spectra were obtained on a SPECORD M-32 spectrophotometer (Germany) in the wavelength range $\lambda = 200\text{--}900$ nm.

Thermogravimetric analysis of C₆₀ fullerene adducts was carried out on a NETZSCH TG 209 F1 Libra analyser (Germany) in the temperature range of 30–1100 °C in a nitrogen atmosphere (brand ‘6.0’) and at a heating rate of 5 °C·min⁻¹.

For HPLC, we used a Shimadzu LC-20 Prominence instrument (Japan) with UV detection at 300 nm, equipped with a Phenomenex[®] NH₂ column (150 mm × 2.0 mm, 5 μm, 100 Å), injection volume 2·10⁻⁸ m³, injection rate 0.2 ml·min⁻¹, eluent acetonitrile / 0.1 % aqueous acetic acid solution (5/95).

2.4. Study of the physicochemical properties of C₆₀ fullerene adducts

For physicochemical studies, we used deionised water (electrical conductivity 5.5·10⁻⁶ Sm·m⁻¹). Water purification was carried out on a Millipore Simplicity UV apparatus (Merck KGaA, USA). The density and speed of sound were obtained using an Anton Paar DSA 5000 apparatus. The values of the viscosity of binary fullerene derivative–water systems in the temperature range $T = 293.15\text{--}333.15$ K were obtained using a Lovis 2000 M Anton Paar microviscometer (Austria). The values of isobaric heat capacity were measured using a Q2000 differential scanning calorimeter (USA). The size distribution of C₆₀ fullerene adduct nanoparticles in aqueous solutions was measured by dynamic light scattering, and the electrokinetic potential was calculated based on electrophoretic mobility data (Malvern Zetasizer, UK). A detailed description of the experimental techniques, as well as measurement errors, is presented in the works [104,203,204].

2.5. Biocompatibility of C₆₀ fullerene adducts

2.5.1. Spontaneous haemolysis

After obtaining informed consent, blood for the study was taken from donors ($n = 8$), aged 20–30 years, who had not received drugs that affect the function of erythrocytes for 7–10 days. The haemolysis of erythrocytes was studied by measuring the optical density of supernatants at a wavelength of $\lambda = 540$ nm on an SF-2000 spectrophotometer (OKB SPEKTR, Russia) according to the methods described in [205]. The test mixture with a volume of 1.5 ml was prepared from 750 μl of an aqueous solution of C₆₀ fullerene adduct at different concentrations ($C = 2\text{--}200$ μM) and 750 μl of erythrocyte suspension in physiological saline. After preparing the mixture, the tubes were incubated at $T = 310 \pm 0.2$ K for 1 and 3 h, after which they were centrifuged for 10 min at 6000 rpm. Erythrocyte suspensions supplemented with equivalent volumes of distilled water and saline, respectively, were used as positive and negative controls [206].

2.5.2. Platelet aggregation

After obtaining informed consent, blood for the study was taken from donors ($n = 8$), aged 20–30 years, who had not received drugs that affect platelet function for 7–10 days. Blood was taken into vacutainers containing sodium citrate ($C = 0.129$ M) as a stabiliser in a sodium citrate: blood ratio of 1:9. Stabilised blood was centrifuged for 7 min at room temperature and 1000 rpm (150g). Part of the platelet-rich plasma was taken into a plastic tube in the amount necessary for the analysis. Platelet-poor plasma was obtained from the remaining blood by centrifugation for 30 min at 3600 rpm (2500g). Platelet-poor plasma was used to calibrate the SolarAP 2110 aggregometer (Belarus). Plasma was standardised to obtain a platelet concentration of 200–250 $10^9/l$, taking into account the addition of the test substance.

Platelet aggregation in platelet-rich plasma was studied using ADP aggregation inducers (final concentration $C = 10$ μM), (CHRONO-PAR[®] Reagents, CHRONO-LOG[®] Corporation, USA). The effect of C_{60} fullerene adduct on induced platelet aggregation was determined by mixing 270 μl of plasma and 30 μl of test substance solution in cuvettes at a final concentration of 5, 10, 75, and 100 μM , respectively. ADP was introduced into the cuvettes 5 min after the incubation of the mixture. Aggregation was recorded until the curve reached a plateau [206].

2.5.3. Plasma coagulation haemostasis

Clotting tests include methods for measuring partial activated thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT). These methods make it possible to measure the time interval from the moment of adding a reagent (an activator that starts the clotting process) to the formation of a fibrin clot in the plasma under study. The effect of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ on plasma-coagulation haemostasis was assessed by adding it to plasma in the aPTT, PT, TT tests according to the method [207].

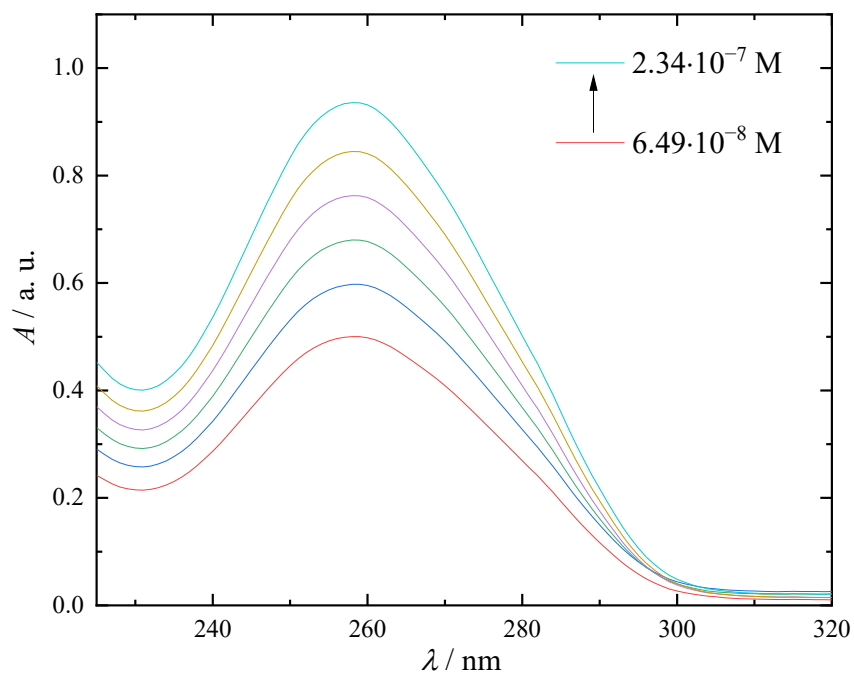
The samples were examined on an APG2-02-P coagulometer (Russia). For the study, stock solutions of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 10$ – 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) were obtained. Next, the solutions were incubated at 37 °C for 60 s and, in accordance with the study protocol, the clotting time was determined on the analyser in the aPTT, PT, TT tests [207].

2.5.4. Interaction with DNA

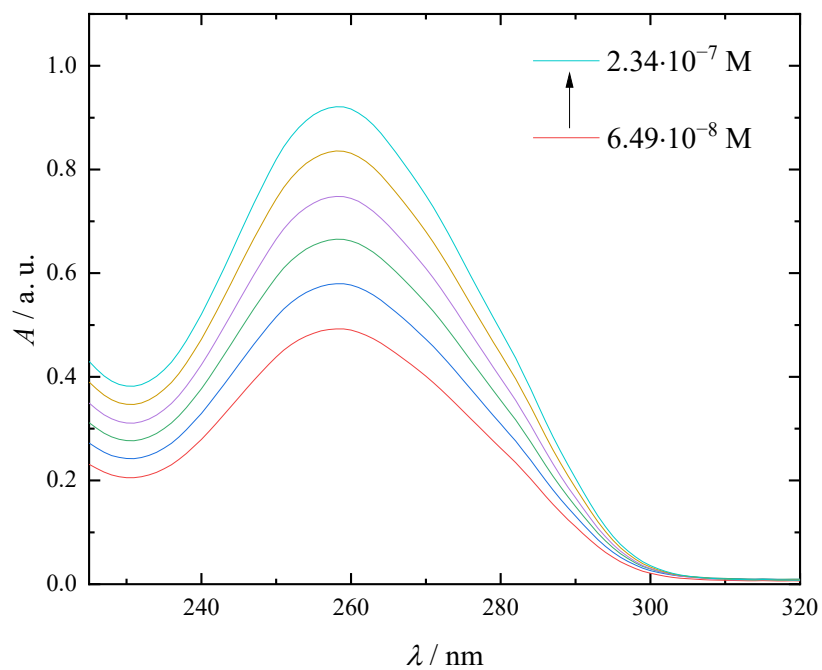
UV absorption spectra of solutions of fullerene C_{60} adducts and DNA in the range of 225–320 nm were recorded on a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Japan) against 0.9 % NaCl aqueous solution in quartz cuvettes ($l = 1$ cm). Working solutions were obtained by mixing solutions of DNA and the corresponding C_{60} fullerene adducts at room temperature [207]. The

absorption spectra of DNA solutions in the presence of C_{60} fullerene adducts are shown in Fig. 2.4.

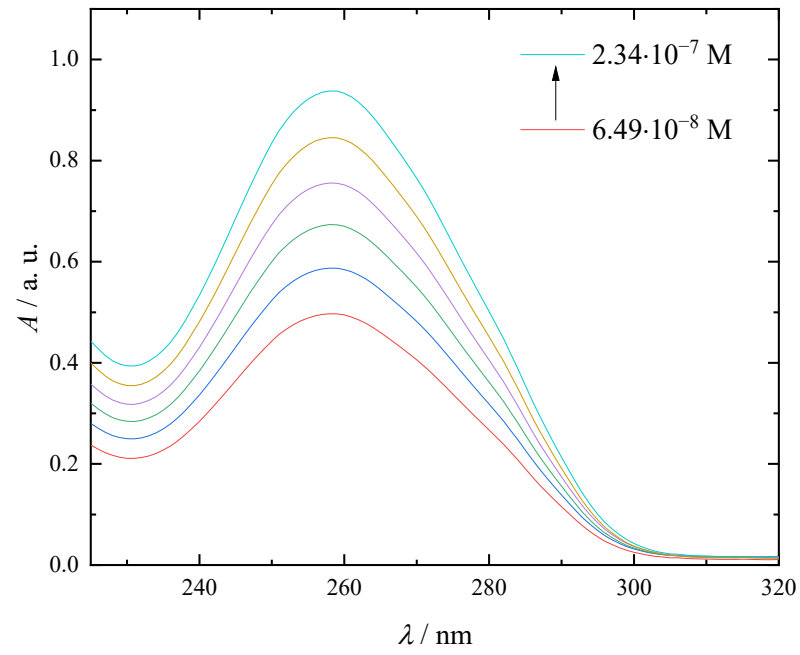
(a)



(b)



(c)



(d)

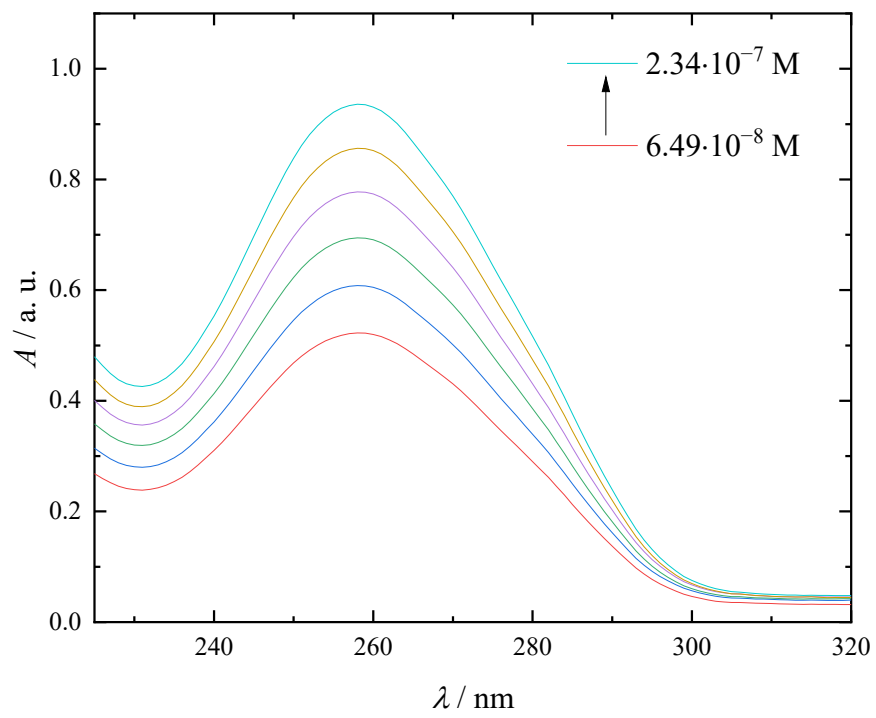


Fig. 2.4. Absorption spectra of DNA with a concentration of $6.49 \cdot 10^{-8}$ – $2.34 \cdot 10^{-7}$ M in the presence of $6.43 \cdot 10^{-8}$ M fullerene adducts C₆₀: C₆₀-Gly — (a); C₆₀-Hyp — (b); C₆₀-Cys — (c); C₆₀-Met — (d).

2.5.5. Antiradical activity

The antiradical activity of C₆₀ fullerene adducts with the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was studied on a Thermo Scientific Evolution 300 spectrophotometer (USA). For this, a solution of DPPH in ethanol with a concentration (130 μM) and a solution of the C₆₀ fullerene adduct in water with a concentration of 200 μM were prepared. A solution of DPPH (1 ml) and a solution of fullerene adduct C₆₀ (1 ml) were added to a quartz cell. A mixture of ethanol and water (1:1) was placed in the reference cuvette. To obtain the DPPH reduction kinetic curve, the optical density was recorded at a wavelength of 515 nm in the temperature range $T = 298.15$ – 318.15 K in the dark every minute for 30 min, and also six days after the start of the reaction. The temperature control accuracy was $\Delta T = 0.1$ K [206].

2.5.6. Cytotoxicity

Cytotoxicity of C₆₀ adducts was studied using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) on human embryonic kidney cells (HEK 293). Cells were cultured in a CO₂ incubator at +37 °C in a humidified atmosphere containing air and 5 % CO₂ in a DMEM-F12 nutrient medium containing 10 % thermally inactivated fetal bovine serum, 1 % L-glutamine, 50 U ml⁻¹ penicillin and 50 μg ml⁻¹ streptomycin.

As a result of the interaction of MTT with NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductases, a coloured product, formazan, is formed, with an absorption maximum at a wavelength of 540 nm, the content of which is proportional to the number of viable cells.

For the experiment, cells were seeded in a 96-well plate and incubated overnight in a CO₂ incubator: during this time, cells attached to the surface of the wells (5000 cells were added to each well in 200 μl of DMEM-F12 medium). The number of cells was counted on a BioRad TC10 cell viability analyser (Bio-Rad Laboratories, USA). After that, a solution containing the C₆₀ fullerene adduct was added to the wells. The cells were incubated in the plates for 48 h in a CO₂ incubator at +37 °C. At the end of the incubation period, the DMEM-F12 culture medium was removed by inverting the plate. Next, 100 μl of DMEM-F12 medium and 20 μl of the MTT reagent were added to the wells, and the plates with cells were incubated for 1 h in a CO₂ incubator at +37 °C. After removal of the supernatant, formazan crystals were dissolved for 15 min with stirring in 200 μl per well of DMSO, and the optical density was measured on a

BioRadxMarx plate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, USA) at a wavelength of 540 nm and 690 nm. For background correction, absorbances at 540 nm were subtracted from absorbances at 690 nm for the respective wells. Data were normalised as a percentage of control cells [206].

2.5.7. Interaction with HSA

The binding of C₆₀ fullerene adducts to HSA was performed on a SM 2203 spectrofluorimeter (Solar, Belarus). Emission spectra were recorded in the wavelength range 310–450 nm and temperature range 298.15–31.15 K; excitation wavelength 290 nm. The HSA concentration was 3 μM, the concentration of the C₆₀ fullerene adduct was varied in the range $C = 0.3$ – 1.5 μM with a step of 0.3 μM and in the range $C = 6.0$ – 24.0 μM with a step of 3.0 μM. The measurements were carried out in the absence and presence of binding site markers (warfarin, ibuprofen, digitonin with a final concentration of $C = 3$ μM) [206].

2.5.8. Esterase activity of HSA

To assess the effect of fullerene C₆₀ adducts on the esterase activity of HSA, solutions were prepared: *p*-nitrophenylacetate in ethanol, HSA, and fullerene C₆₀ adduct in Dulbecco's buffer with pH = 7.02. After mixing the solutions, the final concentration of *p*-nitrophenylacetate was 100 μM, HSA 3 μM, and the concentration of fullerene C₆₀ adduct varied from 0 to 24 μM. The hydrolysis rate of *p*-nitrophenylacetate was estimated from the formation of the reaction product, nitrophenol, whose concentration during the first 10 min of the reaction was determined spectrophotometrically at a wavelength of 405 nm using an SF-2000 spectrophotometer (OKB SPEKTR, Russia). As a result, the kinetic dependences of the hydrolysis reaction of HSA *p*-nitrophenylacetate in the absence and presence of the C₆₀ fullerene adduct were obtained [207].

2.5.9. Genotoxicity

The genotoxicity of C₆₀ fullerene adducts was assessed using the DNA comet method using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and alkaline electrophoresis in microgels. DNA comets were visualised using a Micromed 3 LUM fluorescent microscope (Micromed, St. Petersburg, Russia). The tail lengths of DNA comets were measured using the CASP program (version 1.2.2). The content of DNA in the tail and the length of the tail were determined experimentally; tail moment was calculated as the percentage of DNA in the tail multiplied by the length between the centre of the head and the tail [206].

2.5.10. Photobleaching

To study the photodynamic properties, the absorption spectra of the following samples were taken: (i) Radachlorin; (ii) solutions containing Radachlorin and C₆₀ fullerene adduct in various concentrations; (iii) Radachlorin solution containing 500 μM sodium azide before and after irradiation with a Laserland LED-2000 red laser (Besram Technology Inc., China, laser power 55 mW, 659 nm) according to the works [208,209]. The effect of C₆₀ fullerene adducts on Radachlorin photobleaching was evaluated by calculating the photodegradation rate constant k_{deg} [206].

2.5.11. Interaction with collagen

The study of C₆₀-Met binding to collagen was carried out using a Tecan Infinite M200 microplate reader (Austria). The emission spectra were recorded in the wavelength range $\lambda = 310\text{--}350$ nm at an excitation wavelength of 290 nm. Collagen solutions with a concentration of 3 μM and collagen solutions with C₆₀-Met with a concentration of $C = 3\text{--}21$ μM (step 3 μM) were prepared for the experiments. The temperature control accuracy was $\Delta T = 0.01$ K [210].

2.5.12. Protective effect of C₆₀-Met in UV-damaged collagen

Collagen solutions (0.9 mg/ml) in the absence and presence of C₆₀-Met ($C = 0.0015$, 0.003, and 0.06 mg/ml) were irradiated at room temperature using an ENP02-30-001 irradiator (Russia) at a wavelength of 254 nm, time irradiation ranged from 0 to 45 min in increments of 15 min. Emission spectra in the wavelength range $\lambda = 310\text{--}450$ nm were recorded using a Fluoromax 4P spectrofluorimeter, excitation wavelength 290 nm [210].

Chapter 3. Results and discussion

3.1. Identification of C₆₀ fullerene derivatives

3.1.1. Identification of C₆₀ fullerene derivatives with L-amino acids

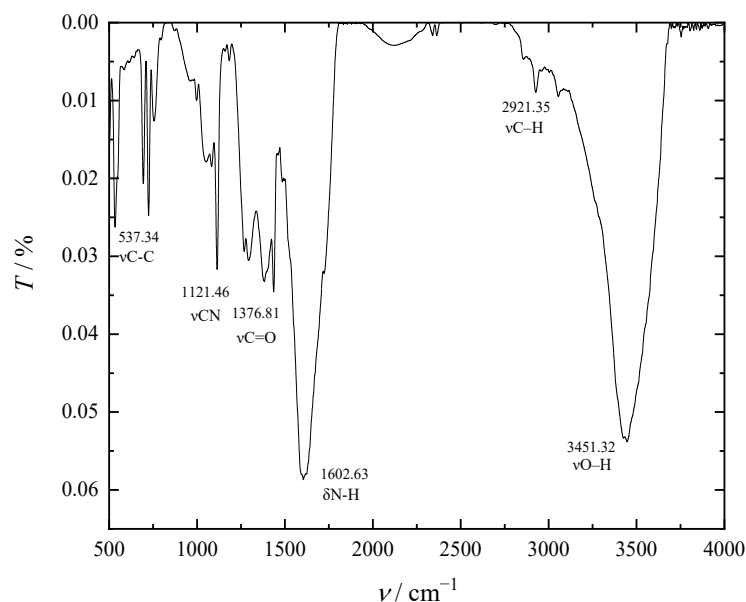
The results of elemental analysis of C₆₀ fullerene derivatives with L-amino acids are shown in Table 3.1. Based on the results of elemental analysis, it was found that fullerene C₆₀ forms a tetra-adduct with glycine, a bis-adduct with L-hydroxyproline, and tris-adducts with L-methionine and L-cysteine.

Table 3.1. Results of elemental analysis of C₆₀ fullerene derivatives with L-amino acids.

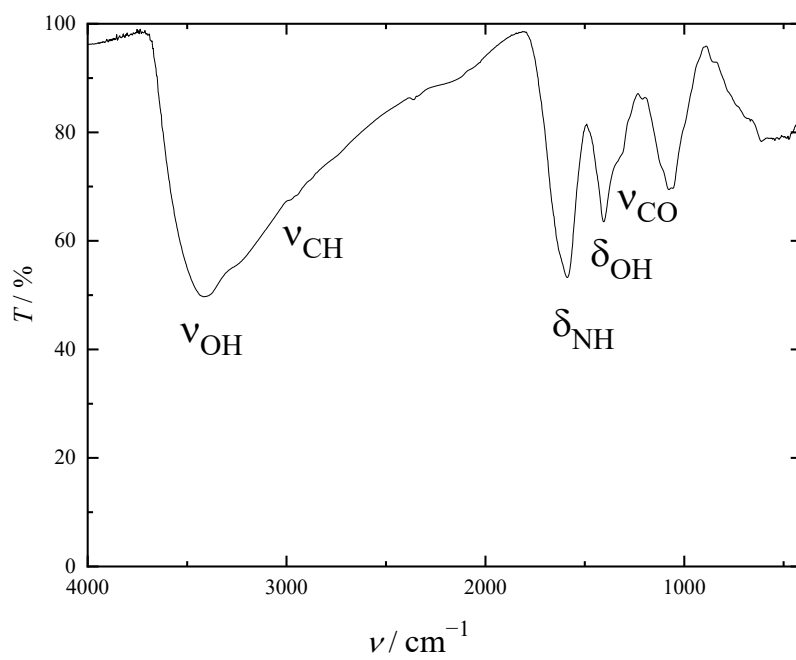
Adduct	Empirical formula	C / %	H / %	N / %
C ₆₀ -Gly	C ₆₈ H ₂₀ N ₄ O ₈ ·7H ₂ O	71.1 ± 0.2	3.2 ± 0.2	4.7 ± 0.2
C ₆₀ -Hyp	C ₇₀ H ₁₈ N ₂ O ₆	85.2 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1
C ₆₀ -Cys	C ₆₉ H ₂₁ N ₃ O ₆ S ₃	76.5 ± 0.2	1.9 ± 0.1	3.9 ± 0.2
C ₆₀ -Met	C ₇₅ H ₃₃ N ₃ O ₆ S ₃	77.1 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.6 ± 0.2

IR spectra of C₆₀ fullerene derivatives with glycine, L-hydroxyproline, L-methionine and L-cysteine are shown in Fig. 3.1. The spectra show characteristic bond bands of both amino acid residues and fullerene C₆₀.

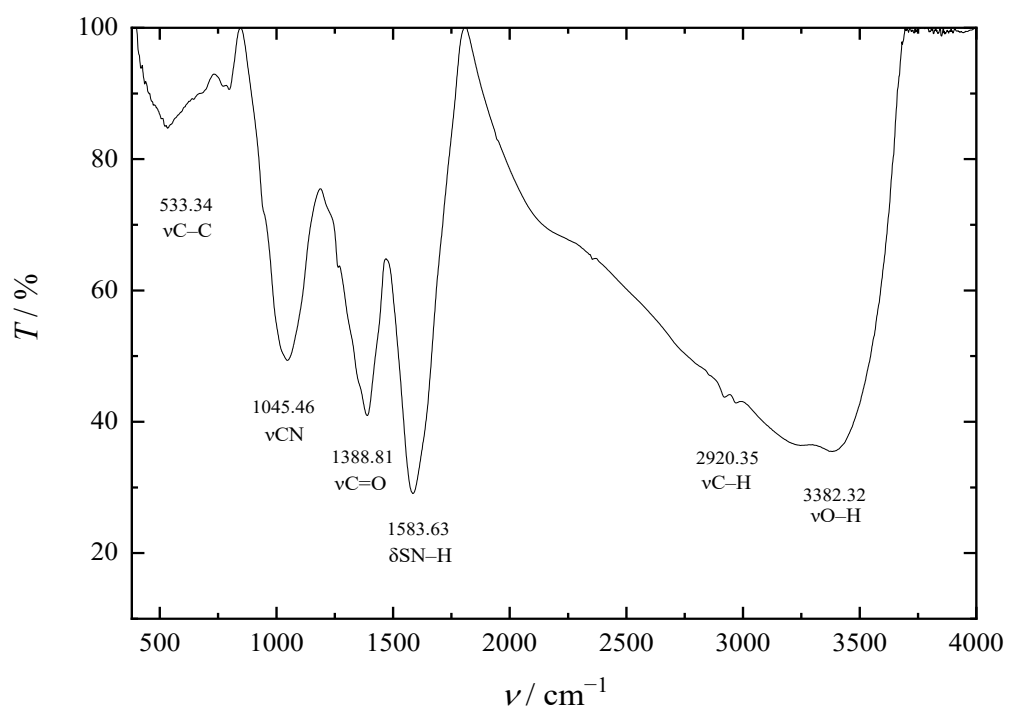
(a)



(b)



(c)



(d)

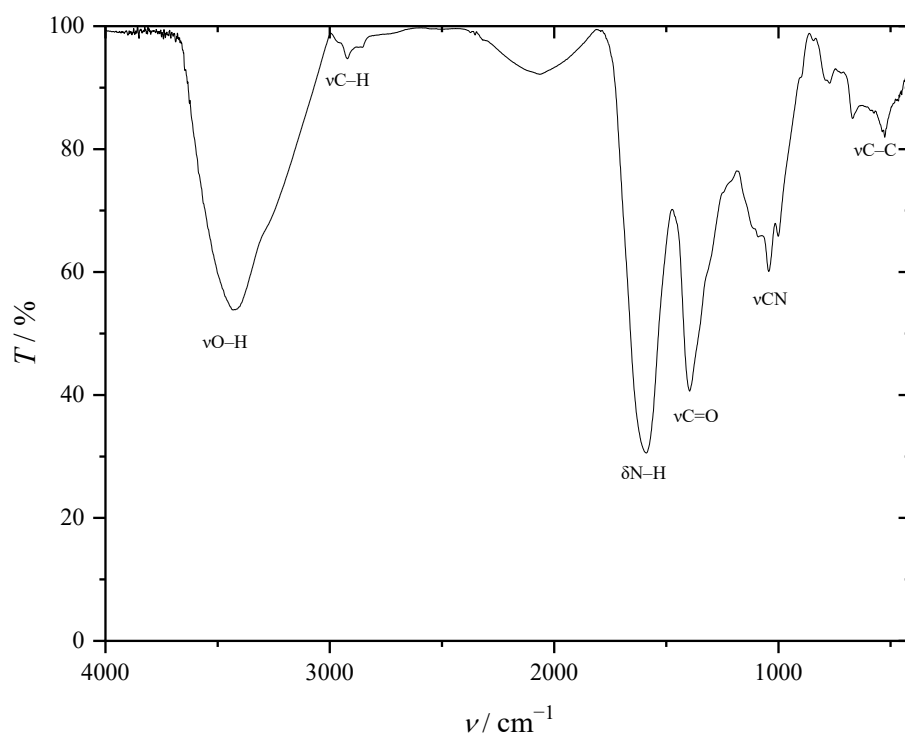
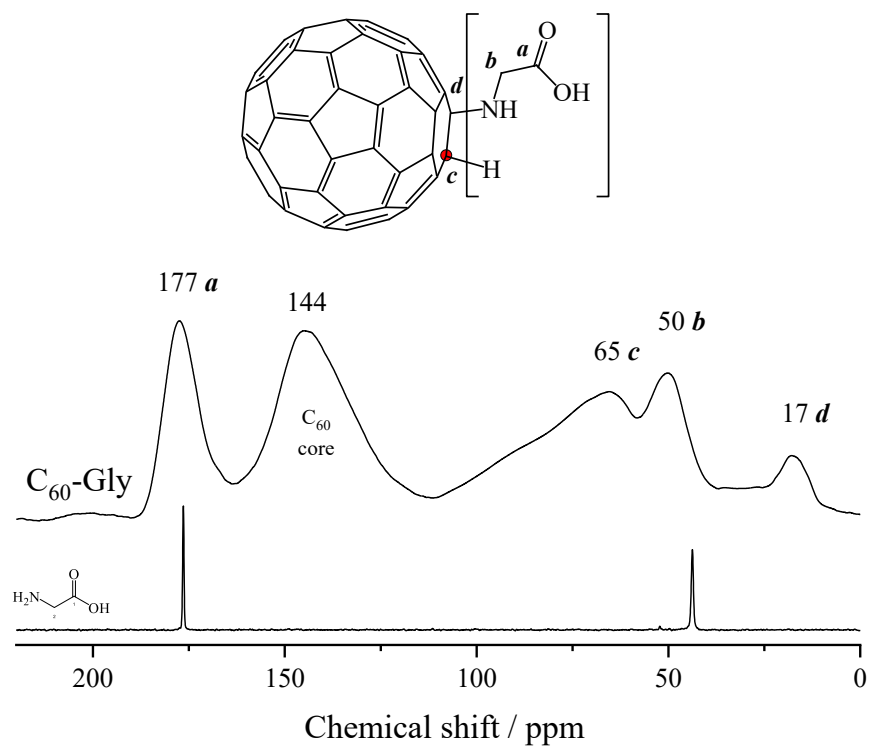


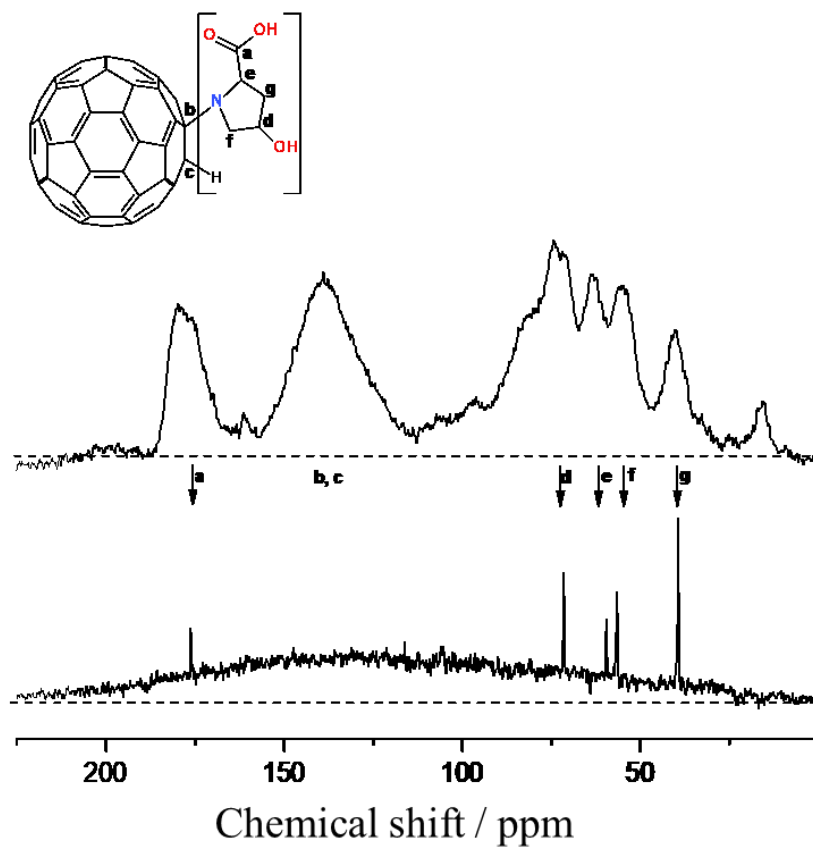
Fig. 3.1. IR spectra of C_{60} fullerene derivatives with (a) glycine, (b) L-hydroxyproline, (c) L-methionine, and (d) L-cysteine.

Fig. 3.2 as an example, shows ^{13}C NMR spectra of C_{60} fullerene derivatives with glycine, L-hydroxyproline and L-methionine.

(a)



(b)



(c)

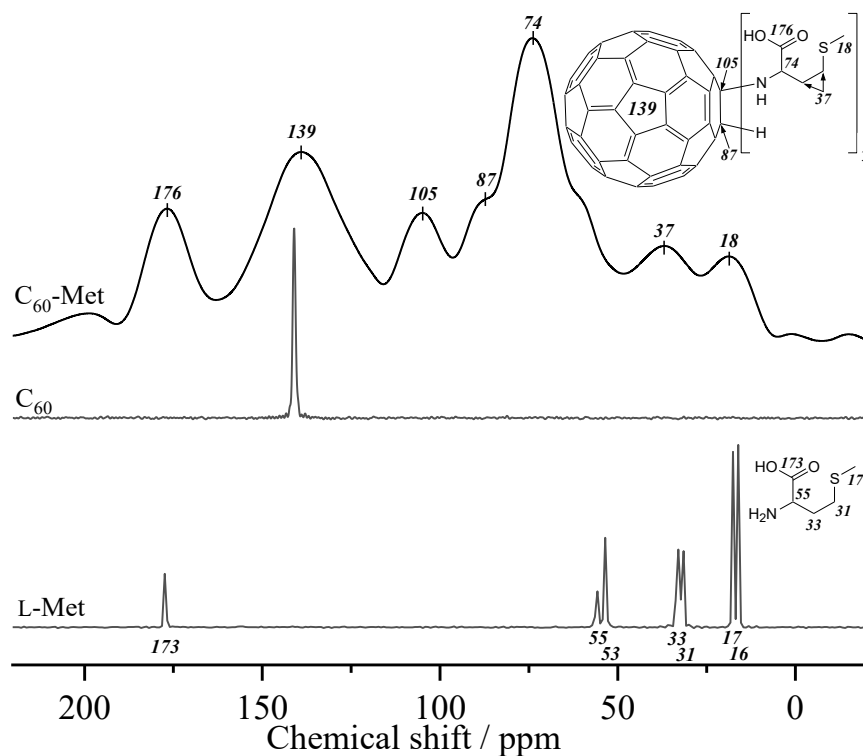
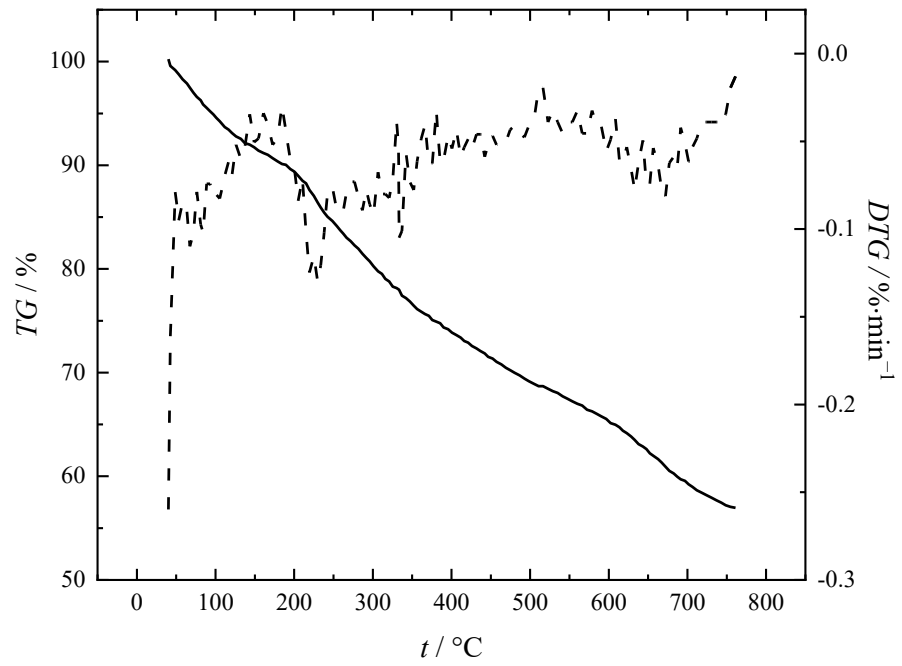


Fig. 3.2. ^{13}C NMR spectra of C_{60} fullerene derivatives with glycine (a), L-hydroxyproline (b), L-methionine (c).

The presented spectra confirm the formation of a covalent bond between amino acid residues and fullerene C_{60} . The interpretation of the bands of the ^{13}C NMR spectra is shown in Fig. 3.2 for the corresponding C_{60} fullerene derivative with L-amino acids.

The method of thermogravimetric analysis (TG) was also used to identify C_{60} fullerene adducts with L-amino acids. As an example, Fig. 3.3 shows thermograms of C_{60} adducts with glycine and L-hydroxyproline.

(a)



(b)

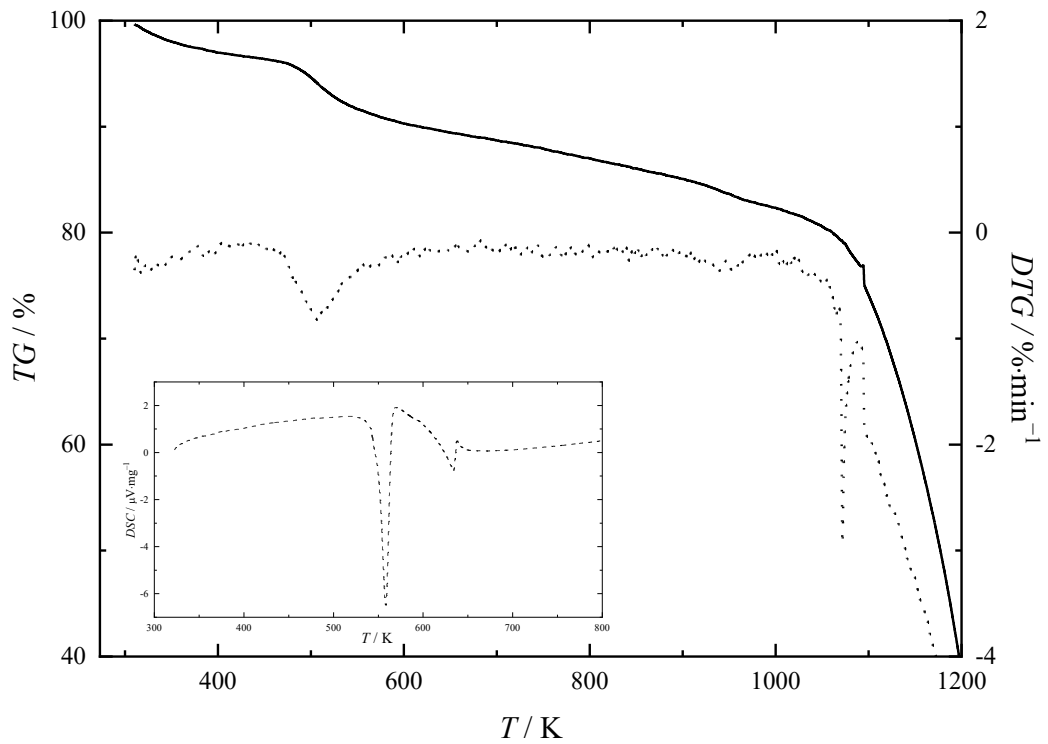


Fig. 3.3. Thermal analysis of crystalline hydrates of C₆₀ adducts with glycine (a) and L-hydroxyproline (b).

Based on the data obtained, it was found that *TG* (Table 3.2) can be used to determine the composition of adducts. The interpretation of the obtained thermograms for C₆₀-Gly and C₆₀-Hyp is presented in Table 3.2. It can be seen that the degradation of C₆₀ adducts includes the processes of thermal-oxidative degradation caused by dehydration, decarboxylation, and denitrogenation of amino acid residues, as well as of the fullerene core.

Table 3.2. Data from thermogravimetric analysis of derivatives C₆₀-Gly, C₆₀-Hyp.

T_M° / K ($T_b - T_c$) / K	$\frac{\Delta m_i^{\text{calc.}}}{m_0}, \%$	$\frac{\Delta m_i^{\text{exp.}}}{m_0}, \%$	Chemical process
C ₆₀ -Gly			
395.15 (305.15–486.15)	10.9	10.2	$\text{C}_{60}[\text{NH-CH}_2\text{-COOH}]_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_{60}[\text{NH-CH}_2\text{-COOH}]_4 + 7\text{H}_2\text{O}$
575.15 (486.15–664.15)	14.7	17.3	$\text{C}_{60}[\text{NH-CH}_2\text{-COOH}]_4 \rightarrow \text{C}_{60}[\text{NH}_2\text{-CH}_3]_4 + 4\text{CO}_2$
849.15 (664.15–1034.15)	39.7	39.7	$\text{C}_{60}[\text{NH}_2\text{-CH}_3]_4 + 8\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_{60} + 4\text{CO}_2 + 8\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{N}_2$
C ₆₀ -Hyp			
428.15 (303.15–473.15)	3.5	3.7	$\text{C}_{60}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_{60}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
623.15 (493.15–733.15)	8.4	8.8	$\text{C}_{60}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2)_2 \rightarrow \text{C}_{60}(\text{NC}_4\text{H}_9)_2 + 2\text{CO}_2$
893.15 (773.15–1103.15)	14.2	14.4	$\text{C}_{60}(\text{NC}_4\text{H}_9)_2 + 12.5\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_{60} + \text{N}_2 + 8\text{CO}_2 + 9\text{H}_2\text{O}$

The electronic spectra of C₆₀ adducts with L-amino acids: glycine, L-hydroxyproline, L-methionine, and L-cysteine are uninformative, but can be used for the analytical determination of the latter. As an example, Fig. 3.4 shows the electronic spectra of solutions of C₆₀-Gly in water and unmodified C₆₀ in *o*-xylene.

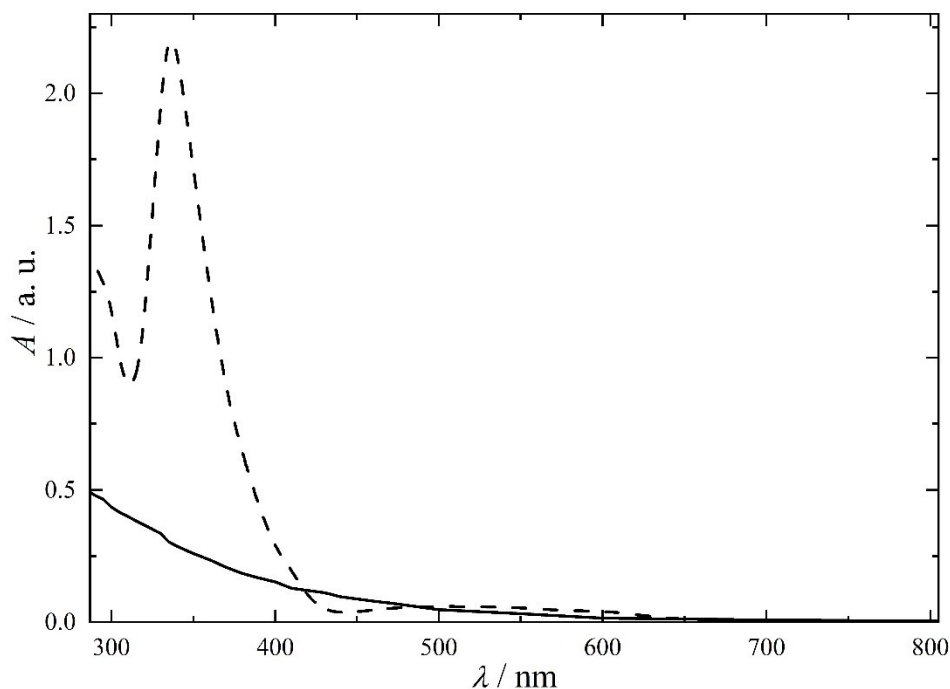


Fig. 3.4. Electronic spectra of C_{60} -Gly solution in water ($C = 0.08 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, solid line) and unmodified fullerene C_{60} in *o*-xylene ($C = 0.029 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, dotted line). Maximum at $\lambda = 335 \text{ nm}$, A is the absorption coefficient.

The following conclusions can be drawn from the obtained spectra: (i) the electronic spectrum of an aqueous solution of C_{60} -Gly does not contain absorption bands; (ii) the spectrum of an aqueous solution of C_{60} -Gly lacks an absorption peak characteristic of fullerene C_{60} ($\lambda = 335 \text{ nm}$); (iii) comparison of the spectra of C_{60} -Gly and C_{60} solutions confirms the fullerene functionalisation and the absence of unreacted C_{60} fullerene.

The degree of purity of the synthesised C_{60} adducts with L-amino acids was determined by high-performance liquid chromatography. The purity of the synthesised C_{60} adducts with L-amino acids was at least 99.5 %. Fig. 3.5 shows an example chromatogram of a C_{60} adduct with L-hydroxyproline.

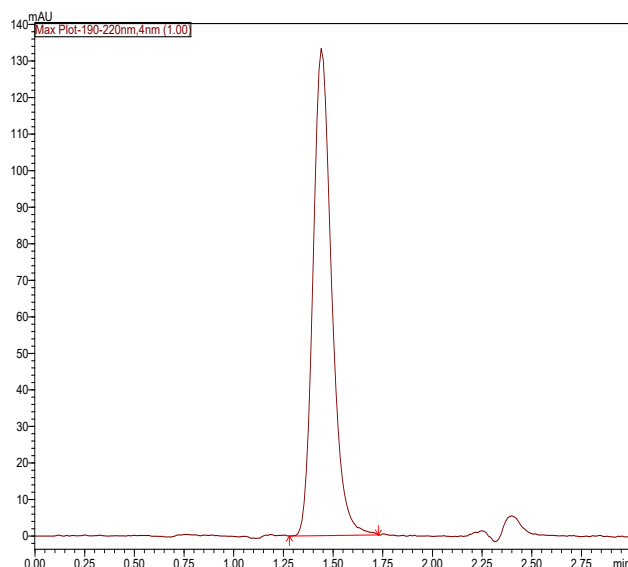


Fig. 3.5. Liquid chromatogram of the C_{60} adduct with L-hydroxyproline. Column: Phenomenex[®] NH2 (150 × 2.0 mm, 5 μ m, 100 Å), eluent: acetonitrile/acetic acid aqueous solution (0.1 %) (5:95), 0.2 ml/min, sample volume: 20 μ l, detection: diode array.

3.1.2. Identification of polyhydroxylated fullerene $C_{60}(OH)_{24}$

Elemental analysis results for $C_{60}(OH)_{24}$: theoretical content 63.8 % (C), 2.1 % (H); experimental values 63.9 ± 0.3 % (C), 2.2 ± 0.3 % (H).

Fig. 3.6 shows the IR spectrum of $C_{60}(OH)_{24}$, which shows the following absorption bands: 3418 cm^{-1} ($\nu O-H$), 1597 cm^{-1} ($\nu C=C$), 1370 cm^{-1} ($\delta C-O-H$), 1060 cm^{-1} ($\nu C-O$).

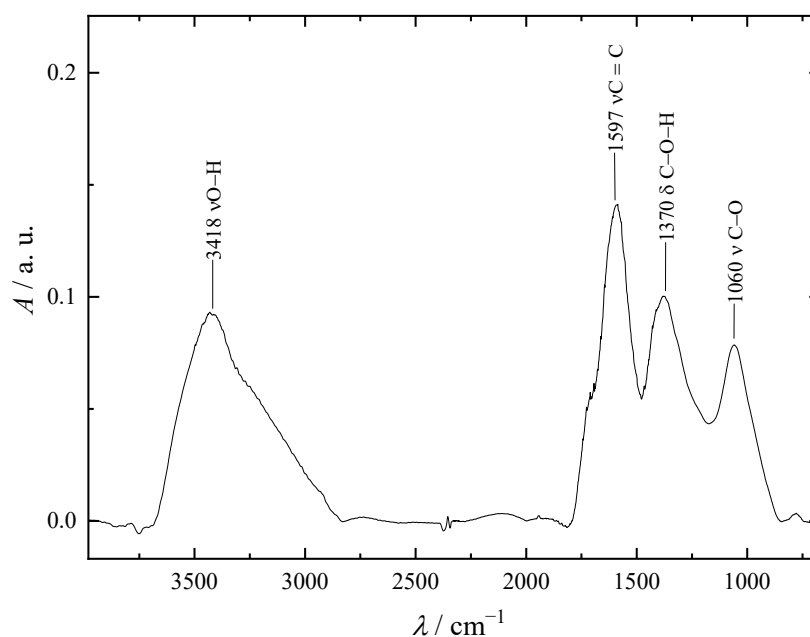


Fig. 3.6. IR spectrum of $C_{60}(OH)_{24}$.

Fig. 3.7 shows the ^{13}C NMR spectrum of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ obtained by the CP/MAS method with a contact time of 2000 μs .

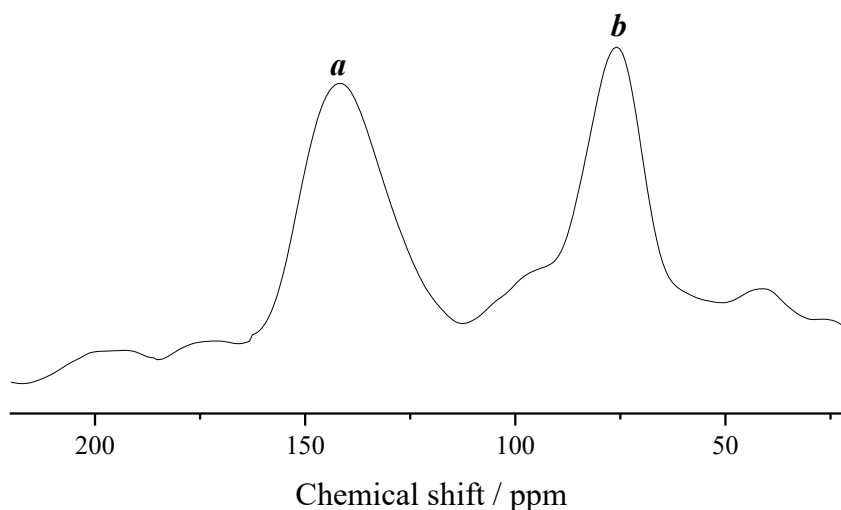


Fig. 3.7. ^{13}C NMR spectrum of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ obtained by the CP/MAS method with a contact time of 2000 μs . *a* — structurally ‘free’ carbon atoms of the fullerene backbone (142 ppm), *b* — hydroxylated carbon atoms (76 ppm).

Fig. 3.8 shows the results of the complex thermal analysis of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$. It can be seen from the obtained results that: (i) $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ fulleranol is thermally stable up to $T = 340$ K; (ii) the decomposition of fulleranol occurs in the range of 340–1100 K and includes the processes of dehydroxylation, hemiketal formation, pinacolone rearrangement of hydroxyl groups and their degradation. The destruction of the fullerene core begins at $T = 1100$ K.

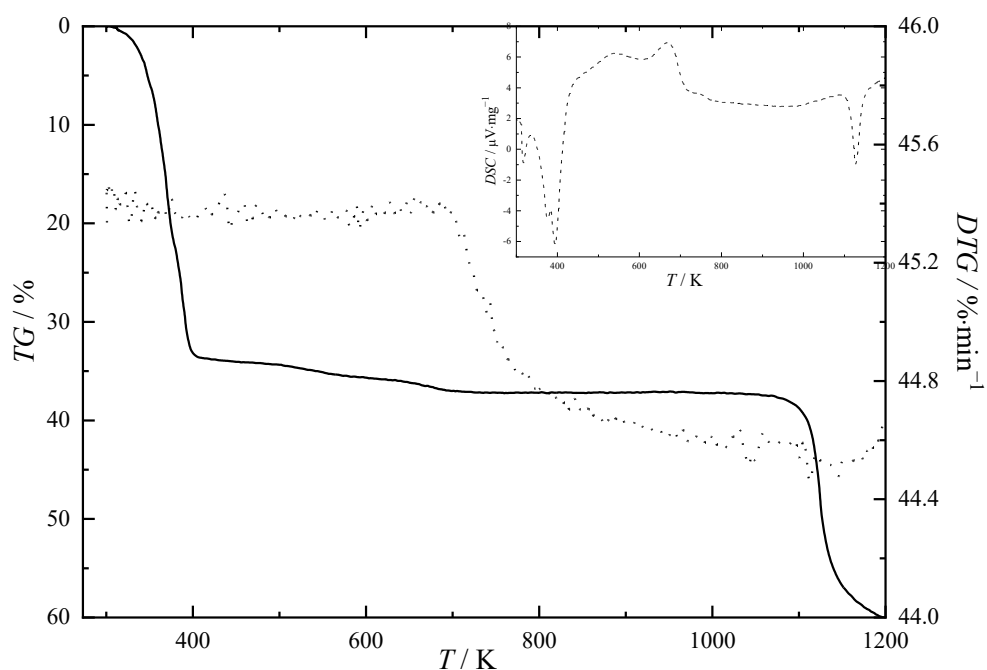


Fig. 3.8. Results of a complex thermal analysis of the $C_{60}(OH)_{24}$ sample in the temperature range $T = 300\text{--}1200$ K. The solid line corresponds to the TG curve, and the dotted line corresponds to the DTG curve. Inset graph — DSC .

Fig. 3.9 shows the electronic spectrum of an aqueous solution of fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$. As in the case of the electronic spectra of C_{60} adducts with L-amino acids, the electronic spectrum of an aqueous solution of fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$ is of little information, but indicates the conversion of fullerene to fulleranol, as well as the absence of unreacted fullerene.

Analysis of the chromatogram of fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$ allowed us to conclude that the purity of the synthesised sample is 99.7 % (Fig. 3.10).

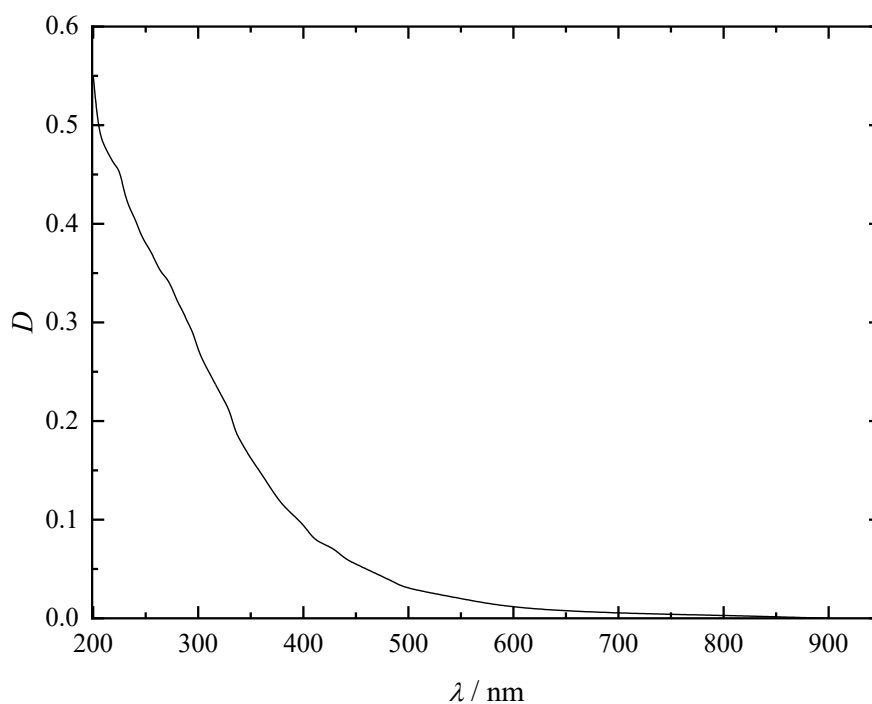


Fig. 3.9. Electronic spectrum of fullereneol solution $C_{60}(OH)_{22-24}$. D is optical density, λ is wavelength.

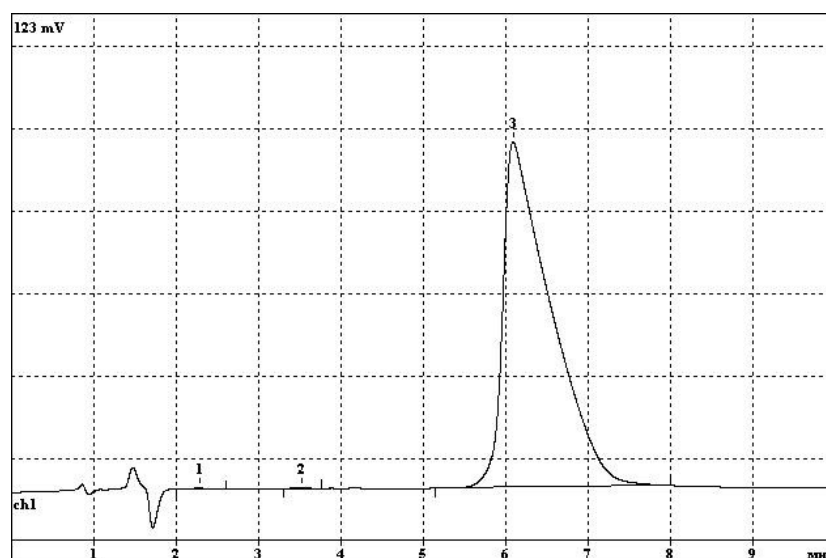


Fig. 3.10. Liquid chromatogram of fullereneol $C_{60}(OH)_{22-24}$. Column: Phenomenex[®] NH2 (150 × 2.0 mm, 5 μ m, 100 Å), eluent: acetonitrile/acetic acid aqueous solution (0.1 %) (5:95), 0.2 ml/min, sample volume: 20 μ l, detection: diode array.

3.1.3. Identification of carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$

Results of elemental analysis of derivative $C_{60}[C(COOH)_2]_3$: theoretical content 80.7 % (C), 0.6 % (H); experimental values 80.7 ± 0.3 % (C), 0.5 ± 0.1 % (H).

Main peaks in the IR spectrum (cm^{-1}): 3470, 1811, 1723, 1715, 1431, 1405, 1410, 1222, 1231, 1057, 820, 833, 730, 580, 528, 522. The long-wavelength part of the spectrum 522–1700 cm^{-1} corresponds to the vibrations of the C–C bonds of the fullerene core. In the short-wavelength part of the spectrum, 1700–1725 cm^{-1} corresponds to the vibrations of the C=O bonds of the malonic acid groups in $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$, 3450–3550 cm^{-1} corresponds to the vibrations of the O–H groups.

Analysis of the obtained ^{13}C NMR spectrum shows the following: (i) the peak at 173.5 ppm refers to the carbon atoms of the carboxyl groups (Fig. 3.11a), (ii) the peak at 140.5 ppm corresponds to structurally ‘pure’ carbon atoms in fullerene molecule (Fig. 3.11b), (iii) an intense peak with a chemical shift of 47.0 ppm refers to the fullerene carbon atoms included in the cyclopropane ring (Fig. 3.11c), (iv) a chemical shift of 24.9 ppm refers to the carbon atoms of the cyclopropane ring associated with carboxyl groups.

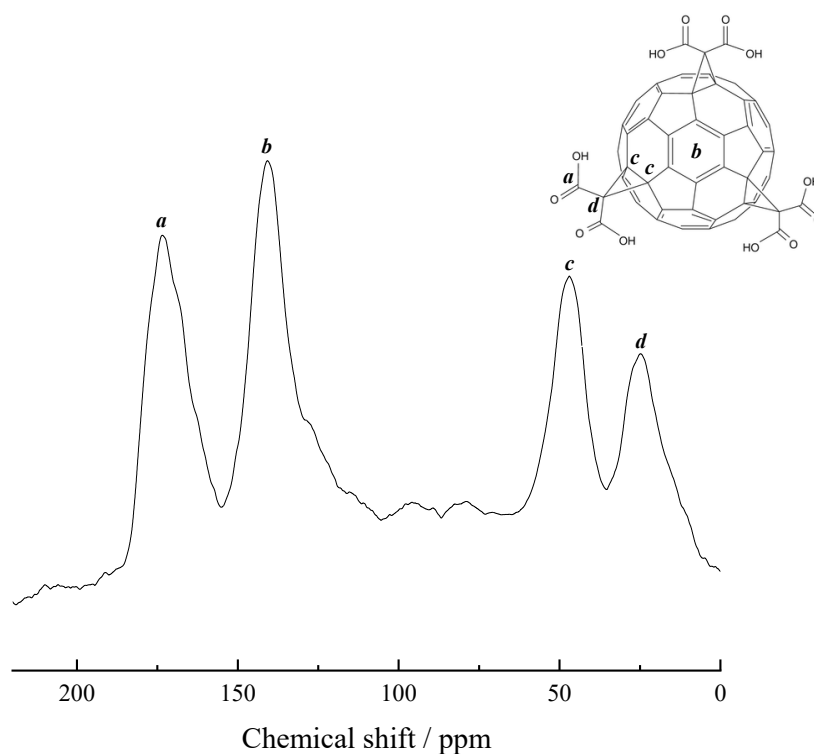


Fig. 3.11. ^{13}C NMR spectrum of carboxylated fullerene $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ obtained by CP/MAS method at a contact time of 2000 μs .

Fig. 3.12 shows the electronic spectrum of an aqueous solution of carboxylated fullerene $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$. As in the case of the electronic spectra of C_{60} adducts with L-amino acids and fulleranol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$, the electronic spectrum indicates the successful completion of the reaction,

as well as the absence of unreacted fullerene. Fig. 3.13 illustrates the validity of the Beer–Lambert–Bouguer law at $\lambda = 330$ nm for solutions of carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$.

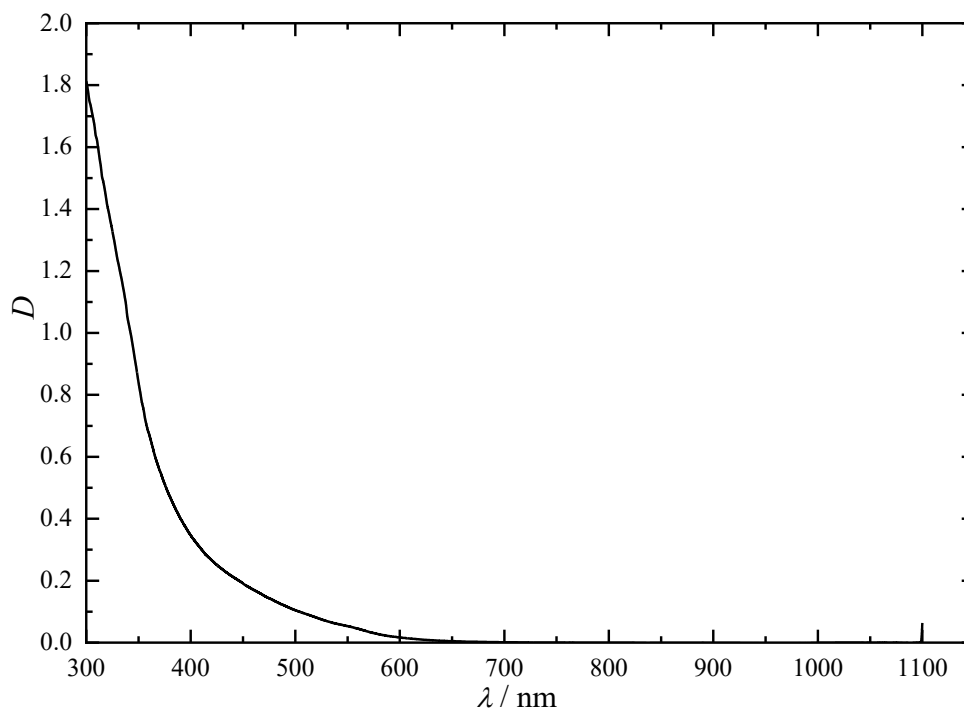


Fig. 3.12. *Electronic spectrum of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ in H_2O . D is optical density, λ is wavelength (nm).*

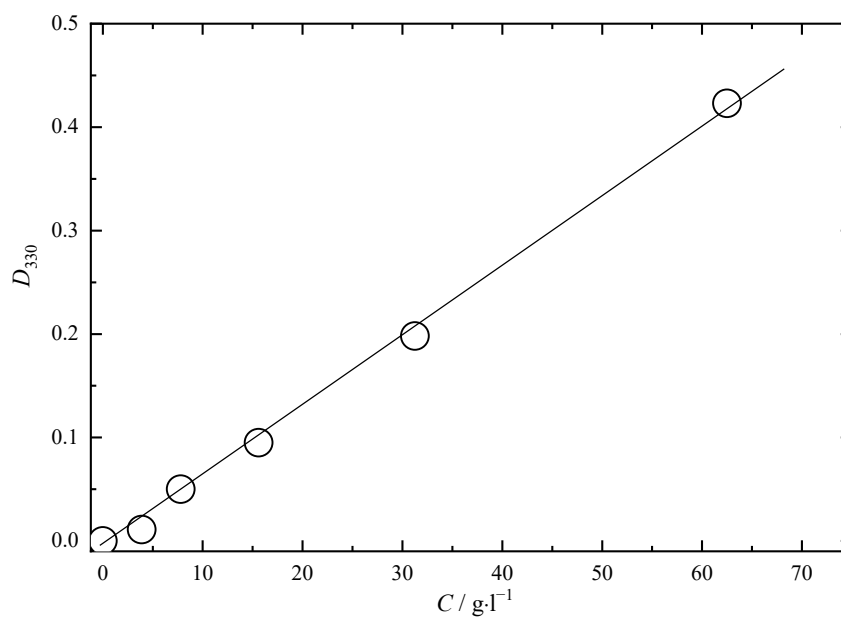


Fig. 3.13. Satisfaction of the Beer–Lambert–Bouguer law at $\lambda = 330$ nm. D is optical density, l is optical path (1 cm), C is volumetric concentration.

Table 3.3 and Fig. 3.14 presents the results of a complex thermal analysis of carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. The following features can be distinguished: (i) the $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ sample is stable up to 60 °C, a further increase in temperature leads to the loss of three molecules of water of crystallisation; (ii) in the region of $t^\circ = 140$ –295 °C, the process of decarboxylation proceeds; (iii) in the range $t^\circ = 320$ –520 °C, simultaneous processes of decarboxylation and dehydrogenation occur. The total experimental mass loss is 25.6 %, which corresponds to the elimination of six water molecules and three carbonyl groups.

Table 3.3. Thermal analysis of crystalline hydrate $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. (T_m is the temperature of the maximum thermal effect; T_b and T_e are the temperatures of the beginning and end of the thermal effect; $\Delta m_i / m_0$ is the mass loss; m_0 is the initial mass).

T_M° / K ($T_b - T_e$) / K	$\frac{\Delta m_i^{calc.}}{m_0} / \%$	$\frac{\Delta m_i^{exp.}}{m_0} / \%$	Chemical process	Decay product
—	0.0	0.0	—	$C_{60}[C(COOH)_2]_3 \cdot 3H_2O$
97 (60–130)	5.2	5.0	$-3H_2O$	$C_{60}[C(COOH)_2]_3$
150 (140–180)	2.6	2.5	$-C=O$	$C_{60}[C(COOH)_2]_2COH(COOH)$
208 (195–240)	2.6	2.8	$-C=O$	$C_{60}[C(COOH)_2][COH(COOH)]_2$
271 (255–295)	2.6	2.7	$-C=O$	$C_{60}[COH(COOH)]_3$
337 (320–385)	4.3	4.1	$-C=O$ $-H_2O$	$C_{60}CO[COH(COOH)]_2$
420 (400–440)	4.3	4.3	$-C=O$ $-H_2O$	$C_{60}(CO)_2COH(COOH)$
488 (480–520)	4.3	4.2	$-C=O$ $-H_2O$	$C_{60}(CO)_3$

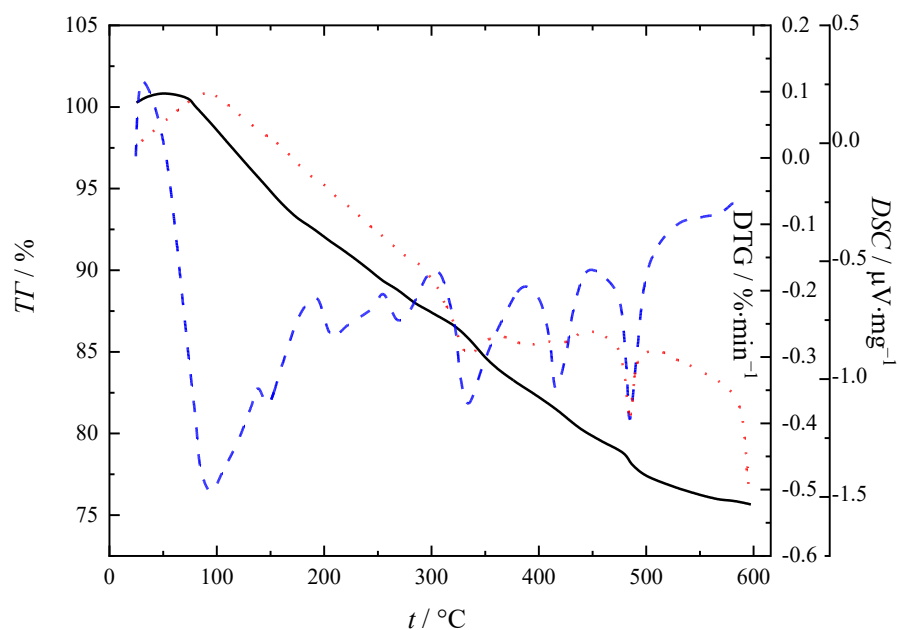


Fig. 3.14. Complex thermal analysis of the $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ adduct: *TG* curve (solid line), *DTG* curve (dashed line), *DSC* curve (dashed line).

Analysis of the chromatogram of carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ allowed us to conclude that the purity of the synthesised sample is 99.5 % (Fig. 3.15).

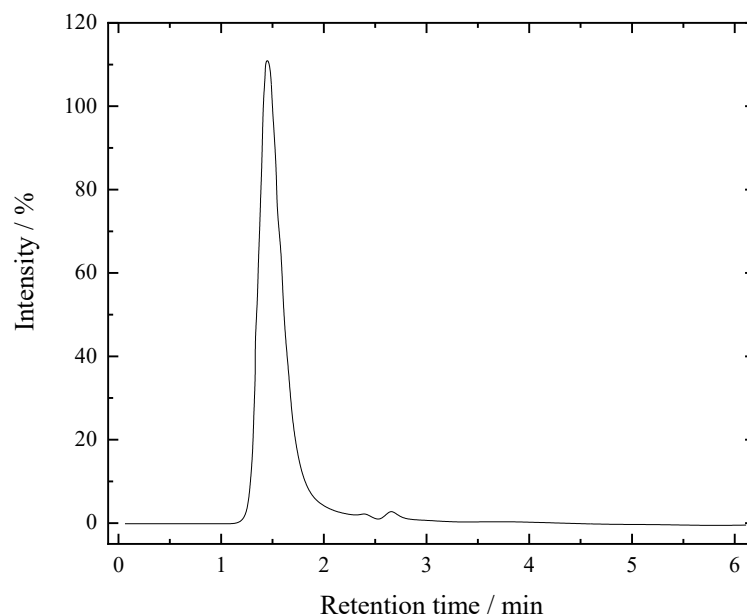


Fig. 3.15. Sample liquid chromatogram of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. Column: Phenomenex[®] NH2 (150 × 2.0 mm, 5 μm, 100 Å), eluent: acetonitrile/acetic acid aqueous solution (0.1 %) (5:95), 0.2 ml/min, sample volume: 20 μl, detection: diode array.

3.2. Physicochemical properties of derivatives

The study of the physicochemical properties of aqueous solutions of light fullerene adducts is important for their further biomedical application. In particular, it is important to have information about the compatibility of adducts with water and aqueous solutions, their state in aqueous solutions, since the mechanism of their biological action may change depending on the size of the aggregates. In turn, data on density and viscosity are necessary to assess the effect of fullerene adducts on haemocompatibility. To date, our scientific group has published a large number of works devoted to the study of the physicochemical properties of solutions, phase equilibria, as well as the thermodynamic properties of fullerenes in a wide temperature range [62,79,93,94,99,105,106,203,211]. As an example, let us dwell on the experimental results obtained for the C₆₀ fullerene adduct with glycine.

3.2.1. Density of aqueous solutions of C₆₀-Gly

The results of an experimental study of the density of C₆₀-Gly aqueous solutions in the temperature range $T = 278.15\text{--}323.15$ K and the concentration range $C = 0.15 - 15$ g dm⁻³ are shown in Fig. 3.16 and Table 3.4. As can be seen from Fig. 3.16, there is an increase in density with increasing concentration of aqueous solutions. The obtained data on the concentration and temperature dependences of density (Fig. 3.16) were used to calculate the average molar volumes (\bar{V}) of solutions according to Eq. 2 (Fig. 3.17):

$$\bar{V} = \frac{V}{n_{\text{H}_2\text{O}} + n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}}, \quad (2)$$

where V is the volume of an aqueous solution of C₆₀-Gly; $n_{\text{H}_2\text{O}}$ and $n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}$ are amount of water substance and C₆₀-Gly in 1 dm³ of solution.

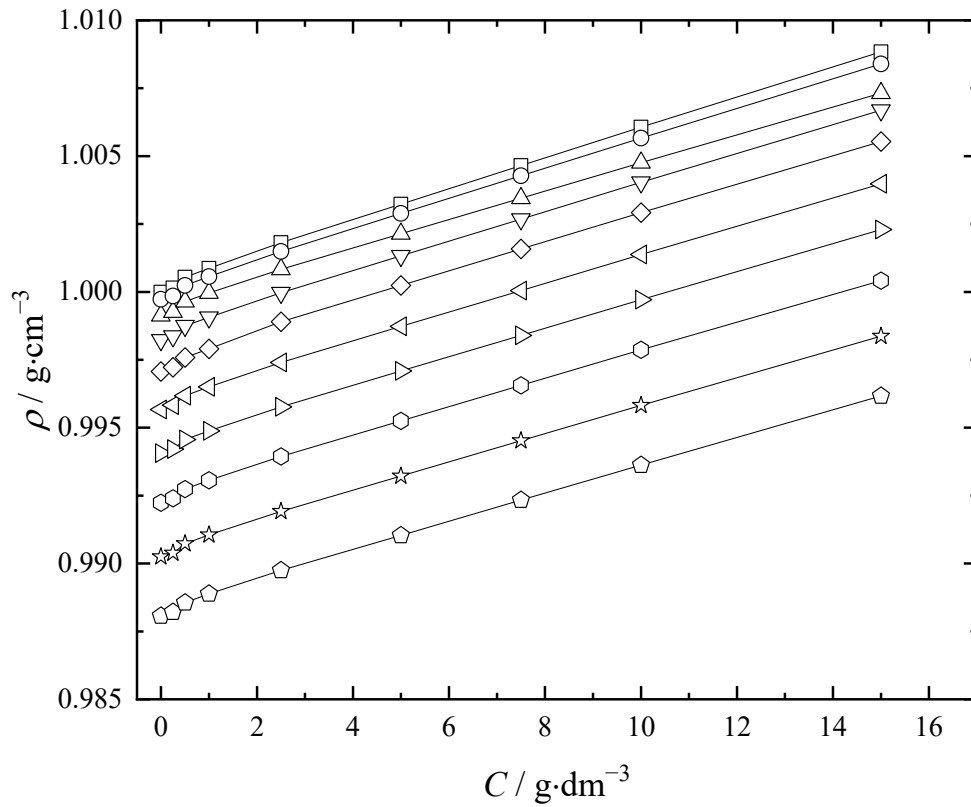


Fig. 3.16. Concentration dependences of density (ρ) of C_{60} -Gly aqueous solutions at (\square) 278.15 K, (\circ) 283.15 K, (\triangle) 288.15 K, (∇) 293.15 K, (\diamond) 298.15 K, (\triangleleft) 303.15 K, (\triangleright) 308.15 K, (\odot) 313.15 K, (\star) 318.15 K and (\diamond) 323.15 K. C is the volume concentration of C_{60} -Gly in aqueous solution.

Table 3.4. Temperature (T) and concentration (C) dependences of density (ρ) of C₆₀-Gly aqueous solutions.

$C / \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$\rho / \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$									
	278.15 K	283.15 K	288.15 K	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K	318.15 K	323.15 K
0	0.99999	0.99973	0.99913	0.99823	0.99707	0.99567	0.99406	0.99224	0.99025	0.98807
0.25	1.00015	0.99985	0.99926	0.99838	0.99723	0.99583	0.99421	0.99240	0.99039	0.98821
0.5	1.00036	1.00006	0.99947	0.99857	0.99741	0.99600	0.99438	0.99256	0.99055	0.98838
1	1.00069	1.00039	0.99979	0.99889	0.99773	0.99633	0.99471	0.99289	0.99088	0.98871
2.5	1.00165	1.00132	1.00066	0.99980	0.99873	0.99723	0.99560	0.99377	0.99175	0.98958
5	1.00307	1.00273	1.00198	1.00117	1.00008	0.99857	0.99693	0.99509	0.99306	0.99088
7.5	1.00450	1.00413	1.00330	1.00253	1.00143	0.99990	0.99825	0.99641	0.99437	0.99219
10	1.00593	1.00553	1.00462	1.00390	1.00278	1.00124	0.99958	0.99773	0.99569	0.99349
15	1.00878	1.00834	1.00726	1.00663	1.00548	1.00392	1.00224	1.00036	0.99831	0.99611

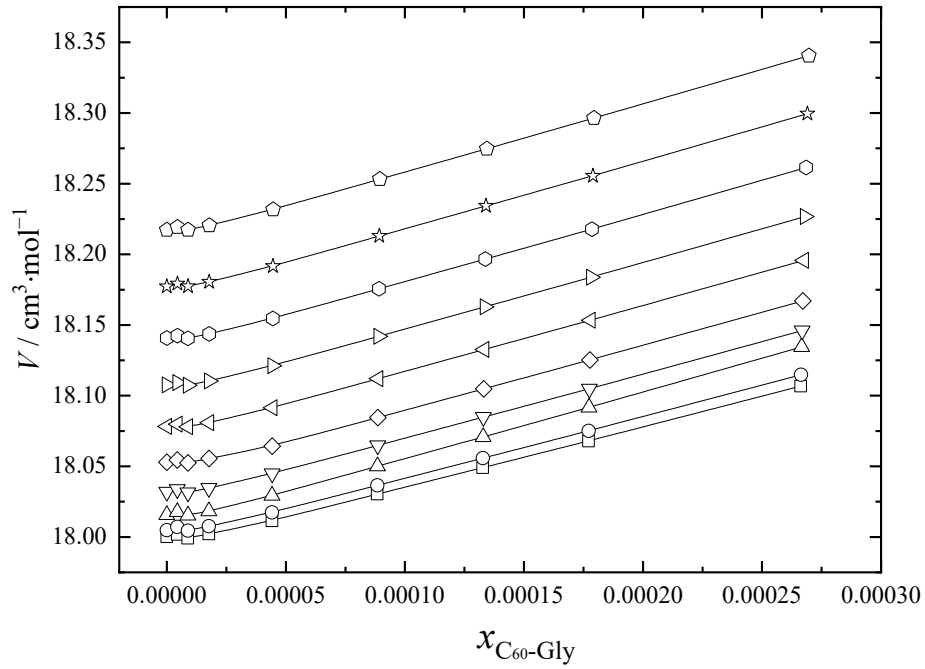


Fig. 3.17. Concentration dependences of the average molar volume (\bar{V}) of C₆₀-Gly aqueous solutions at (□) 278.15 K, (◊) 283.15 K, (△) 288.15 K, (▽) 293.15 K, (◇) 298.15 K, (◁) 303.15 K, (▷) 308.15 K, (⊙) 313.15 K, (☆) 318.15 K and (⊕) 323.15 K. x is C₆₀-Gly mole fraction.

Partial molar volumes of solution components ($V_{\text{H}_2\text{O}}$ and $V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}$) were calculated using Eqs. 3 and 4:

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P,n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} \quad V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} \right)_{T,P,n_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (3)$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \bar{V} - x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} \right)_{T,P} \quad V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} = \bar{V} - x_{\text{H}_2\text{O}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P}$$

(4)

Figs. 3.18 and 3.19 show the concentration dependences of the partial molar volumes of C₆₀-Gly and H₂O ($V_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}$ and $V_{\text{H}_2\text{O}}$) in the temperature range $T = 278.15\text{--}323.15$ K. At all temperatures studied, the concentration dependences of the partial molar volumes of C₆₀-Gly have a complex behaviour: at low concentrations of C₆₀-Gly, the partial molar volumes are negative and take extremely high (in modulus) values. This means that the addition of even a

small amount of the C₆₀-Gly derivative leads to significant densification and structuring of aqueous solutions.

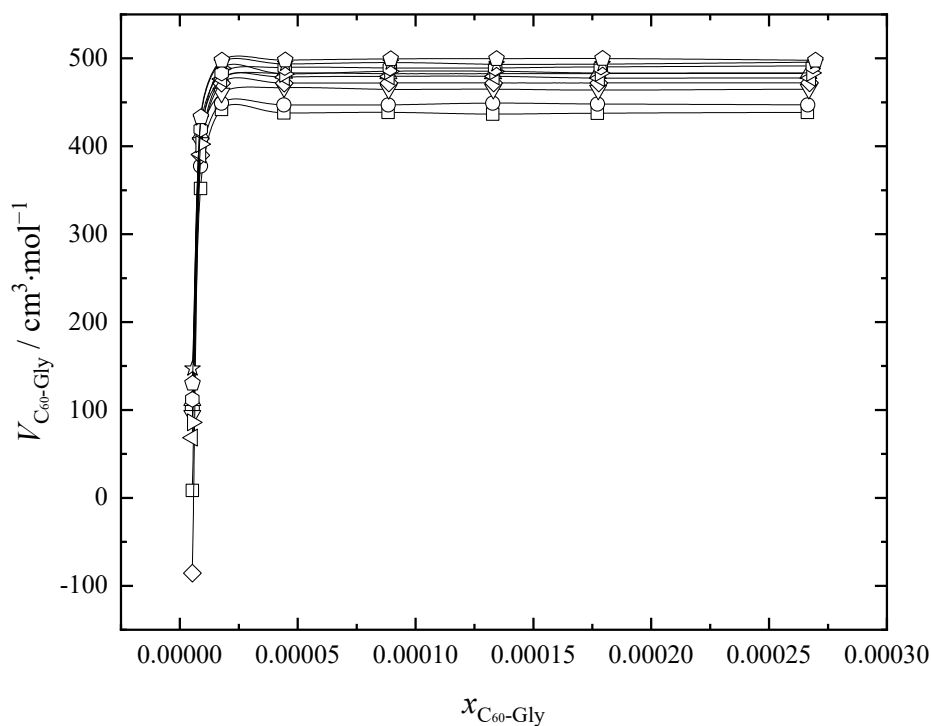


Fig. 3.18. Dependence of the partial molar volume of C₆₀-Gly ($V_{C_{60}\text{-Gly}}$) on its mole fraction (x) in the temperature range 278.15–323.15 K: (\square) 278.15 K, (\circ) 283.15 K, (\triangle) 288.15 K, (∇) 293.15 K, (\diamond) 298.15 K, (\triangleleft) 303.15 K, (\triangleright) 308.15 K, (\odot) 313.15 K, (\star) 318.15 K and (\ominus) 323.15 K.

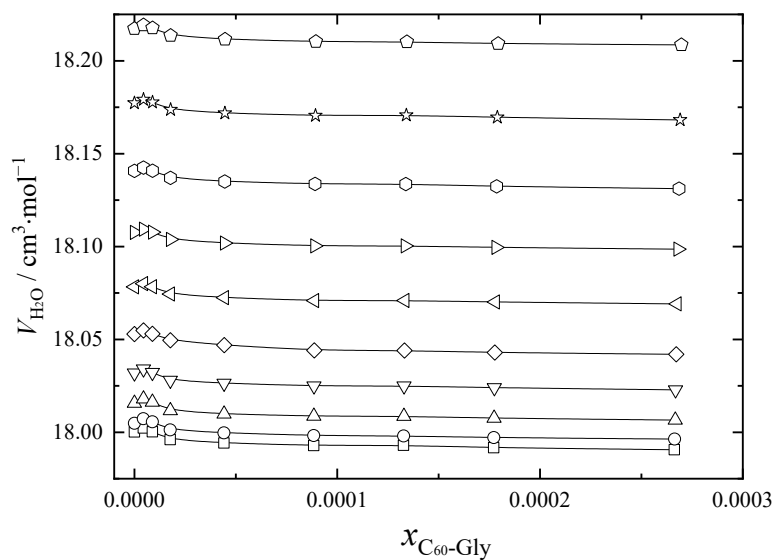


Fig. 3.19. Dependence of the partial molar volume of water ($V_{\text{H}_2\text{O}}$) on the mole fraction (x) of C₆₀-Gly at different temperatures: (□) 278.15 K, (○) 283.15 K, (△) 288.15 K, (▽) 293.15 K, (◇) 298.15 K, (◁) 303.15 K, (▷) 308.15 K, (⊙) 313.15 K, (☆) 318.15 K and (⊕) 323.15 K.

It is well known that the higher-order derivatives of the Gibbs potential (in our case, the second derivatives) corresponding to the first derivatives of volume or entropy are much more sensitive to changes in the structure of the solution than low-order partial derivatives. Mixed second-order derivatives of the Gibbs potential were determined from experimental data on the densities of aqueous solutions of C₆₀-Gly using the Maxwell relations:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial T} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial T \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial T} \right)_P = - \left(\frac{\partial \bar{S}}{\partial P} \right)_T, \quad (5)$$

where $\bar{G}, \bar{V}, \bar{S}$ are average molar values: Gibbs potential, volume and entropy.

It is clearly seen that the function $(\partial \bar{V} / \partial T)_P(x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}})$ passes through a minimum at the concentration of the fullerene adduct at all considered temperatures (Fig. 3.20). We came to the conclusion that at this temperature in an aqueous solution of C₆₀-Gly phase separation occurs and diffusion stability is lost. This fact is associated with a complex type of C₆₀-Gly aggregation in an aqueous solution, that is, with the formation of second-type associates with linear dimensions of hundreds of nanometres.

It can be seen that in the studied temperature range, the function $(\partial \bar{V} / \partial T)_P(x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}})$ passes through a minimum at $x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} \approx 5.3 \cdot 10^{-6}$ (Fig. 3.20). This concentration corresponds to the loss of diffusion stability by an aqueous solution of C₆₀-Gly. The latter fact is associated with a complex type of C₆₀-Gly association in solution, namely, with the formation of second-order associates with linear dimensions of hundreds of nm.

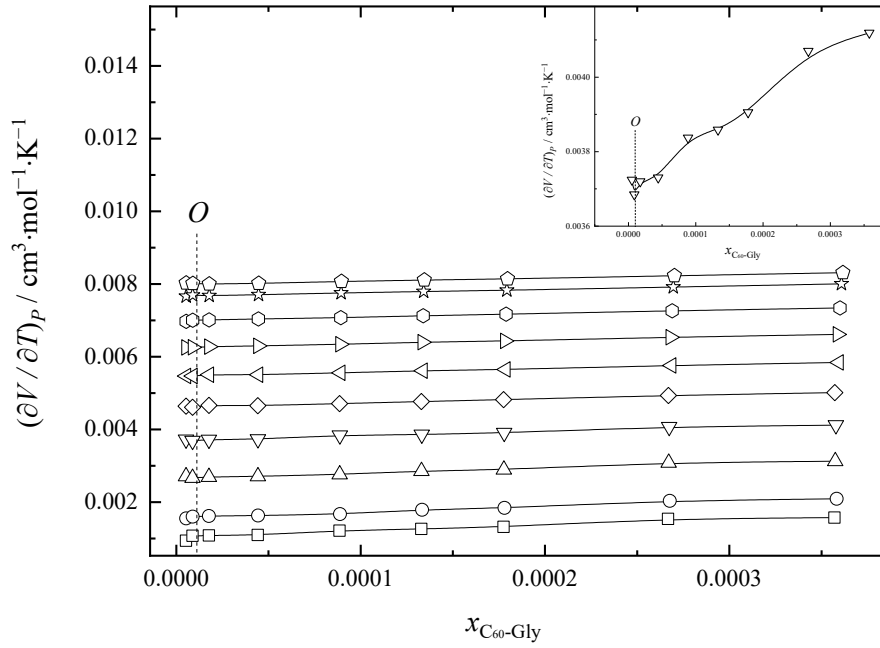


Fig. 3.20. Concentration dependence of the derivative $\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$ in the temperature range 278.15–

323.15 K: $(\square) \left(\frac{\partial V_{278.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\circ) \left(\frac{\partial V_{283.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\triangle) \left(\frac{\partial V_{288.15}}{\partial T}\right)_{T,P}$, $(\nabla) \left(\frac{\partial V_{293.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\diamond) \left(\frac{\partial V_{298.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\triangleleft) \left(\frac{\partial V_{303.15}}{\partial T}\right)_{T,P}$, $(\triangleright) \left(\frac{\partial V_{308.65}}{\partial T}\right)_P$, $(\odot) \left(\frac{\partial V_{313.15}}{\partial T}\right)_P$, $(\star) \left(\frac{\partial V_{318.15}}{\partial T}\right)_P$ and $(\ominus) \left(\frac{\partial V_{323.15}}{\partial T}\right)_{T,P}$. O is an

extremum $\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x \partial T}\right)_P = 0$, $x = 5.3 \cdot 10^{-6}$.

Similar results were obtained using another mixed derivative of the Gibbs potential:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial x} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x}\right)_{T,P} = \left(\frac{\partial \mu_{C_{60}\text{-Gly}}}{\partial P}\right)_T - \left(\frac{\partial \mu_{H_2O}}{\partial P}\right)_T = V_{C_{60}\text{-Gly}} - V_{H_2O}, \quad (6)$$

where V_i is a partial molar volume, μ_i is a chemical potential of the i -th component.

It is clearly seen that the dependence $(\partial \bar{V} / \partial x)_{P,T}(x_{C_{60}\text{-Gly}})$ also passes through a minimum at a concentration $x_{C_{60}\text{-Gly}} \approx 5.3 \cdot 10^{-6}$ (Fig. 3.21).

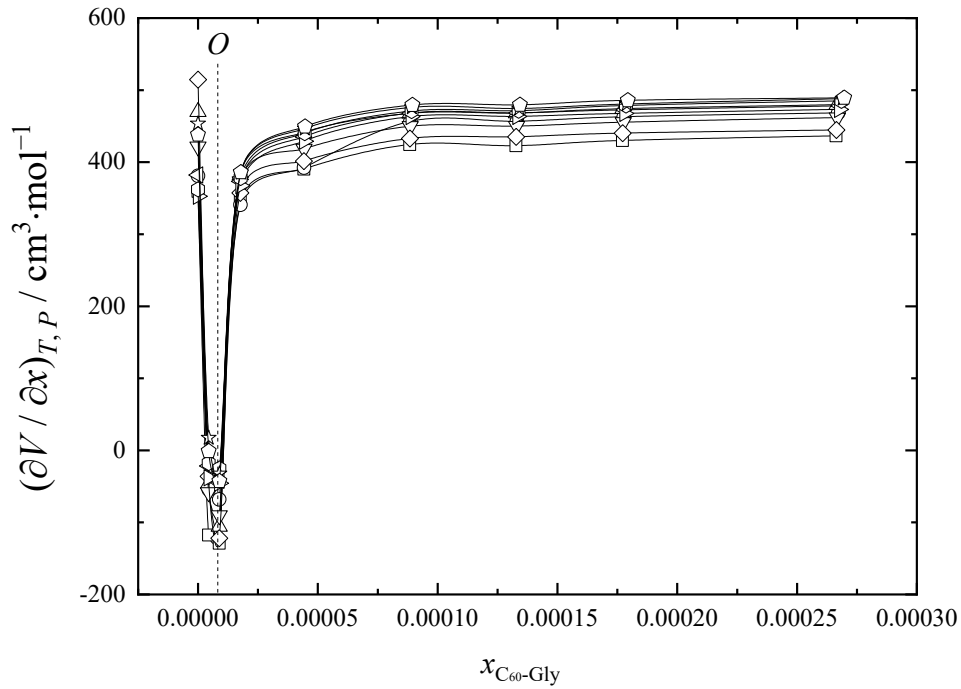


Fig. 3.21. Concentration dependence of the derivative $\left(\frac{\partial V}{\partial x_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}}\right)_{T,P}$ in the temperature range 278.15–323.15 K. (\square) 278.15 K, (\circ) 283.15 K, (\triangle) 288.15 K, (∇) 293.15 K, (\diamond) 298.15 K, (\triangleleft) 303.15 K, (\triangleright) 308.15 K, (\odot) 313.15 K, (\star) 318.15 K and (\ominus) 323.15 K. O is an extremum ($\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x^2}\right)_{T,P} = 0, x = 5.3 \cdot 10^{-6}$).

3.2.2. Speed of sound in aqueous solutions of C₆₀-Gly

Table 3.5 presents the obtained values of the speed of sound in the binary system C₆₀-Gly–H₂O in the temperature range $T = 278.15\text{--}333.15$ K. Using the experimental data, the isentropic compressibility (κ_S) was calculated using the Laplace equation:

$$\kappa_S = \rho^{-1} \cdot u^{-2}, \quad (7)$$

where ρ is density of an aqueous solution of C₆₀-Gly, u is the speed of sound.

The obtained dependences of κ_S on the molar concentration of C₆₀-Gly are shown in Fig. 3.22. A decrease in κ_S can be observed with an increase in the concentration of C₆₀-Gly.

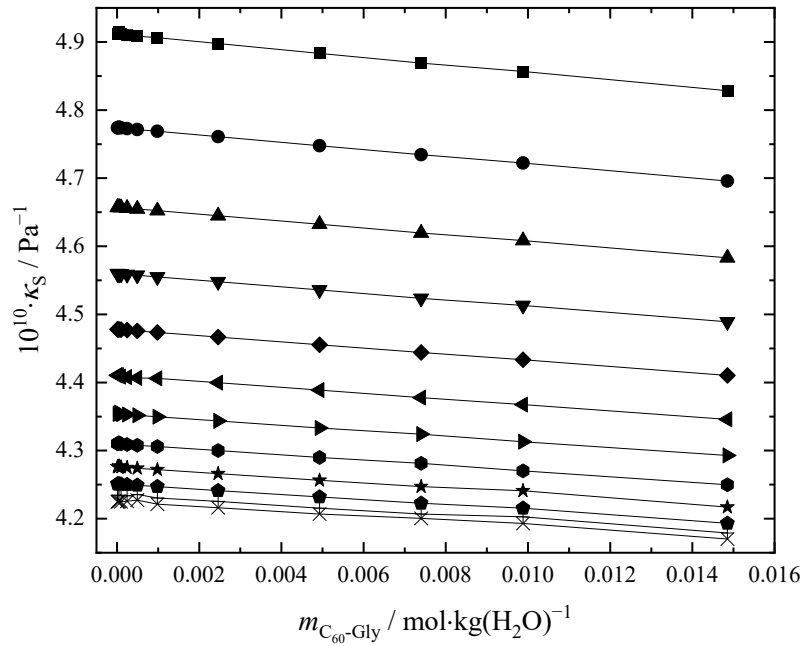


Fig. 3.22. Concentration dependence of the isentropic compressibility (κ_s) of an aqueous solution of C₆₀-Gly at temperatures: (■) 278.15 K, (●) 283.15 K, (▲) 288.15 K, (▼) 293.15 K, (◆) 298.15 K, (◄) 303.15 K, (►) 308.15 K, (⬢) 313.15 K, (★) 318.15 K, (⬠) 323.15 K, (+) 328.15 K, (×) 333.15 K.

The apparent specific isentropic compressibility ($\kappa_{S,\phi}$) characterises the intermolecular interactions between a solute and a solvent. This value is calculated according to Eq. 8:

$$\kappa_{S,\phi} = \frac{\kappa_S(1 + m_{\text{C}_{60}\text{-Gly}})}{\rho m_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}} - \frac{\kappa_{S0}}{\rho_0 m_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}}, \quad (8)$$

where $m_{\text{C}_{60}\text{-Gly}}$ is molality of C₆₀-Gly, κ_S and κ_{S0} are isentropic compressibility of C₆₀-Gly and water, correspondingly, ρ and ρ_0 are densities of aqueous solutions of C₆₀-Gly and water, respectively.

Table 3.5. Temperature (T) and concentration (C) dependences of the speed of sound (u) of aqueous solutions of C₆₀-Gly.

$C /$ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$u / \text{m}\cdot\text{s}^{-1}$											
	278.15 K	283.15 K	288.15 K	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K	318.15 K	323.15 K	328.15 K	333.15 K
0.01	1426.86	1447.46	1465.94	1482.21	1496.54	1509.01	1519.99	1529.13	1536.75	1542.99	1547.86	1551.61
0.025	1426.92	1447.55	1466.00	1482.23	1496.56	1509.03	1520.00	1529.13	1536.77	1542.98	1547.94	1551.53
0.05	1426.46	1447.32	1465.93	1482.31	1496.57	1509.00	1519.72	1528.88	1536.53	1542.99	1547.87	1551.49
0.1	1426.85	1447.48	1465.97	1482.24	1496.57	1509.31	1520.05	1529.17	1536.78	1542.99	1547.87	1551.53
0.25	1427.01	1447.60	1466.06	1482.32	1496.64	1509.40	1520.13	1529.24	1536.88	1543.05	1547.92	1551.57
0.5	1427.12	1447.69	1466.16	1482.41	1496.73	1509.49	1520.22	1529.36	1536.94	1543.14	1548.02	1551.65
1	1427.27	1447.87	1466.37	1482.62	1496.93	1509.40	1520.38	1529.50	1537.12	1543.32	1548.20	1551.84
2.5	1427.94	1448.50	1466.95	1483.17	1497.46	1509.90	1520.86	1529.96	1537.58	1543.79	1548.60	1552.25
5	1429.06	1449.56	1467.94	1484.11	1498.36	1510.77	1521.68	1530.75	1538.32	1544.48	1549.33	1552.94
7.5	1430.20	1450.57	1468.99	1485.15	1499.27	1511.64	1522.27	1531.33	1539.09	1545.32	1550.06	1553.63
10	1431.07	1451.53	1469.84	1485.94	1500.13	1512.47	1523.30	1532.32	1540.23	1546.86	1552.13	1555.30
15	1433.22	1453.59	1471.85	1487.87	1501.98	1514.24	1525.10	1534.03	1541.52	1547.59	1552.22	1555.72

The calculated molar dependences of the apparent specific isentropic compressibility of C₆₀-Gly aqueous solutions in the temperature range $T = 278.15\text{--}333.15$ K are shown in Fig. 3.23. Positive values of $\kappa_{S,\phi}$ indicate that the water molecules surrounding the molecules of the C₆₀-Gly adduct have a lower resistance to compression compared to bulk water molecules, which is consistent with the conclusion about the densification of aqueous solutions of C₆₀-Gly obtained from the concentration dependence of the density. As can be seen from Fig. 3.23, the values of $\kappa_{S,\phi}$ decrease with increasing concentration of C₆₀-Gly, which means that the solution becomes less compressible compared to a pure solvent due to an increase in intermolecular interactions between water molecules and C₆₀-Gly nanoparticles. At the same time, an increase in temperature leads to a weakening of intermolecular interactions and a decrease in $\kappa_{S,\phi}$.

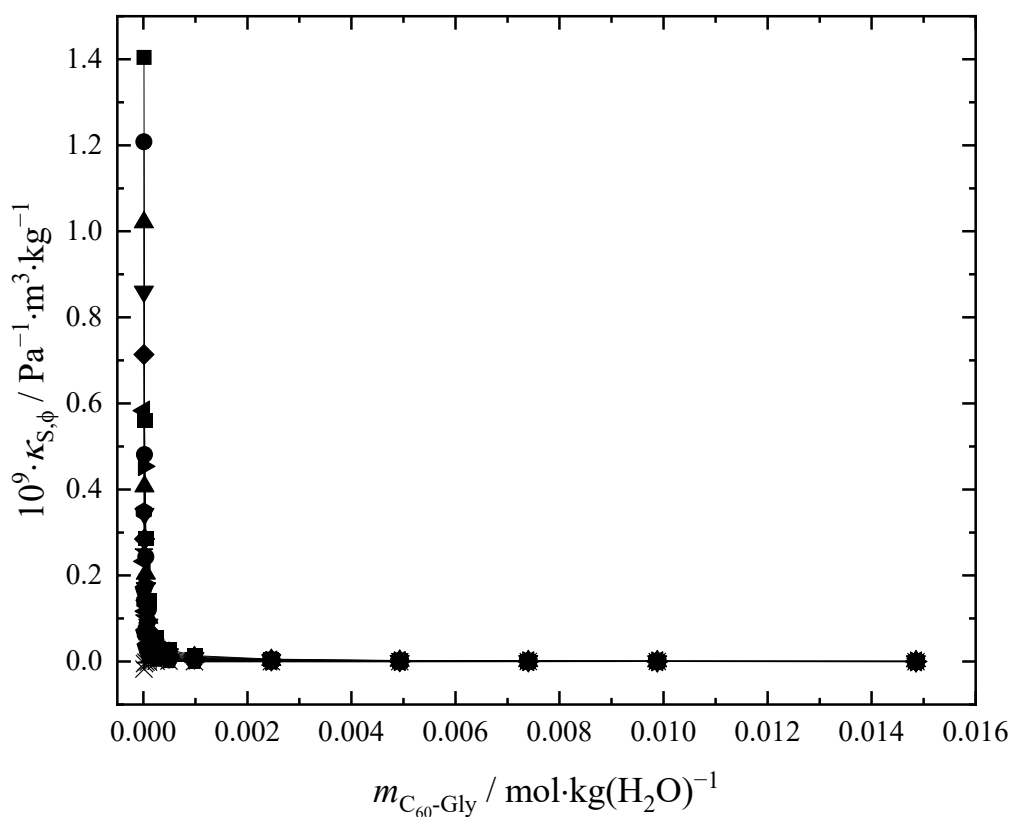


Fig. 3.23. Concentration dependence of the apparent specific isentropic compressibility ($\kappa_{S,\phi}$) of an aqueous solution of C₆₀-Gly at different temperatures: (■) 278.15 K, (●) 283.15 K, (▲) 288.15 K, (▼) 293.15 K, (◆) 298.15 K, (◄) 303.15 K, (►) 308.15 K, (●) 313.15 K, (★) 318.15 K, (●) 323.15 K, (+) 328.15 K, (×) 333.15 K.

3.2.3. Viscosity of aqueous solutions of C₆₀-Gly

The concentration dependences of the dynamic viscosity $\eta(C)$ of C₆₀-Gly aqueous solutions are presented in Table 3.6 and Fig. 3.24 ($T = 278.15\text{--}323.15\text{ K}$). It can be seen that with an increase in the concentration of C₆₀-Gly, an increase in viscosity occurs.

To determine the values of kinematic viscosity (η_k) in the same temperature range, used Eq. 9:

$$\eta_k = \frac{\eta}{\rho}, \quad (9)$$

where η is a dynamic viscosity, ρ is a density of aqueous solutions of C₆₀-Gly.

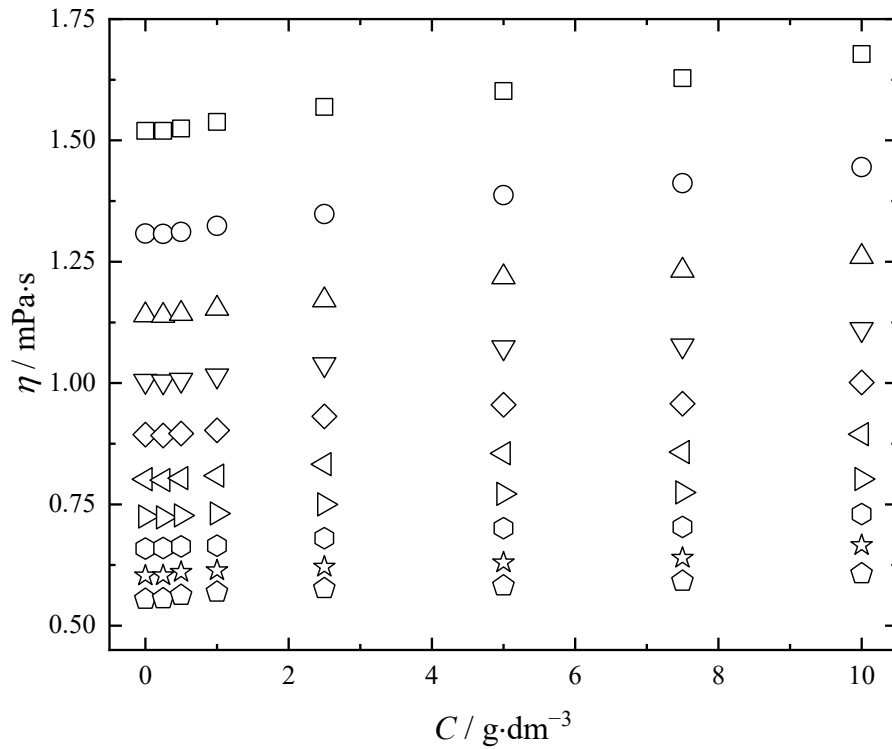


Fig. 3.24. Concentration dependences of dynamic viscosity (η) at a shear rate of 100 s^{-1} in the C₆₀-Gly–H₂O binary system at (□) 278.15 K, (○) 283.15 K, (△) 288.15 K, (▽) 293.15 K, (◇) 298.15 K, (◁) 303.15 K, (▷) 308.15 K, (⊙) 313.15 K, (☆) 318.15 K and (⊕) 323.15 K. C is the volume concentration.

Table 3.6. Temperature (T) and concentration (C) dependences of viscosity (η) of aqueous solutions C₆₀-Gly.

$C / \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$\eta / \text{mPa}\cdot\text{s}$									
	278.15 K	283.15 K	288.15 K	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K	318.15 K	323.15 K
0	1.5196	1.3080	1.1401	1.0040	0.8938	0.8019	0.7247	0.6591	0.6030	0.5544
0.25	1.5197	1.3073	1.1390	1.0030	0.8921	0.8001	0.7230	0.6601	0.6033	0.5557
0.50	1.5245	1.3115	1.1430	1.0064	0.8959	0.8039	0.7271	0.6633	0.6105	0.5625
1.00	1.5381	1.3238	1.1534	1.0152	0.9025	0.8093	0.7313	0.6648	0.6136	0.5694
2.50	1.5690	1.3483	1.1707	1.0382	0.9315	0.8327	0.7500	0.6803	0.6210	0.5764
5.00	1.6018	1.3873	1.2182	1.0735	0.9552	0.8551	0.7717	0.7008	0.6298	0.5822
7.50	1.6282	1.4117	1.2318	1.0772	0.9575	0.8578	0.7745	0.7035	0.6396	0.5916
10.00	1.6780	1.4449	1.2601	1.1110	1.0013	0.8946	0.8023	0.7300	0.6655	0.6070

The thermodynamic parameters of the viscous flow were calculated using the Eyring equation:

$$\eta = \frac{hN_A}{V} \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)_p, \quad (10)$$

where η is a dynamic viscosity, h is a Planck's constant, N_A is Avogadro's number, V is a molar volume.

Thermodynamic characteristics of viscous flow (ΔG , ΔH , ΔS) were calculated according to Eq. 11–13 (Table 3.7):

$$\Delta G = RT \ln \frac{\eta V}{hN_A}, \quad (11)$$

$$\Delta H = -RT^2 \frac{\partial}{\partial T} \left(\ln \frac{\eta V}{hN_A} \right), \quad (12)$$

$$\Delta S = -\frac{\Delta G^* \cdot \Delta H^*}{T}. \quad (13)$$

Table 3.7. Concentration dependence of entropy factor ($\ln A_S$), viscous flow activation energy (E_a), Arrhenius temperature (T_A), activation enthalpy (ΔH), and entropy (ΔS). C is the concentration of an aqueous solution of C₆₀-Gly.

$C / \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$E_a / \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\ln A_S / \ln[\text{mPa}\cdot\text{s}]$	T_A / K	$\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
0.25	16628.31	-6.8027	294.01	33.26	-66.82
0.50	16489.88	-6.7415	294.21	32.98	-67.83
1.00	16714.61	-6.8265	294.50	33.43	-66.42
2.50	16849.53	-6.8424	296.19	33.70	-66.16
5.00	16860.55	-6.8326	296.81	33.72	-66.32
7.50	16914.73	-6.8519	296.92	33.83	-66.00
10.00	16715.11	-6.7354	298.50	33.43	-67.94

ΔH and ΔS carry information about the interactions of a solute with a solvent. Analysis of Table 3.7 shows the stability of enthalpies (ΔH^*) and entropies (ΔS^*) of viscous flow over the entire concentration range ($C = 0.25\text{--}10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$), taking into account the accuracy of numerical differentiation. Positive ΔH values indicate specific interactions between molecules; negative ΔS values indicate that the formation of an activated complex leads to molecular

ordering in solution. Using the logarithmic form of the Frenkel–Andrade equation, the activation energy of the viscous flow and the pre-exponential factor were calculated (Table 3.7):

$$\ln \eta = \ln A_S + \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}, \quad (14)$$

where A_S is pre-exponential factor, E_a is activation energy for the transition state, R is the universal gas constant, T is the absolute temperature.

Activation temperatures were determined according to Eq. 15 (Table 3.7):

$$T_A = \frac{-E_a}{R \ln A_S}. \quad (15)$$

Additionally, the van't Hoff coefficients for the viscosity (γ_η) of the C₆₀-Gly–H₂O binary system were calculated in accordance with Eq. 16:

$$\gamma_\eta^{10} = \frac{\eta_{T-\Delta T}}{\eta_T} = 1.26 \pm 0.07, \quad (16)$$

where γ_η is van't Hoff viscosity coefficient (Fig. 3.25).

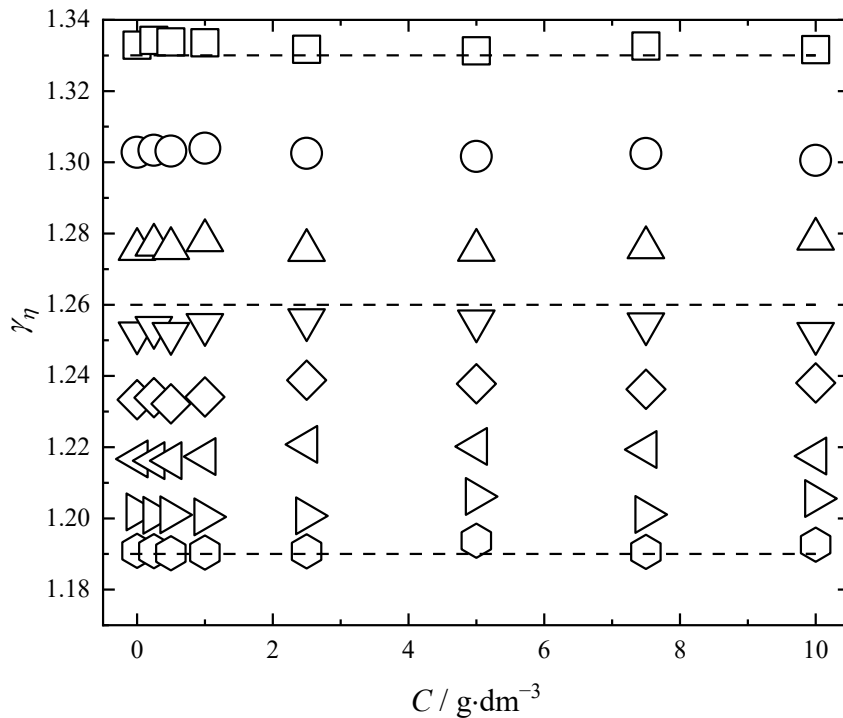


Fig. 3.25. Concentration dependence of the van't Hoff viscosity coefficient ($\gamma_\eta = 1.26 \pm 0.07$) in the binary system C₆₀-Gly-water. (\square) $\frac{\eta_{278.15}}{\eta_{288.15}}$, (\circ) $\frac{\eta_{283.15}}{\eta_{293.15}}$, (\triangle) $\frac{\eta_{288.15}}{\eta_{298.15}}$, (∇) $\frac{\eta_{293.15}}{\eta_{303.15}}$, (\diamond) $\frac{\eta_{298.15}}{\eta_{308.15}}$, (\triangleleft) $\frac{\eta_{303.15}}{\eta_{313.15}}$, (\triangleright) $\frac{\eta_{308.15}}{\eta_{318.15}}$, (\odot) $\frac{\eta_{313.15}}{\eta_{323.15}}$.

The temperature dependences of the dynamic viscosities (Fig. 3.26) of the C₆₀-Gly-H₂O binary system were described using the three-parameter Vogel-Fulcher-Tammann equation (VFT):

$$\lg \eta(T) = \lg \eta_0 + \frac{A}{T - B}, \quad (17)$$

where η_0 , A and B are correlation parameters.

The mean absolute deviation (AAD) and standard deviation (SD) values between the experimental and calculated data were obtained in accordance with Eqs. 18 and 19:

$$AAD = \left[\sum_{i=1}^n \left(\frac{\eta_{\text{exp},i} - \eta_{\text{cal},i}}{\eta_{\text{exp},i}} \right) \right] \cdot \frac{100}{n}, \quad (18)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\eta_{\text{exp},i} - \eta_{\text{cal},i})^2}{n - p}}, \quad (19)$$

where $\eta_{\text{exp},i}$ and $\eta_{\text{cal},i}$ are experimental and calculated dynamic viscosity, n is a number of experimental points, p is a number of adjustable parameters.

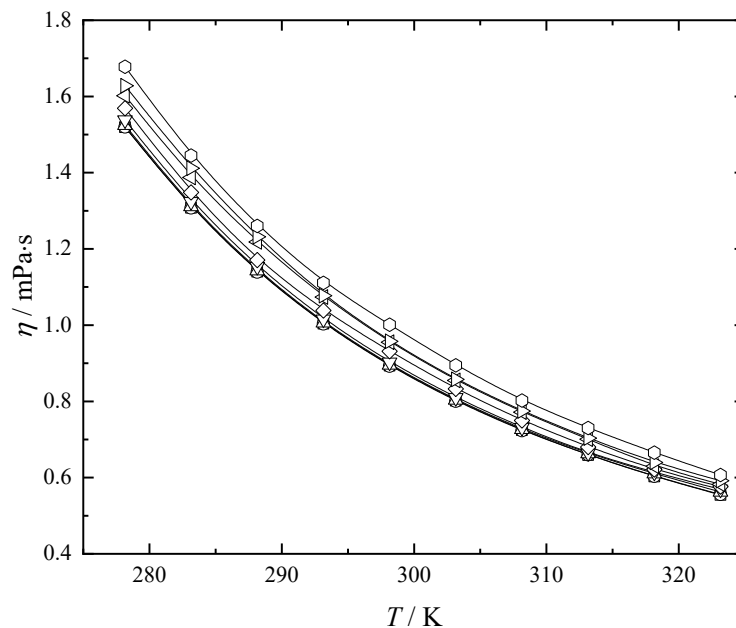


Fig. 3.26. Temperature dependences of dynamic viscosity (η) at a shear rate of 100 s^{-1} in the $\text{C}_{60}\text{-Gly-H}_2\text{O}$ binary system at various $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ concentrations: (\square) $0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (\circ) $0.25 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (\triangle) $0.5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (∇) $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (\diamond) $2.5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (\triangleleft) $5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (\triangleright) $7.5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (\odot) $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Dots are experimental values; solid lines are approximations according to the VFT equation at various concentrations.

The values of the parameters of the VFT equation, as well as the values of SD and AAD are presented in Table 3.8.

Table 3.8. Correlation parameters for the VFT equation. C is the concentration of $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ in an aqueous solution, SD is the standard deviation, AAD is the absolute mean deviation.

	$C_{\text{C}_{60}\text{-Gly}} / \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$						
	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	7.50	10.00
$\eta_0 / \text{mPa}\cdot\text{s}$	0.0376	0.0382	0.0378	0.0391	0.0397	0.0396	0.0420
A / K	192.4	192.2	192.4	192.5	192.5	192.6	192.3
B / K	158.3	158.0	158.5	158.7	158.7	158.8	158.0
$SD / \text{mPa}\cdot\text{s}$	0.0013	0.0023	0.0014	0.0016	0.0025	0.0033	0.0057
$AAD / \%$	0.23	0.35	0.13	0.13	0.18	0.27	0.40

3.2.4. Isobaric heat capacity

The temperature dependences of the isobaric heat capacity in the range $T = 282.85\text{--}322.85 \text{ K}$ for water, $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ solid, and $\text{C}_{60}\text{-Gly}$ aqueous solution ($C = 30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) are shown in Fig. 3.27.

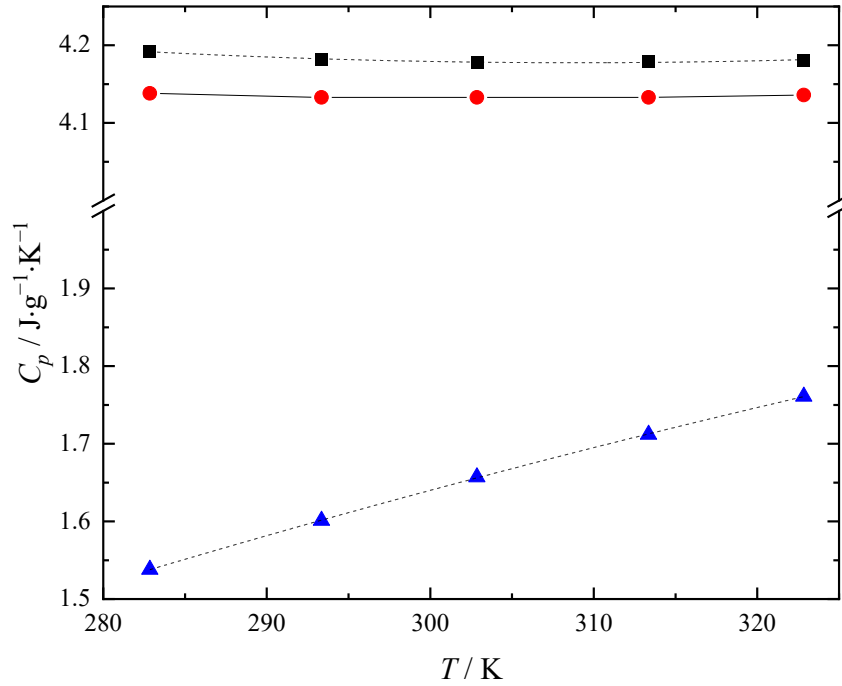


Fig. 3.27. Isobaric heat capacity dependences (C_p) on temperature (T) for water (■), solid C₆₀-Gly (●) and aqueous solution of C₆₀-Gly ($C = 30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) (▲). Dots are experimental values; the solid line is the result of the calculation according to Eq. 20, dotted lines are the result of approximation using Eq. 21.

The experimental values of the heat capacities of C₆₀-Gly aqueous solutions were compared with the calculated values ($C_{p, \text{solution}}$) obtained using Eq. 20, which is widely used to predict the heat capacities of dispersions and solutions [212,213]:

$$C_{p, \text{solution}} = w \cdot C_{p, \text{C}_{60}\text{-Gly}} + (1-w) \cdot C_{p, \text{H}_2\text{O}}, \quad (20)$$

where w is mass fraction of C₆₀-Gly in aqueous solution, $C_{p, \text{C}_{60}\text{-Gly}}$ is isobaric heat capacity of a solid C₆₀-Gly, $C_{p, \text{H}_2\text{O}}$ is isobaric heat capacity of water. The calculation result is shown in Fig. 3.27.

The temperature dependences of C_p for water and solid C₆₀-Gly were described using the polynomial equation:

$$C_p = a_0 + a_1 T + a_2 T^2 \quad (21),$$

where a_i ($i = 0-2$) are fixed coefficients. The coefficients a_i are presented in Table 3.9.

Table 3.9. Fixed coefficients a_i ($i = 0-2$) of the polynomial Eq. 21, describing the temperature dependences of the isobaric heat capacity of water and C₆₀-Gly.

Sample	$a_0 / \text{J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$a_1 / \text{J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$a_2 / \text{J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	R^2
H ₂ O	6.150	-0.0128	$2.066 \cdot 10^{-5}$	0.984
C ₆₀ -Gly	-1.568	0.0157	$-1.675 \cdot 10^{-5}$	0.999

3.2.5. Size distribution of C₆₀-Gly nanoparticles in aqueous solution and ζ -potentials

Fig. 3.28 and Table 3.10 shows the concentration dependence of the size distribution of C₆₀-Gly associates in aqueous solutions in the concentration range $C = 0.01\text{--}10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ at $T = 298.15 \text{ K}$.

The number of associates of the i -th type packed into an associate of the $(i + 1)$ -th type ($N_{i \rightarrow i+1}$) was determined by Eq. 22:

$$N_{i \rightarrow i+1} = \left(\frac{d_{i+1}}{d_i} \right)^3 \cdot K_{\text{pack}}, \quad (22)$$

where K_{pack} is a formal packing coefficient that characterises the ratio of the volume occupied by the monomeric molecules of the C₆₀ adduct with glycine in the associate to the total volume of the associate (in the spheroid approximation). Due to the relatively large size and charge of C₆₀-Gly ions in aqueous solutions, we chose a packing factor corresponding to a primitive cubic cell ($K_{\text{pack}} = 0.52$).

Analysis of Table 3.10 and Fig. 3.28 allows us to draw the following conclusions: (i) there are no monomeric C₆₀-Gly molecules with linear dimensions of 2 nm in the solution in the C₆₀-Gly concentration range $C = 0.01\text{--}10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; (ii) in the range of low concentrations ($C = 0.01\text{--}0.3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), the solution contains first-order associates with a linear size of 30–50 nm; (iii) second-order associates with a linear size of 100–400 nm, along with first-order associates, were detected in the concentration range $C = 0.3\text{--}0.5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; (iv) in more concentrated solutions ($C = 0.5\text{--}10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), in addition to second-order associates, there are third-order associates with a linear size of 1–2 μm .

Using the Helmholtz–Smoluchowski equation, the ζ -potentials were calculated based on the experimental values of the electrophoretic mobility. Analysis of the values of ζ -potentials (Table 3.10) shows that their values are in the range from -40 to -30 mV, which indicates the aggregative stability of aqueous solutions of C₆₀-Gly in the studied concentration range.

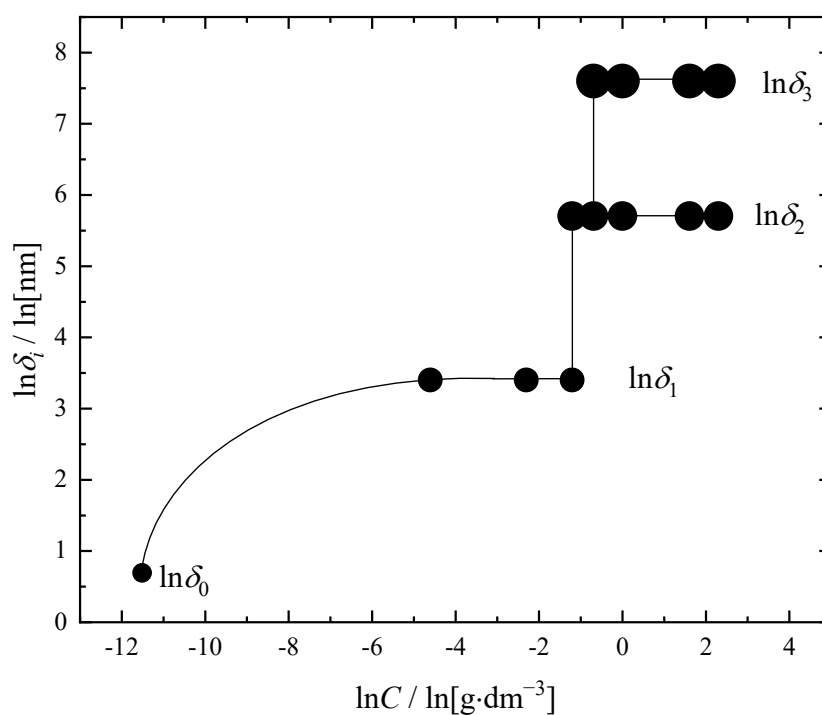


Fig. 3.28. Concentration dependence of the size distribution of C₆₀-Gly associates in aqueous solutions at 298.15 K. C is the volume concentration of C₆₀-Gly.

Table 3.10. Particle sizes and ζ -potentials in the C₆₀-Gly-H₂O binary system at 298.15 K.

$C /$ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$\delta_0 /$ nm	$\delta_1 /$ nm	$\delta_2 /$ nm	$\delta_3 /$ μm	$N_{0\rightarrow 1}\cdot 10^{-3}$	$N_{0\rightarrow 3}\cdot 10^{-4}$	$N_{0\rightarrow 3}\cdot 10^{-7}$	ζ / mV
0	2	—	—	—	—	—	—	—
0.01	—	30–50	—	—	2–8	—	—	-40 ± 5
0.1	—	30–50	—	—	2–8	—	—	-40 ± 5
0.3	—	30–50	100–400	—	2–8	6.5–420	—	-35 ± 5
0.5	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-35 ± 5
1.0	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-35 ± 5
5.0	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-30 ± 5
10.0	—	—	100–400	1–2	—	6.5–420	6.5–52	-30 ± 5

3.3. Correlation of temperature and concentration dependences of density, viscosity and speed of sound of C₆₀-Gly aqueous solutions

The temperature and concentration dependences of the physicochemical properties (density, viscosity and refractive index), M , were described using the following fourth order polynomial, $M(T, C)$:

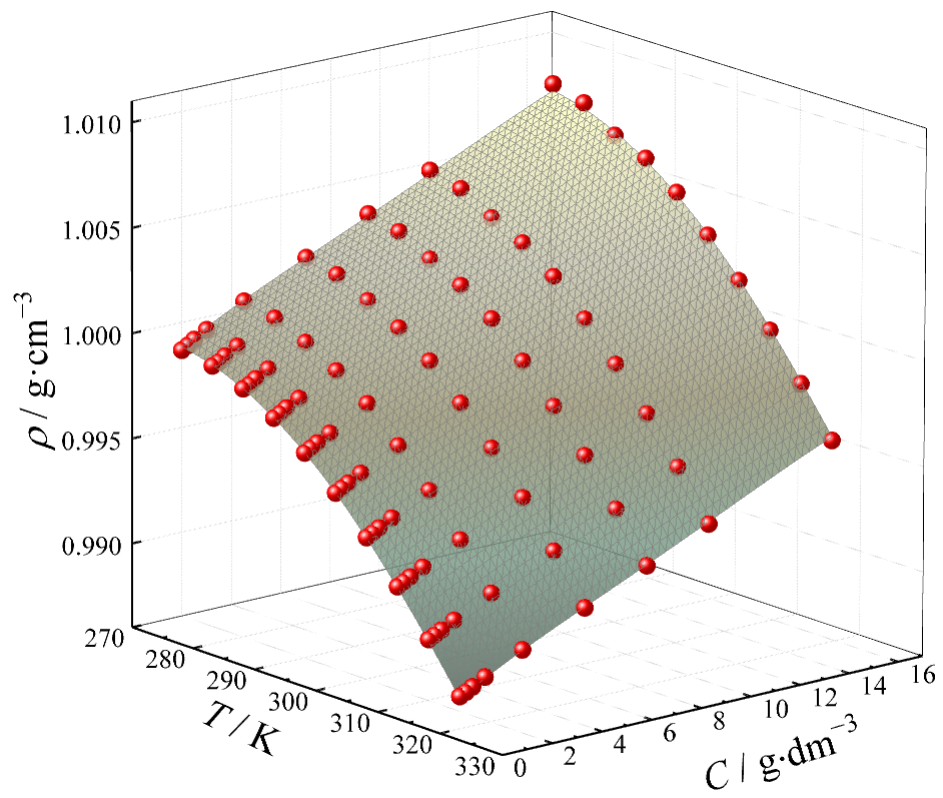
$$M = a + \sum_{i=1}^4 b_i \cdot T^i + \sum_{j=1}^4 c_j \cdot C^j \quad (23),$$

where C is a volumetric concentration of C₆₀-Gly, T is an absolute temperature, a, b_i, c_j ($i, j = 1-4$) are correlation parameters calculated by the least squares method using Origin 9 software (Table 3.11). High values of the coefficient of determination R^2 for all studied properties indicate good agreement between the experimental and calculated values (Fig. 3.29).

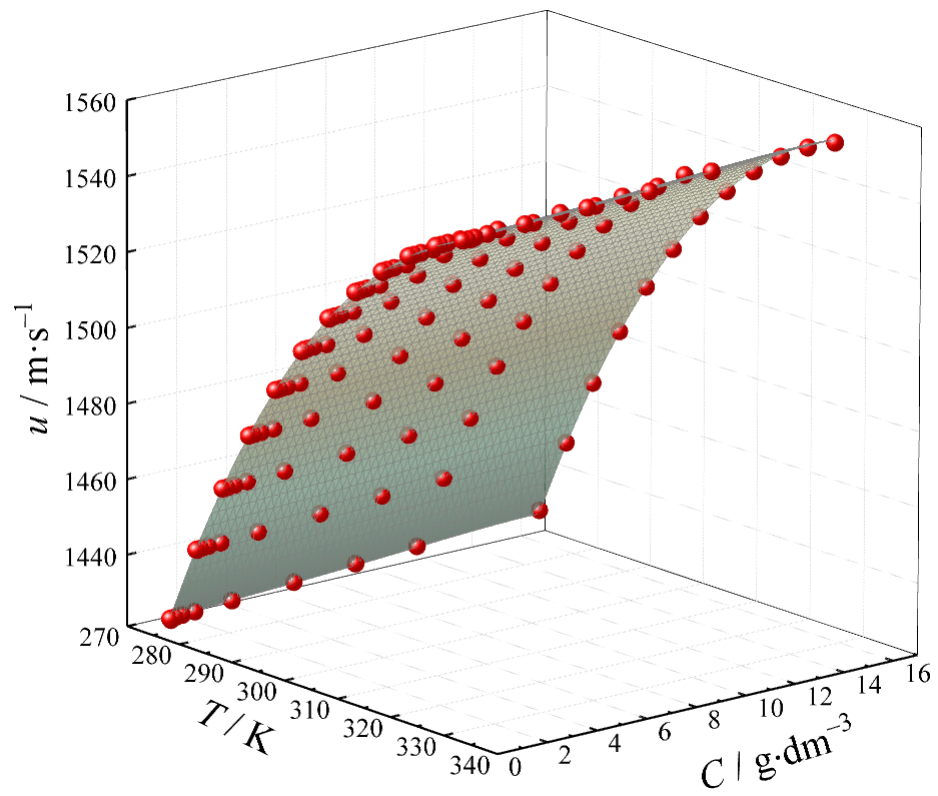
Table 3.11. Correlation parameters a , b_i , c_j ($i, j = 1-4$) of Eq. 23 for T - C dependences of density (ρ), sound velocity (u), dynamic viscosity (η) of C₆₀-Gly aqueous solutions. R^2 is the coefficient of determination.

Solution property	a	b_1	b_2	b_3	b_4	c_1	c_2	c_3	c_4	R^2
$\rho / \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	4.68	-0.053	$2.83\cdot 10^{-4}$	$-6.61\cdot 10^{-7}$	$5.68\cdot 10^{-10}$	$6.98\cdot 10^{-4}$	$-3.54\cdot 10^{-4}$	$3.10\cdot 10^{-6}$	$-9.21\cdot 10^{-8}$	0.99967
$u / \text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$-1.26\cdot 10^4$	144.83	-0.57	$1.03\cdot 10^{-3}$	$-7.22\cdot 10^{-7}$	0.46	-0.050	$6.77\cdot 10^{-3}$	$-2.61\cdot 10^{-4}$	0.99996
$\eta / \text{mPa}\cdot\text{s}$	1131.24	-14.22	0.067	$-1.42\cdot 10^{-4}$	$9.54\cdot 10^{-8}$	$8.67\cdot 10^{-3}$	$3.46\cdot 10^{-3}$	$-8.23\cdot 10^{-4}$	$4.90\cdot 10^{-5}$	0.99826

(a)



(b)



(c)

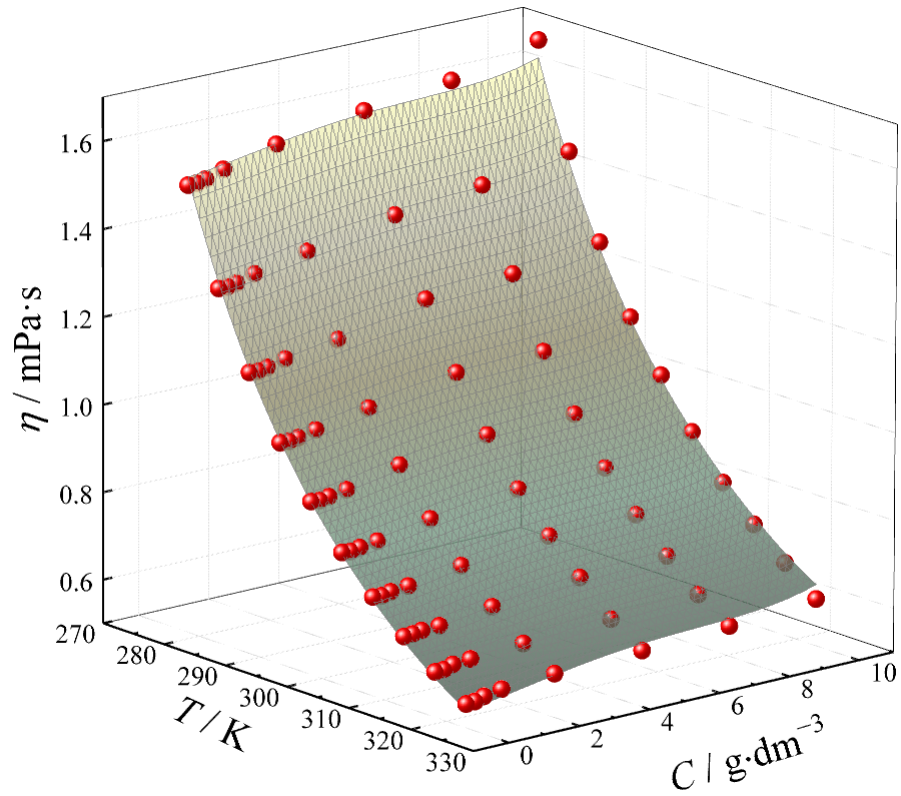


Fig. 3.29. Temperature and concentration dependences of density — ρ (a), speed of sound — u (b) and viscosity η (c) of aqueous solutions of C_{60} -Gly, T is an absolute temperature, C is a volumetric concentration of C_{60} -Gly. The red spheres represent the experimental data, the surfaces were calculated according to Eq. 23.

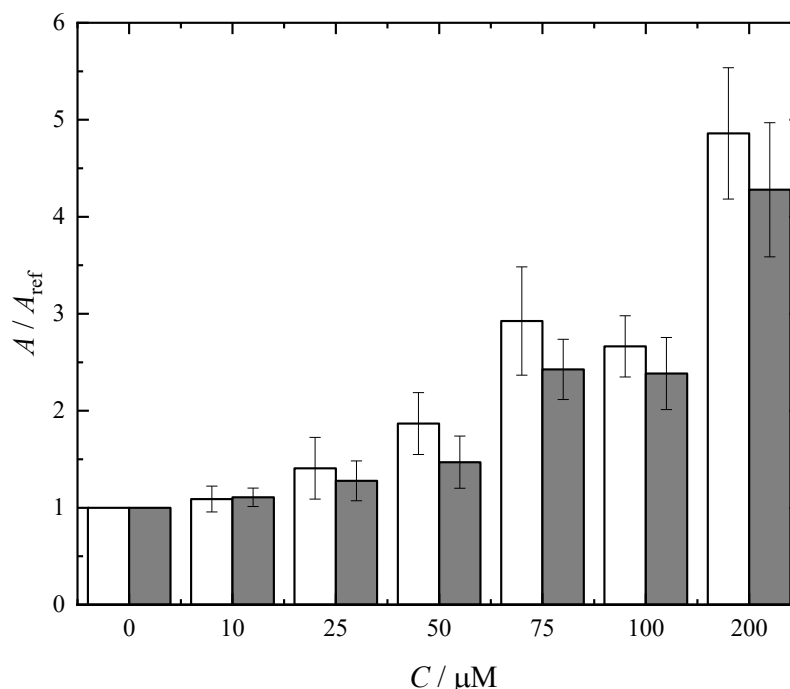
Chapter 4. Study of the biocompatibility of water-soluble adducts of fullerene C₆₀ with L-amino acids, fulleranol and carboxylated fullerene

4.1. Biocompatibility of fullerene C₆₀ adducts with L-amino acids

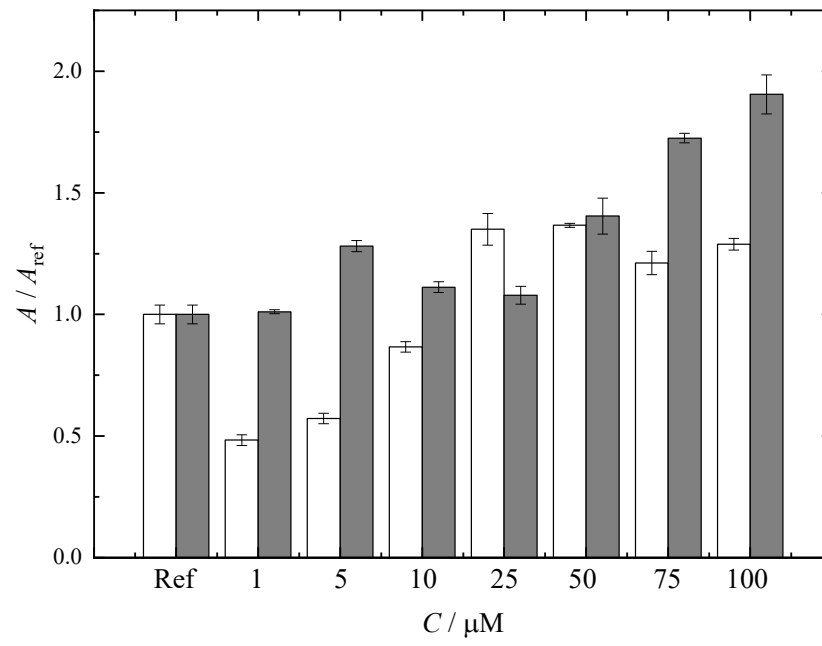
4.1.1. Spontaneous haemolysis

To assess the biocompatibility of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids, their effect on the spontaneous haemolysis of erythrocytes was studied. In the case of blood-compatible substances, the erythrocyte membrane remains intact, and the contents of the cell are not released. The effect of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids on erythrocyte haemolysis was determined by the release of haemoglobin from erythrocytes. The results are shown in Fig. 4.1. C₆₀-Gly, when incubated for 1 and 3 h, causes haemolysis at concentrations above 25 μM (Fig. 4.1*a*); C₆₀-Hyp induces haemolysis within 1 h at a concentration above 25 μM, within 3 h — above 5 μM (Fig. 4.1*b*); C₆₀-Met within 1 h - above 25 μM, within 3 h — even at 1 μM (Fig. 4.1*c*); C₆₀-Cys within 1 h — above 200 μM, within 3 h — above 50 μM (Fig. 4.1*d*). At the same time, the degree of haemolysis for all C₆₀ fullerene derivatives is dose-dependent.

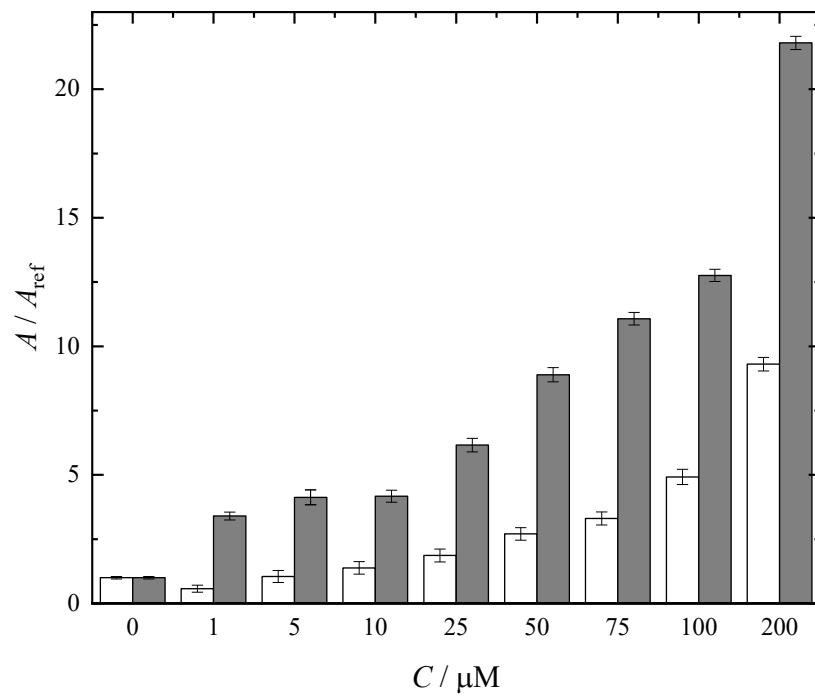
(a)



(b)



(c)



(d)

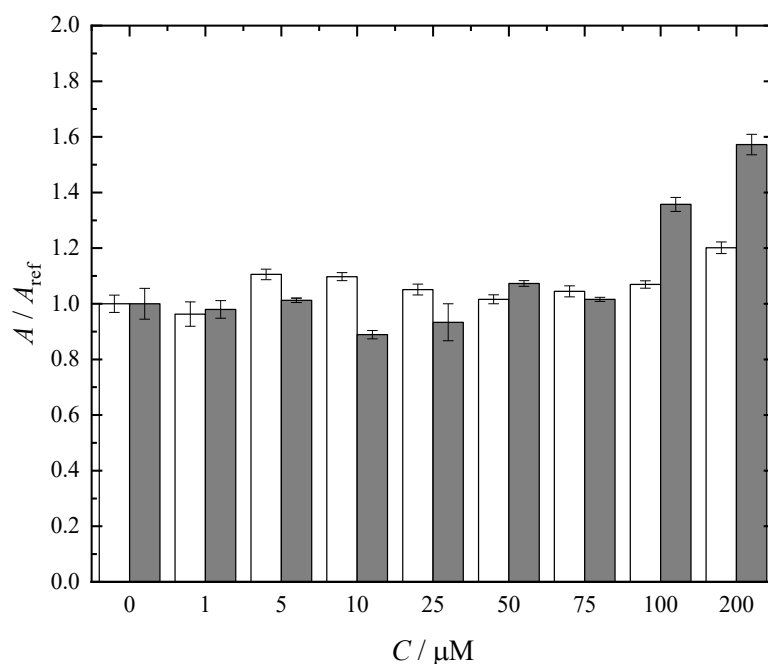


Fig. 4.3. Effect of C_{60} fullerene adducts with L-amino acids on haemolysis after 1 h (white) and 3 h (grey): C_{60} -Gly — (a), C_{60} -Hyp — (b), C_{60} -Met — (c). C_{60} -Cys — (d).

4.1.2. Platelet aggregation

As can be seen from the data. presented in Table 4.1, in tests of ADP-induced platelet aggregation, the following effects are observed when fullerene C_{60} adducts with L-amino acids are added: (i) C_{60} -Gly in the concentration range of 50–100 μM significantly reduces platelet aggregation with a dose-dependent effect compared to the control ; (ii) C_{60} -Hyp and C_{60} -Cys do not affect platelet aggregation in the concentration range of 5–100 μM ; (iii) C_{60} -Met in the concentration range of 10–100 μM significantly reduces platelet aggregation with a dose-dependent effect compared to the control.

Table 4.1. Influence of fullerene C_{60} adducts with L-amino acids on platelet aggregation in platelet-rich plasma (aggregation inductor — 10 μM ADP).

Adduct	Amplitude / %				
	C_{60} Fullerene adduct concentration $C_{60} / \mu\text{M}$				
	Control	5	10	50	100
C_{60} -Gly	82.4 ± 0.2	75.9 ± 4.2	74.1 ± 5.1	70.0 ± 3.3	61.5 ± 1.1
C_{60} -Hyp	85.1 ± 1.2	84.1 ± 2.1	84.5 ± 2.5	81.9 ± 1.8	80.8 ± 0.9
C_{60} -Met	81.8 ± 3.3	81.1 ± 2.7	71.0 ± 3.0	65.4 ± 1.9	51.3 ± 2.8

C_{60} -Cys	84.6 ± 2.8	83.1 ± 3.2	85.2 ± 4.1	81.6 ± 2.8	81.2 ± 2.2
---------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

4.1.3. Interaction with DNA

Electron spectroscopy was used to study the interaction of C_{60} fullerene adducts with DNA. Fig. 4.2 shows the absorption spectra of DNA solutions ($C = 6.49 \cdot 10^{-8}$ M) in the presence of C_{60} adducts with L-amino acids ($C = 6.43 \cdot 10^{-8}$ M).

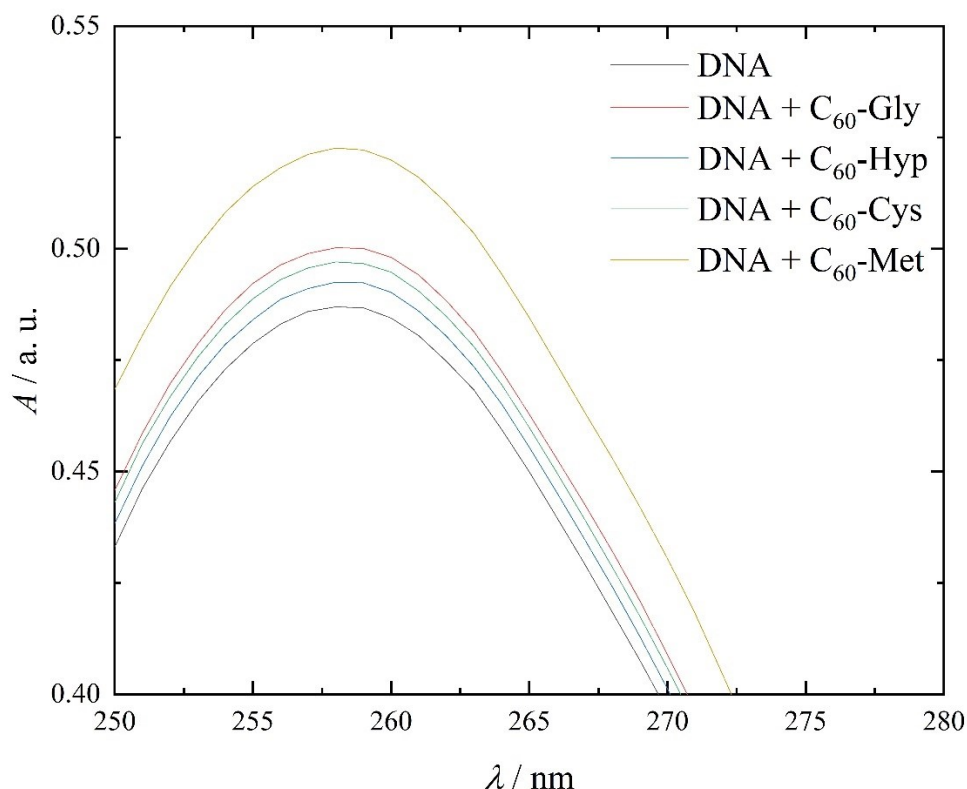


Fig. 4.2. Absorption spectra of DNA solutions ($C = 6.49 \cdot 10^{-8}$ M) and DNA solutions ($C = 6.49 \cdot 10^{-8}$ M) in the presence of C_{60} adducts with L-amino acids ($C = 6.43 \cdot 10^{-8}$ M).

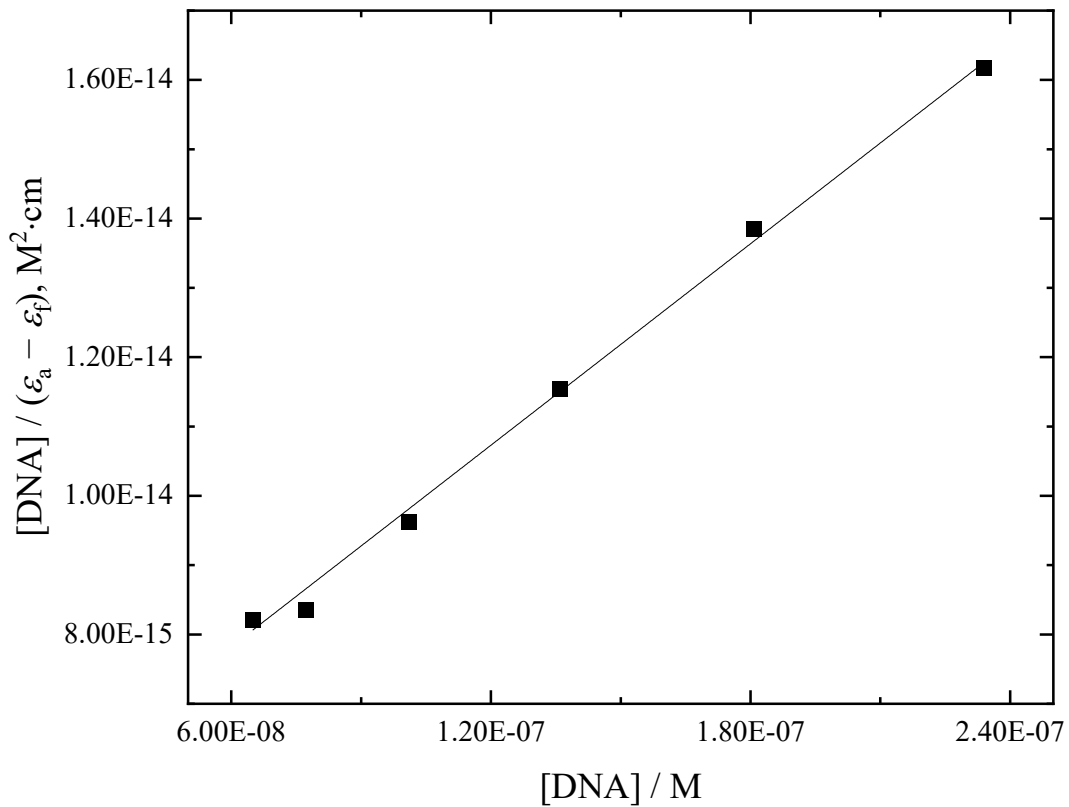
It can be seen that a hyperchromic effect is observed when C_{60} adducts with L-amino acids are added to the DNA solution. In this case, there was no noticeable shift in the DNA absorption maximum. Hyperchromism is explained by the presence of the following synergistic non-covalent interactions: external contact of C_{60} adducts with L-amino acids and the sugar-phosphate backbone of the DNA molecule due to electrostatic interaction and the formation of hydrogen bonds. Since there are no changes in the position of the absorption bands (bathochromic or hypsochromic shifts), it can be concluded that the binding of C_{60} adducts to the grooves of the DNA molecule is observed. The binding constant (K_b) was calculated using the Wolfe–Shimmer equation:

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b (\varepsilon_b - \varepsilon_f)}, \quad (24)$$

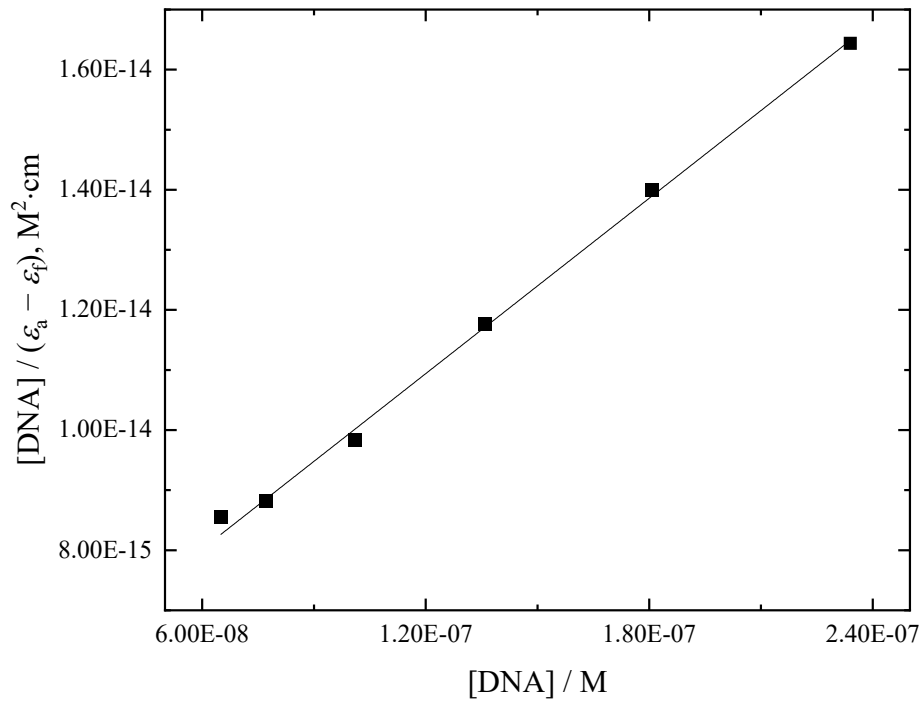
where $[\text{DNA}]$ is DNA concentration, ε_a , ε_f , ε_b are the extinction coefficients of the complex of the ligand (C_{60} adduct with L-amino acids) with DNA, the ligand and the ligand bound to DNA in a stoichiometric amount, respectively.

Fig. 4.3 shows the Wolfe–Shimmer dependences (in coordinates $[\text{DNA}] / (\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ vs $[\text{DNA}]$ concentration) for the binding of C_{60} -Gly, C_{60} -Hyp, C_{60} -Met, and C_{60} -Cys adducts to DNA. The values of ε_f and K_b obtained from the graphs are presented in Table 4.2.

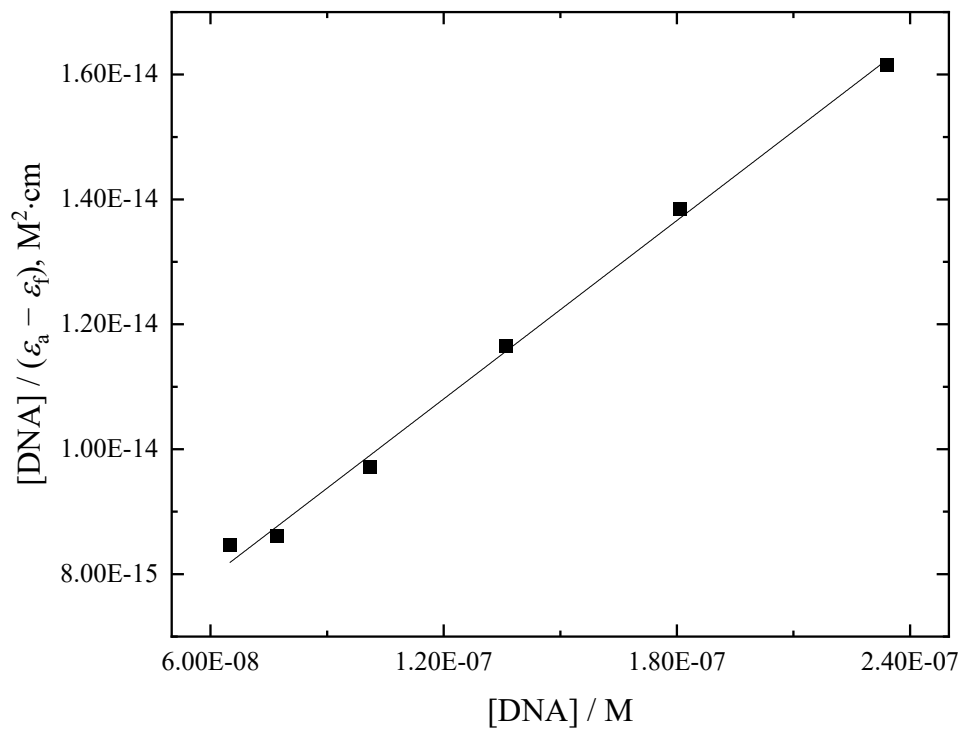
(a)



(b)



(c)



(d)

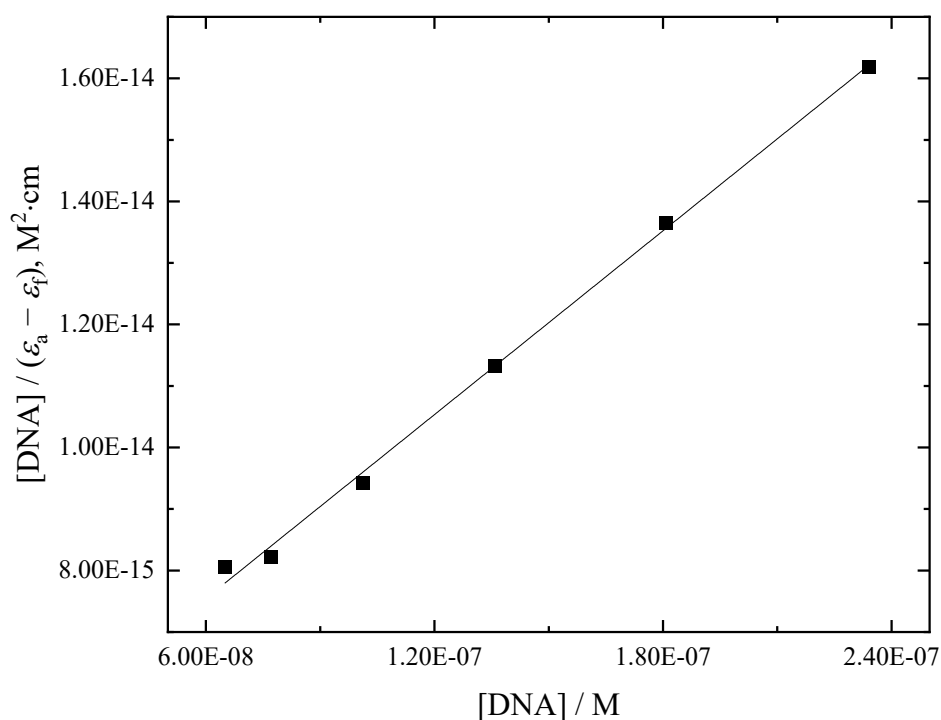


Fig. 4.3. Wolfe–Shimmer dependences for DNA binding to C₆₀-Gly (*a*), C₆₀-Hyp (*b*), C₆₀-Met (*c*), and C₆₀-Cys (*d*).

Table 4.2. Values of extinction coefficients (ϵ_f) and binding constants (K_b) of fullerene C₆₀ adducts with DNA.

Adduct	$\epsilon_f \cdot 10^4 / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$K_b \cdot 10^6 / \text{M}^{-1}$
C ₆₀ -Gly	2.74 ± 0.06	9.85 ± 0.65
C ₆₀ -Hyp	2.59 ± 0.08	9.54 ± 0.49
C ₆₀ -Cys	3.31 ± 0.51	9.35 ± 0.52
C ₆₀ -Met	3.36 ± 0.06	10.92 ± 0.53

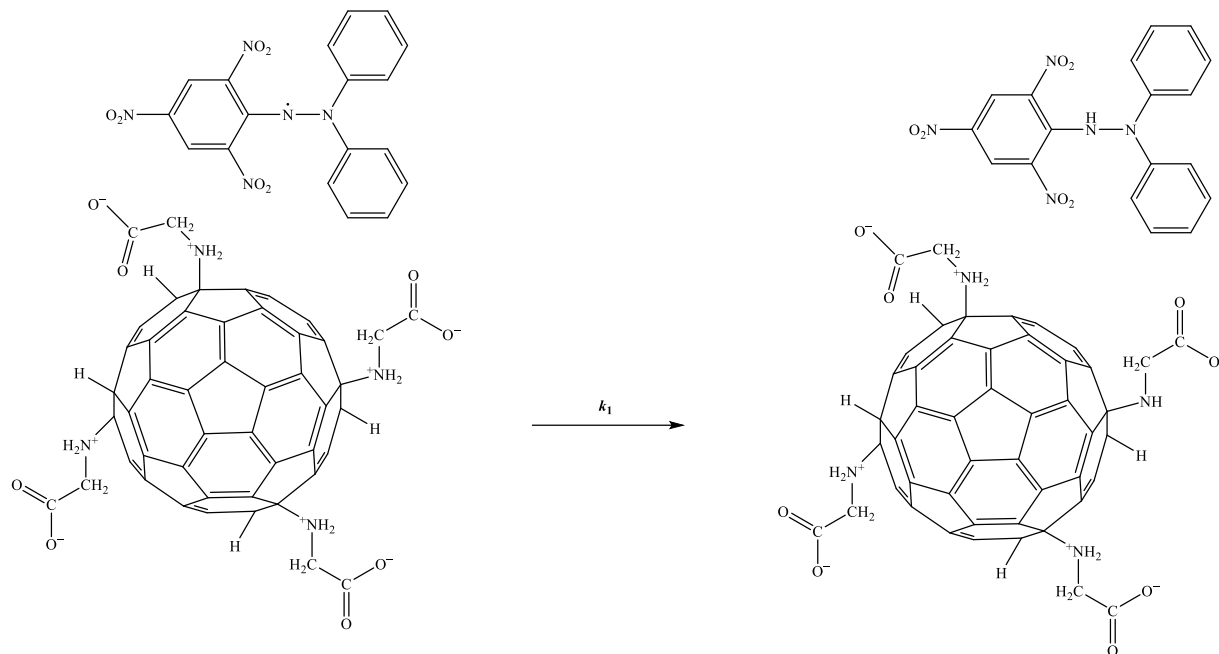
4.1.4. Antiradical activity

The proposed mechanism of the reaction of C₆₀ fullerene adducts with the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical includes two stages: fast — transfer of a hydrogen ion to the radical and slow — nucleophilic attack of the fullerene core π -bond radical (Fig. 4.4). To quantify the rate of the reaction between C₆₀ fullerene adducts and DPPH, a two-stage kinetic model of the pseudo-first order reaction was used [106]:

$$\ln \frac{A_\infty - A_t}{A_\infty - A_0} = -kt, \quad (25)$$

where A_∞ , A_t and A_0 are the optical densities of the solution after ‘infinity’ (seven days after the start of the experiment), at time t and at the initial time, respectively. For example, Fig. 4.4 shows the kinetic dependence on the reduction reaction of DPPH with the fullerene adduct C₆₀-Gly.

(a)



(b)

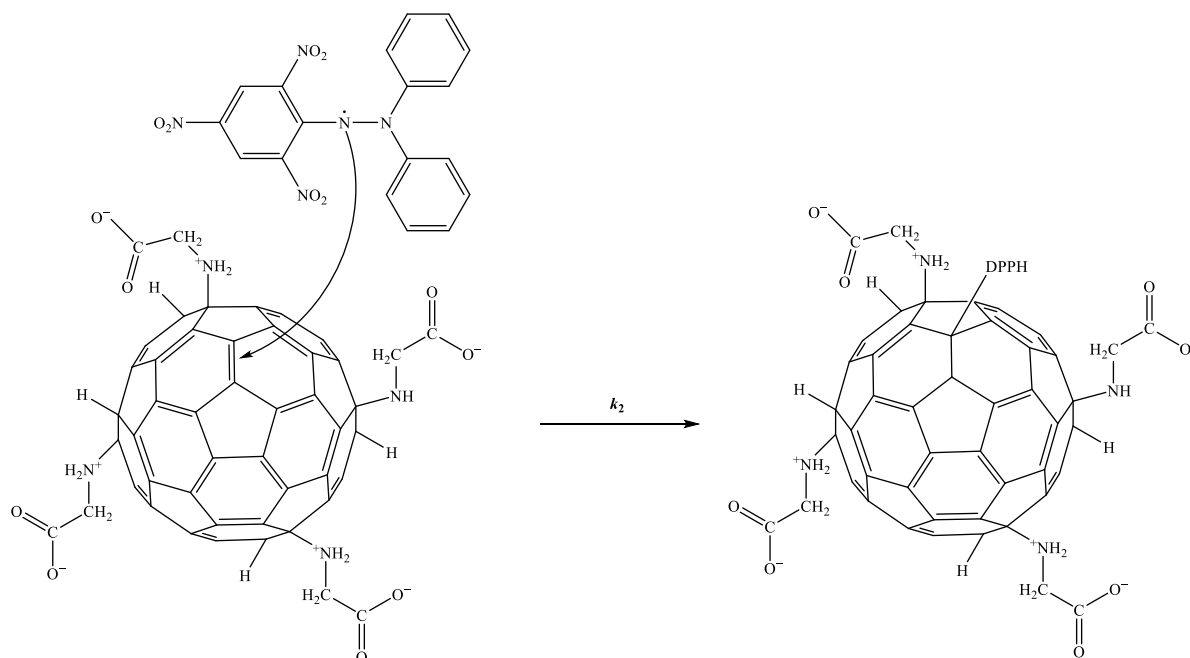
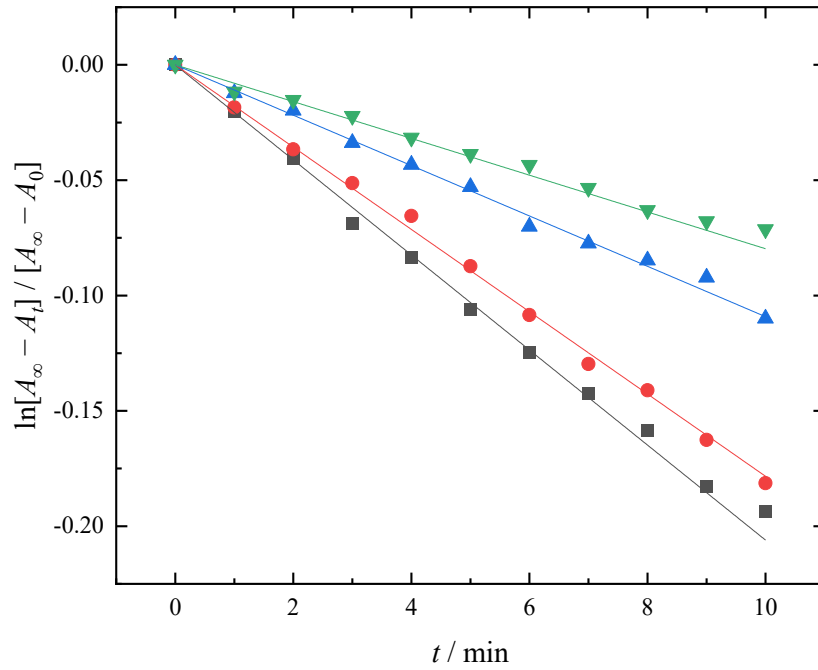


Fig. 4.4. Proposed mechanism of interaction between C₆₀-Gly adduct and DPPH. Hydrogen transfer from the carboxyl group of the amino acid residue to the DPPH radical (fast stage) — (a); nucleophilic attack of the fullerene C=C bond radical (slow stage) — (b). k_1 and k_2 are the apparent rate constants of the reactions of the fast and slow stages, respectively.

(a)



(b)

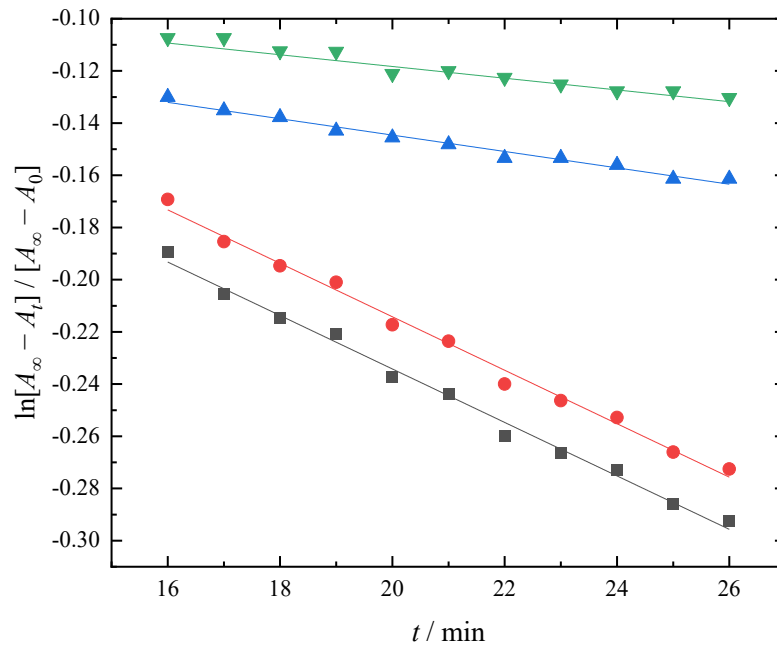


Fig. 4.5. Kinetic dependence of the DPPH reduction reaction with C_{60} -Gly adduct in the temperature range 303.15–318.15K: for the first stage — (a); for the second stage — (b). 303.15 K — grey line, 308.15 K — red line, 313.15 K — blue line, 318.15 K — green line.

From the slopes of the two sections of the kinetic curves, the values of the apparent rate constants at different temperatures were obtained (Table 4.3).

Table 4.2. Apparent rate constants of DPPH reduction by C₆₀ fullerene adducts at 25 °C.

Adduct	$k_1 \cdot 10^{-3} / \text{min}^{-1}$	$k_2 \cdot 10^{-3} / \text{min}^{-1}$
C ₆₀ -Gly	3.52 ± 0.28	1.12 ± 0.03
C ₆₀ -Hyp	8.35 ± 0.15	1.31 ± 0.04
C ₆₀ -Met	3.01 ± 0.13	1.12 ± 0.04
C ₆₀ -Cys	9.31 ± 0.11	1.05 ± 0.13

The values of antioxidant efficiency (*AE*) were also calculated using the formula:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T_{EC_{50}}}, \quad (26)$$

where EC_{50} is antioxidant concentration required to reduce 50 % of DPPH radicals, $T_{EC_{50}}$ is the time after which the reduction of 50 % of DPPH radicals occurs. The antioxidant efficiency of C₆₀ fullerene adducts was compared with the well-known industrial antioxidant, ionol. The *AE* value for ionol is 5.82, for C₆₀-Gly is 0.86, C₆₀-Hyp is 0.21, C₆₀-Met is 1.86, and C₆₀-Cys is 2.45.

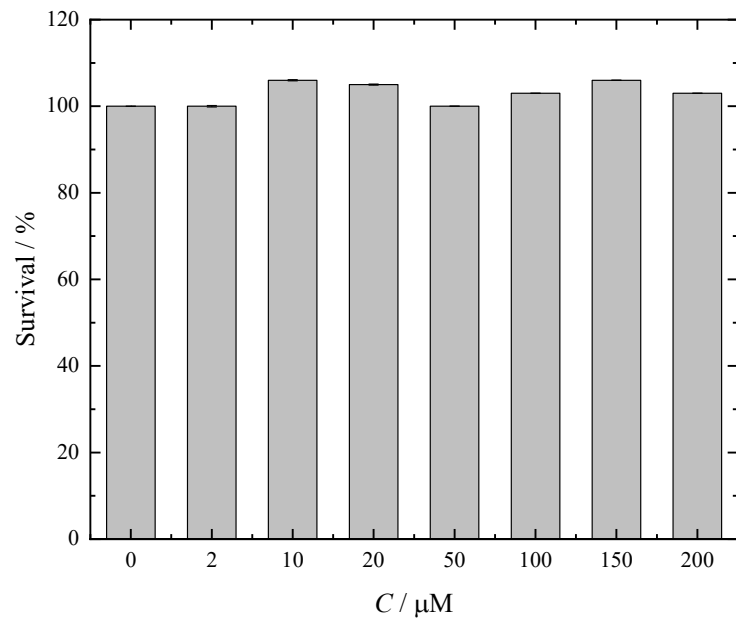
4.1.5. Cytotoxicity

Cytotoxicity (%) of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids was calculated using the formula:

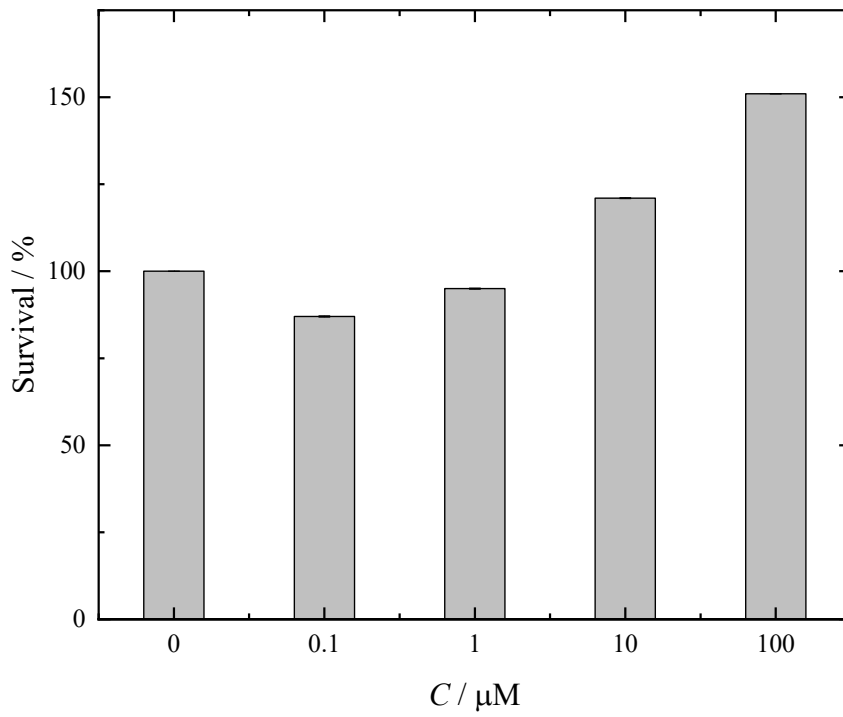
$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\bar{A}(C_i)}{\bar{A}(0)} \cdot 100\%, \quad (27)$$

where C_i is concentration of fullerene adducts C₆₀, $\bar{A}(C_i)$ is average optical density in experimental samples (with the addition of the i -th derivative of the concentration C_i), $\bar{A}(0)$ is average optical density in control samples (incubation of cells without the addition of C₆₀ fullerene adducts). Fig. 4.6 presents data on the cytotoxicity of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids. As can be seen from the obtained data, C₆₀-Gly, C₆₀-Hyp and C₆₀-Met (Fig. 4.6a, b, c) had virtually no cytotoxic effect on the human embryonic kidney cell line HEK293 in the studied concentration range, and the C₆₀-Cys (Fig. 4.6d) at concentrations above 50 μM had a cytotoxic effect.

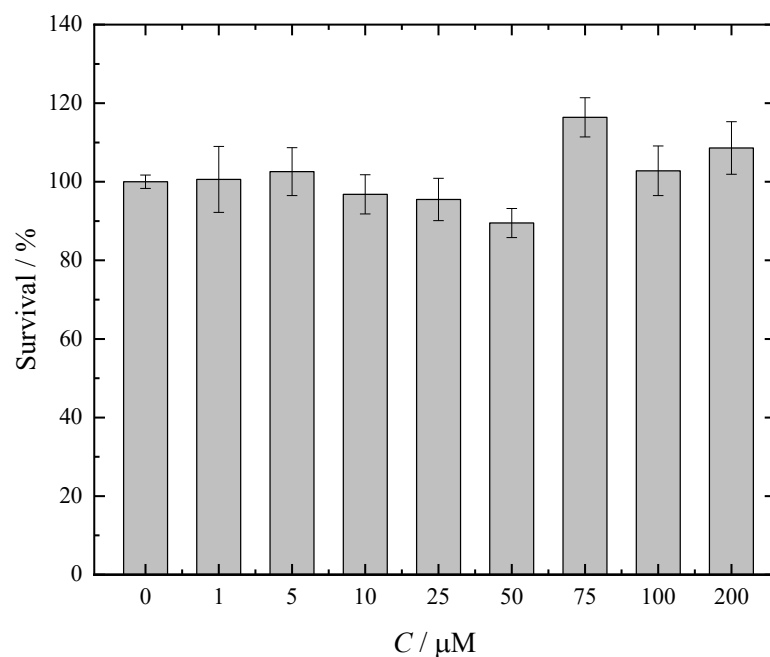
(a)



(b)



(c)



(d)

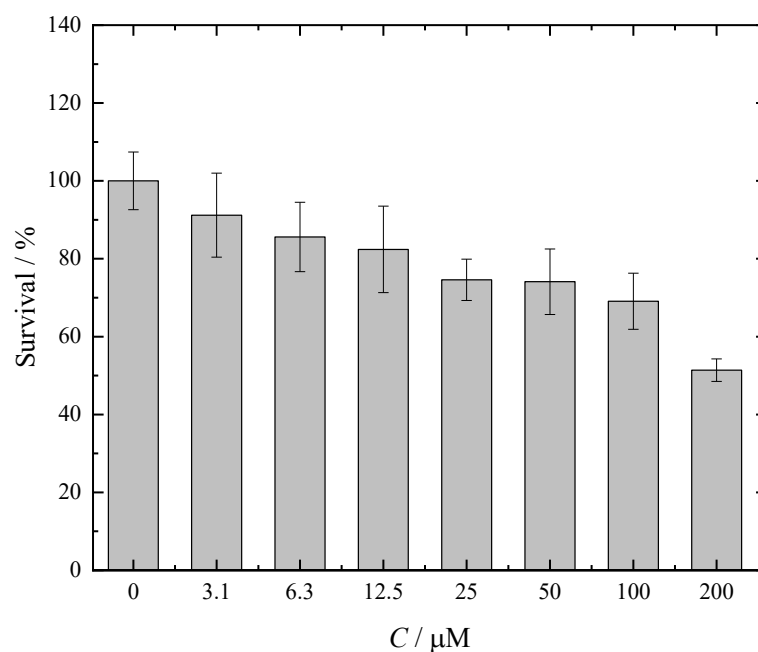


Fig. 4.6. Cytotoxicity of C_{60} fullerene adducts with L-amino acids against HEK 293 cells: C_{60} -Gly — (a); C_{60} -Hyp — (b); C_{60} -Met — (c); C_{60} -Cys — (d).

4.1.6. Interaction of C_{60} -Met with collagen

Fig. 4.7 shows the emission spectra of collagen in Dulbecco's buffer in the absence and presence of C_{60} -Met. Fluorescence quenching can have different mechanisms: there are dynamic

and static quenching, which have different temperature dependences. An increase in temperature causes an acceleration of diffusion and an increase in the number of collisions of the quencher with the fluorophore, which usually leads to the dissociation of low-stability complexes. The quenching constant increases with increasing temperature for dynamic quenching and decreases for static.

To analyse the data, we used the Stern–Volmer equation:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}Q, \quad (28)$$

where F_0 and F are fluorescence intensity in the absence and presence of a quencher, K_{SV} is Stern–Volmer quenching constant, Q is quencher concentration. To determine the quenching constants, dependences in the coordinates F_0 / F on Q were built (Fig. 4.8) at the studied temperatures.

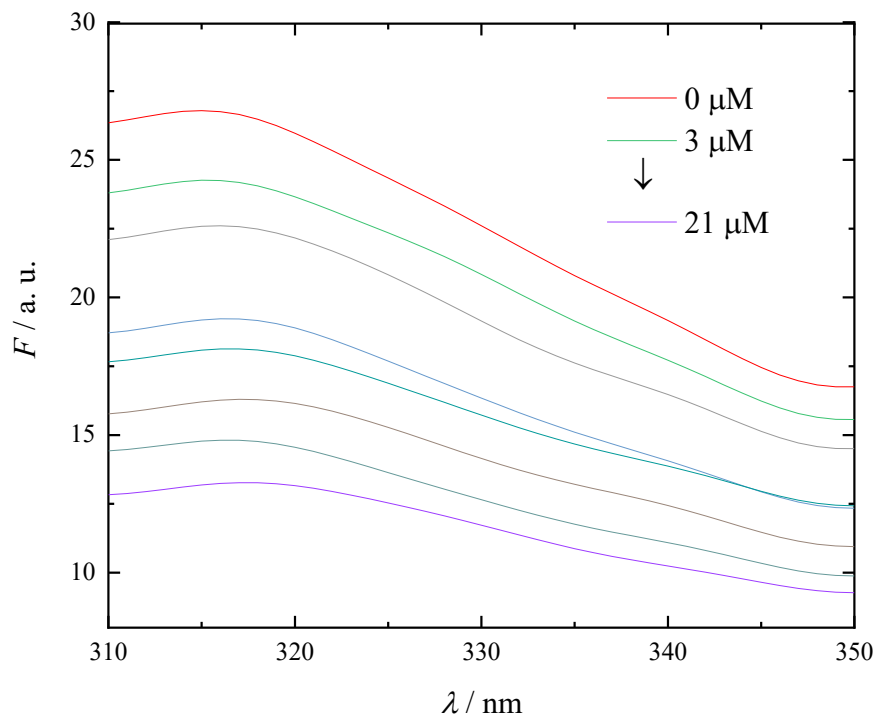


Fig. 4.7. Fluorescence spectra of 3 μM collagen solution in the absence and presence of C_{60} -Met adduct ($C = 0\text{--}21 \mu\text{M}$).

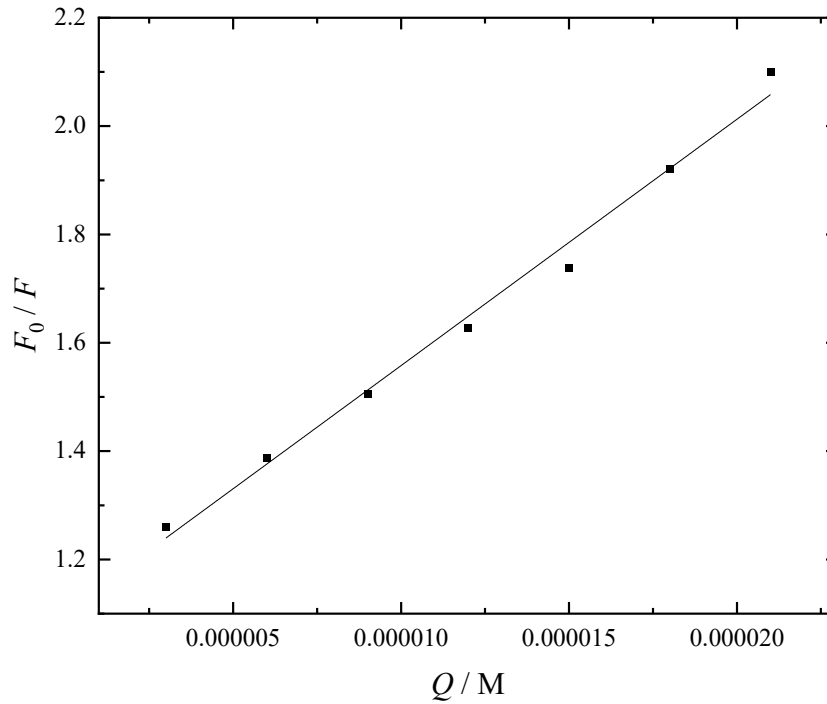


Fig. 4.8. Stern–Volmer dependence of the process of collagen fluorescence quenching by C₆₀-Met derivatives at 298.15 K.

Next, to determine the binding constant (K_b) and the number of binding sites (n) of C₆₀-Met with collagen, the Scatchard equation was used:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg Q, \quad (29)$$

From the graphs in the coordinates $\lg[(F_0 - F) / F]$ from $\lg Q$, the values of K_b and n (Table 4.4).

Table 4.4. The values of Stern–Volmer quenching constants (K_{SV}), binding constants (K_b), and the number of binding sites (n) of C₆₀-Met with collagen in the temperature range 298.15–318.15 K.

T / K	$K_{SV} \cdot 10^4 / M^{-1}$	$K_b \cdot 10^5 / M^{-1}$	n
298.15	6.29 ± 0.29	1.1 ± 0.09	1.3 ± 0.07
303.15	6.34 ± 0.33	1.1 ± 0.11	1.3 ± 0.11
308.15	7.14 ± 0.15	1.3 ± 0.06	1.5 ± 0.10
313.15	7.51 ± 0.33	1.3 ± 0.11	1.5 ± 0.11
318.15	7.55 ± 0.15	1.3 ± 0.06	1.5 ± 0.06

Assuming that in the temperature range under study, the changes in enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) do not depend on temperature, these values can be determined from the van't Hoff equation:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}. \quad (30)$$

Changes in the Gibbs energy (ΔG) of the binding reaction at different temperatures were calculated using the formula:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (31)$$

The calculation results are shown in Table 4.5.

Table 4.5. Thermodynamic parameters of C₆₀-Met adduct binding to collagen.

T / K	$-\Delta G / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-\Delta S / \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
298.15	27 ± 7	89 ± 8	392 ± 24
303.15	29 ± 7		
308.15	30 ± 7		
313.15	32 ± 7		
318.15	34 ± 7		

To establish the interaction mechanism, thermodynamic parameters are used, namely: changes in enthalpy, entropy and Gibbs energy. The obtained negative values of ΔG in the temperature range $T = 298.15$ – 318.15 K indicate that the interaction of the C₆₀-Met adduct with collagen is thermodynamically favourable. Negative values of ΔH and ΔS are typical for the formation of hydrogen bonds, so it can be assumed that the formation of a complex with C₆₀-Met with collagen occurs due to the amino acid residues of C₆₀-Met.

4.1.7. Protective effect of C₆₀-Met

Fig. 4.9 shows the emission spectra of aqueous solutions of collagen before and after exposure to UV light. It can be seen that as the irradiation time increases, the fluorescence intensity decreases. This is due to two effects: photo-crosslinking and photodegradation of collagen. Photo-crosslinking causes a conformational transition of the collagen molecule (helix-coil), which leads to a decrease in emission due to shielding of tryptophan residues. Photodegradation leads to a decrease in collagen concentration, which is accompanied by a change in the fluorescence spectrum. Both of these effects are associated in the literature with the formation of reactive oxygen species during UV irradiation; therefore, substances exhibiting antiradical activity can also exhibit photoprotective properties [210].

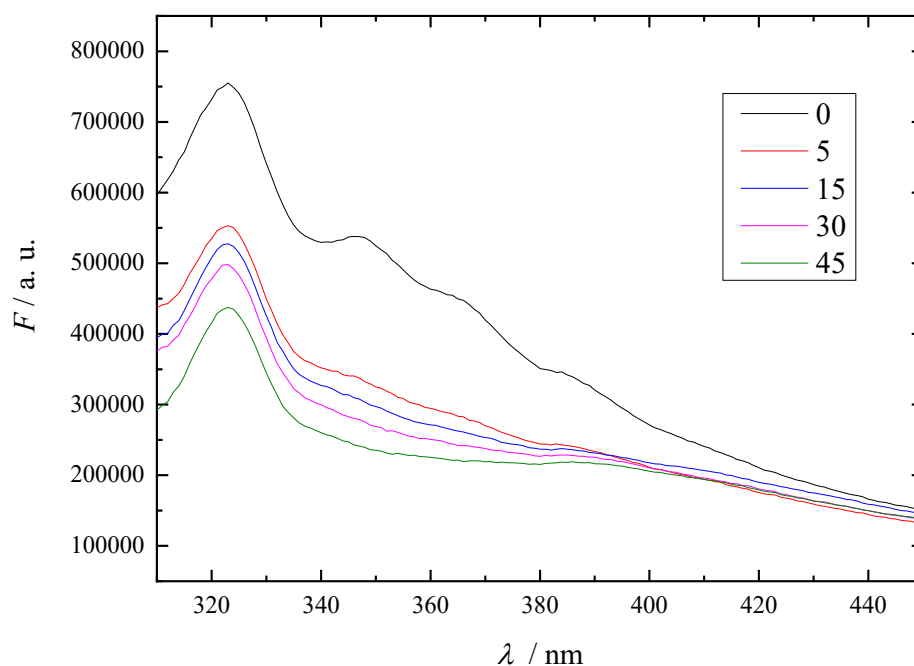


Fig. 4.9. Emission spectra of aqueous solutions of collagen upon excitation at a wavelength of 290 nm before and after irradiation with UV light in the time interval of 0–45 min.

Table 4.6 shows the values of the fluorescence intensity of aqueous solutions of collagen in the absence and presence of C₆₀-Met ($C = 0.0015\text{--}0.06$ mg/ml) before and after UV irradiation.

Table 4.6. Fluorescence intensity $F(t)$ at a wavelength of 350 nm of aqueous solutions of collagen in the absence and presence of C₆₀-Met depending on the exposure time.

$C / \text{mg/ml}$	$F(t)$				
	0 min	5 min	15 min	30 min	45 min
0	524573	324977	297175	268830	235446
0.0015	267671	239551	222804	218389	213152
0.003	227377	213318	206543	198558	185376
0.06	191330	184300	180291	168129	163425

To assess the protective effect of the C₆₀-Met adduct in UV-induced damage to collagen, we calculated changes in fluorescence intensity before and after irradiation ($\Delta F = F_0 - F_t$), characterising changes in fluorescence due to photo-crosslinking and photodegradation of collagen. The dependence of ΔF on t is shown in Fig. 4.10.

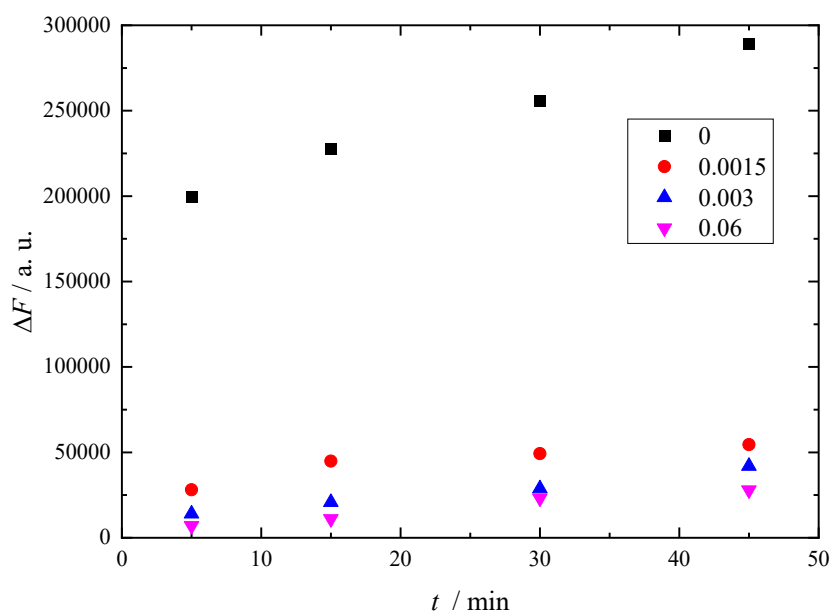


Fig. 4.10. Dependence of the change in the fluorescence of aqueous solutions of collagen in the absence and in the presence of C_{60} -Met on the time of irradiation ($\lambda = 350$ nm).

From Fig. 4.10 shows that exposure of collagen to UV radiation in the presence of C_{60} -Met derivative leads to a dose-dependent decrease in photodegradation and photo-crosslinking of collagen. Thus, we can conclude that the C_{60} -Met adduct has a high potential as a basis for the development of photoprotective nanomaterials.

4.2. Biocompatibility of carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$

4.2.1. Spontaneous haemolysis

To study the biocompatibility of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ nanoparticles, an experiment was conducted on their effect on haemolysis. The toxicity of carboxylated fullerene was determined by measuring the concentration of haemoglobin released from erythrocytes. The results of calculating the degree of haemolysis of erythrocytes incubated in the presence of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ are shown in Fig. 4.11.

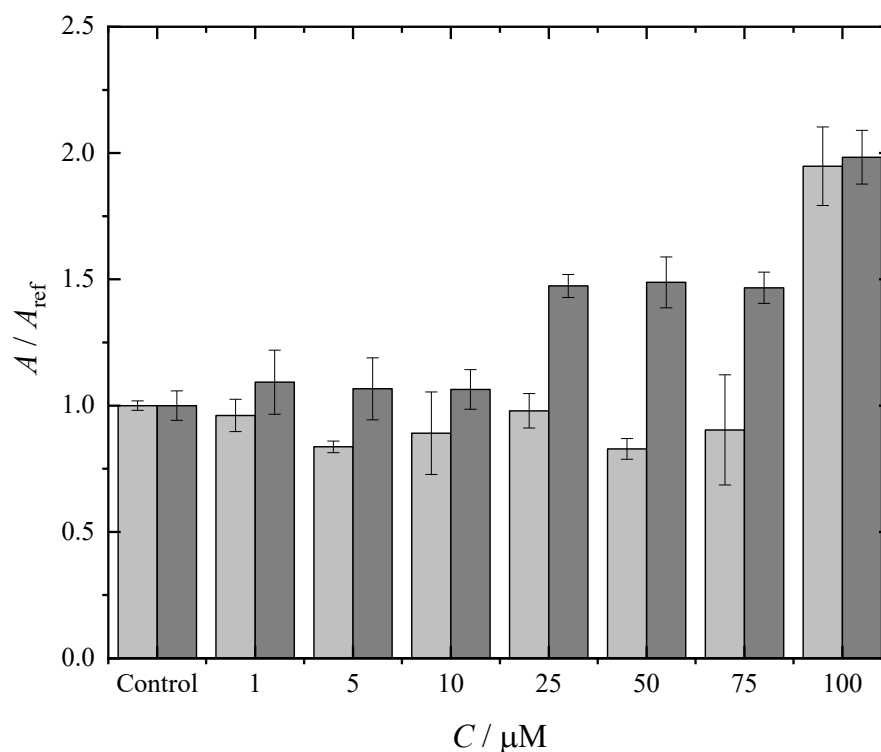


Fig. 4.11. Effect of $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ on spontaneous haemolysis after 1 h (light grey) and 3 h (dark grey) incubation.

Analysis of the data shows that at 1 and 3 h incubation of erythrocytes with $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ in the concentration range $C = 1\text{--}100 \mu\text{M}$, weak haemolysis is observed. It can be concluded that $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ is a haemocompatible material, haemolytic activity depends on the incubation time, and haemolysis upon incubation with $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ for 3 h has a dose-dependent character.

4.2.2. Platelet aggregation

The results on the effect of carboxylated fullerene $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ on human platelet aggregation in the presence of a platelet aggregation inducer (ADP and collagen) are presented in Table 4.7. In the experiment on ADP- and collagen-induced platelet aggregation, an increase in aggregation was observed in the presence of carboxylated fullerene $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ in the concentration range $C = 10\text{--}100 \mu\text{M}$ compared with the control. Thus, $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ has pro-aggregant activity in tests of ADP- and collagen-induced platelet aggregation.

Table 4.7. Effect of $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ on platelet aggregation in the presence of ADP and collagen.

Inductor	Amplitude / %			
	Concentration of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ / μM			
	Control	1.0	10.0	100.0
ADP	57.8 ± 4.5	64.0 ± 3.5	74.6 ± 1.7	75.4 ± 1.3
Collagen	64.2 ± 3.2	64.2 ± 3.3	75.4 ± 0.9	76.4 ± 1.5

4.2.3. Interaction with HSA

To study the binding of HSA to $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, emission spectra of HSA solutions ($C = 3 \mu\text{M}$) in Dulbecco's buffer solution were obtained depending on the concentration of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ (Fig. 4.12). The observed spectra correspond to the fluorescence of tryptophan residues in the HSA molecule; this is indicated by the presence of an absorption maximum in the wavelength range $\lambda = 320\text{--}340 \text{ nm}$. It can be seen that the $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ molecule acts as a fluorescence quencher.

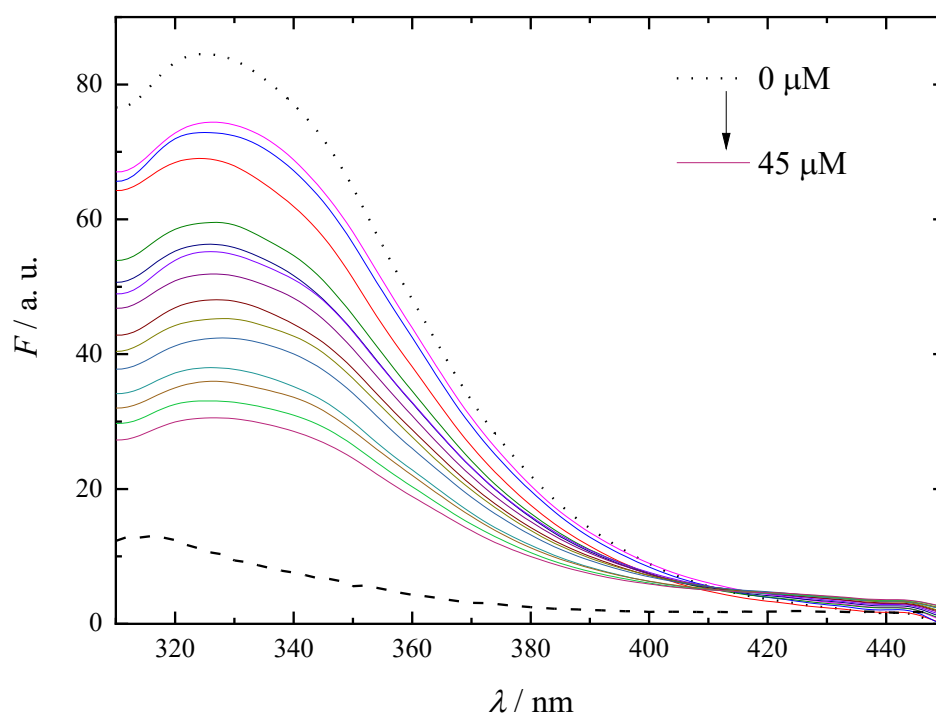


Fig. 4.12. Fluorescence spectra of HSA in Dulbecco's buffer ($C = 3 \mu\text{M}$) at various concentrations of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ ($T = 298.15 \text{ K}$). The dotted line corresponds to the fluorescence spectrum of HSA, the dashed line corresponds to the fluorescence spectrum of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$.

To determine the nature of intermolecular interaction during fluorescence quenching, the Stern–Volmer equation was used (Eq. 28).

The dependences in the coordinates F_0 / F on Q for HSA solutions containing $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ at different temperatures made it possible to calculate the quenching constants (K_{SV}) (Fig. 4.13, Table 4.8).

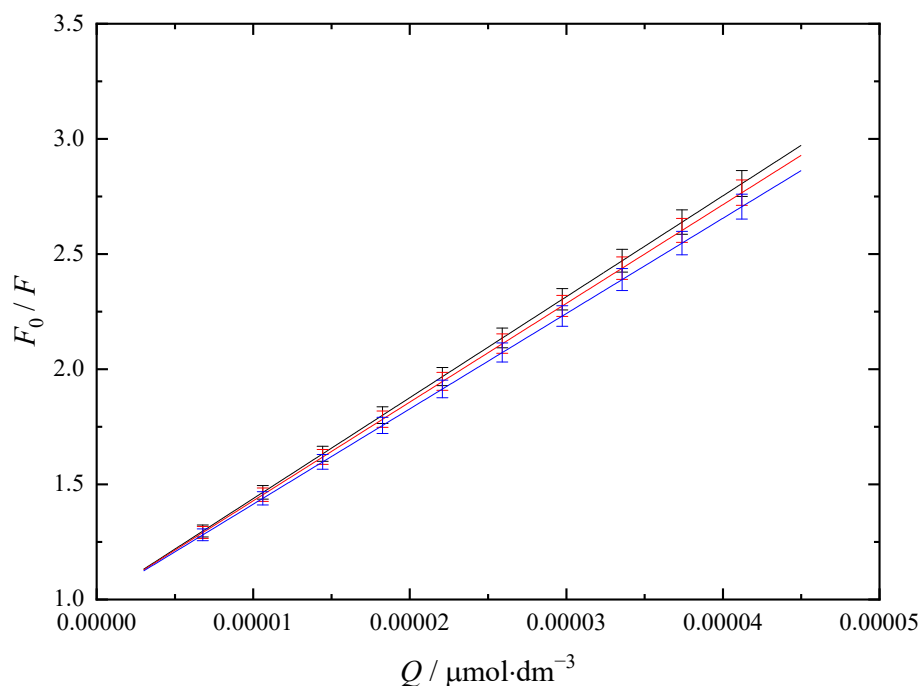


Fig. 4.13. Stern–Volmer dependences of HSA fluorescence quenching by carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ at $T = 298.15$ K (black line), 303.15 K (red line), 308.15 K (blue line).

Table 4.8. Quenching constants (K_{SV}), binding constants (K_b), and number of binding sites (n) for the $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ –HSA system at different temperatures.

T / K	$K_{SV} \cdot 10^4 / M^{-1}$	$K_b \cdot 10^5 / M^{-1}$	n
298.15	4.38 ± 0.17	1.55 ± 0.09	1.12 ± 0.06
303.15	4.29 ± 0.17	3.42 ± 0.16	1.21 ± 0.05
308.15	4.14 ± 0.18	12.01 ± 0.34	1.33 ± 0.04

As can be seen from Table 4.8, the values of the quenching constant decrease with increasing temperature in the range $T = 298.15$ – 308.15 K, therefore, a static quenching mechanism takes place. Binding constants (K_b) and number of binding sites (n) were determined using the Scatchard equation (Eq. 29). The obtained values of K_b and n are presented in Table 4.8. The binding constants are in the effective range of 10^4 – 10^5 M^{-1} , which indicates that HSA

is capable of performing a transport function in the bloodstream. At lower K_b values, the $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ -HSA complexes will not be strong enough, and at high values, irreversible binding of carboxylated fullerene with HSA will occur.

Assuming that in the studied temperature range, the values of ΔH and ΔS do not change, they were determined using the van't Hoff equation (Eq. 30). The change in the Gibbs energy (ΔG) of the binding reaction of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ with HSA in the temperature range $T = 298.15$ – 308.15 K was calculated using Eq. 31. The results of the calculations are presented in Table 4.9. The positive ΔH and ΔS values shown in Table 4.9 indicate that hydrophobic interaction plays a key role in binding $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ to HSA [214]. Negative values of ΔG indicate that the binding of carboxylated fullerene with HSA is thermodynamically favourable.

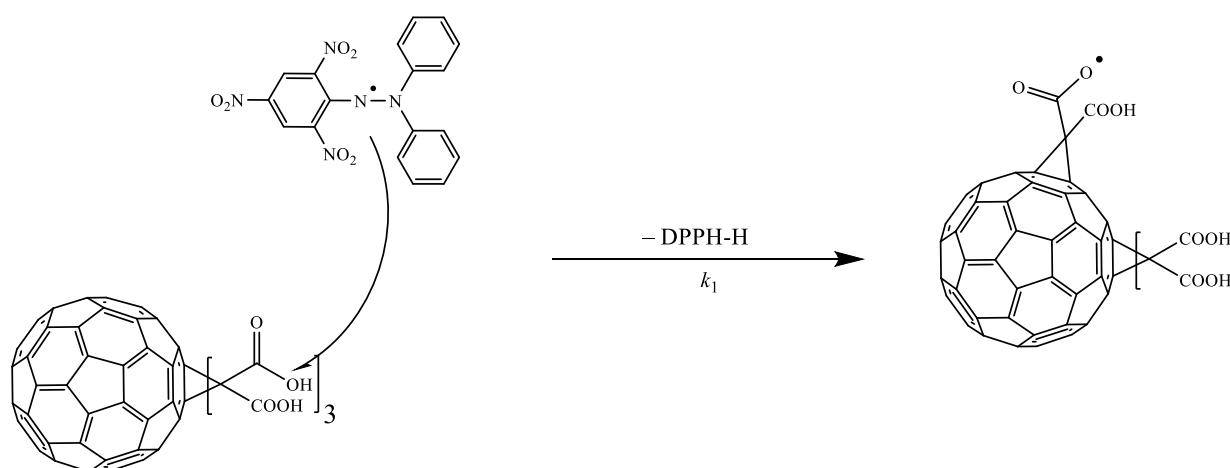
Table 4.9. Thermodynamic parameters of the interaction of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ with HSA.

T / K	$\Delta H / kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S / J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$	$-\Delta G / kJ \cdot mol^{-1}$
298.15			29.4 ± 5.3
303.15	156 ± 22	623 ± 72	32.5 ± 5.9
308.15			35.7 ± 6.4

4.2.4. Antiradical activity

Fig. 4.14 shows the proposed mechanism for the reaction of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ with DPPH. This process includes two steps: (i) hydrogen transfer to the DPPH radical (fast step) and (ii) nucleophilic attack of DPPH on the C=C bond (slow step).

(a)



(b)

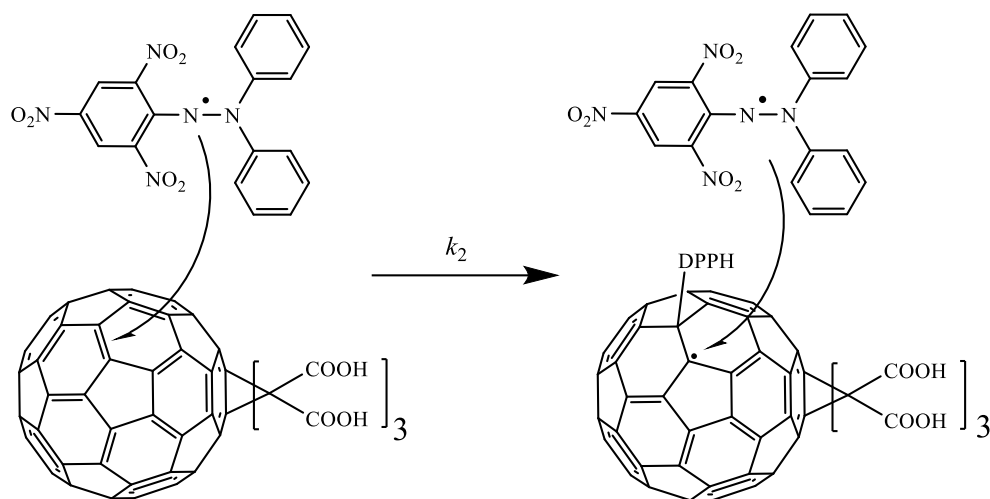


Fig. 4.14. Suggested mechanism of the reaction of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ with DPPH: fast step (a); slow stage (b).

To determine the rate constants of the fast and slow stages of the reaction between carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ and DPPH (k_1 and k_2 , respectively), a two-stage pseudo-first-order kinetic model was used [215] (Eq. 25). Fig. 4.15 shows the kinetic dependence of the DPPH reduction reaction with carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ at 298.15 K.

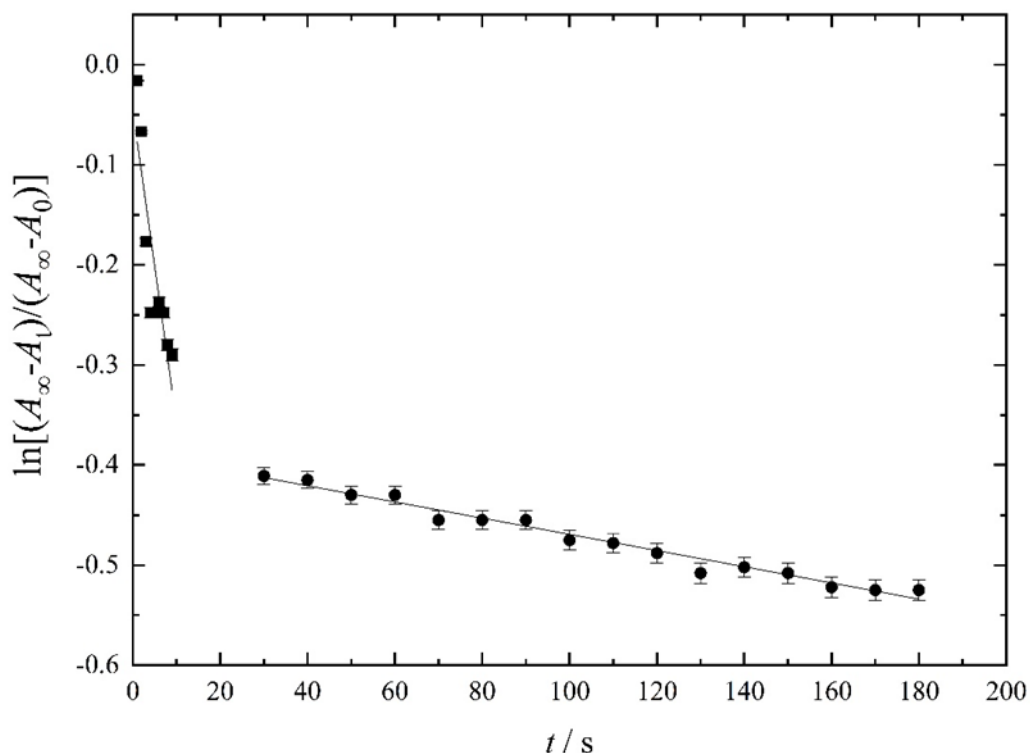


Fig. 4.15. Kinetic dependence of the DPPH reduction reaction with carboxylated fullerene $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ at 298.15 K.

Using Eq. 25 for both stages of the reaction of DPPH with $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, the following rate constants were obtained: $k_1 = 0.0311 \pm 0.0028 \text{ min}^{-1}$ (fast stage) and $k_2 = 0.001 \pm 0.0001$

min^{-1} (limiting stage). An analysis of the literature [215] showed that in the case of individual fullerene C_{60} ($C = 100 \mu\text{M}$), the rate constant k_2 is 0.0007 min^{-1} , while for fullerenol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{30}$ $k_1 = 0.0063 \text{ min}^{-1}$.

The proportion of reduced radical (RDR) was calculated after 1 h according to Eq. 32:

$$RRF = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{DPPH}}} \cdot 100\%, \quad (32)$$

where $A_{\text{DPPH}} = 0.302$, A_{sample} is optical densities of solutions of radicals one hour after the start of measurements in the absence and presence of an antioxidant (sodium ascorbate and $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH}_2)_3]$, respectively).

As a result, the following DVR values were obtained: $RRF (\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH}_2)_3]) = 24.5$, $RRF (\text{sodium ascorbate}) = 86.8$. The obtained values indicate that carboxylated fullerene $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH}_2)_3]$ exhibits antioxidant activity comparable to that of sodium ascorbate (reference compound).

4.2.5. Photobleaching

The photobleaching method is based on the photodegradation of the photosensitiser, which occurs as a result of the action of reactive oxygen species formed during the irradiation of the photosensitiser. It is known that Radachlorin acts by a type II mechanism leading to the formation of reactive oxygen species from singlet oxygen $^1\text{O}_2$ in the presence of Radachlorin upon irradiation [216,217].

The photodegradation of Radachlorin was evaluated by determining the rate constant of photodegradation k_{deg} . The k_{deg} constant can change in the presence of various compounds. A decrease in k_{deg} compared to the control may indicate the presence of antioxidant properties in the test compound, and an increase in k_{deg} indicates prooxidant properties. Sodium azide at a concentration of $C = 500 \mu\text{M}$ was used as a reference compound. The absorption spectra of Radachlorin were measured in the absence and presence of $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH}_2)_3]$ ($C = 10 \mu\text{M}$) and sodium azide ($C = 500 \mu\text{M}$). The data are presented in Table 4.10 and in Fig. 4.16.

Table 4.10. Photodegradation constants of systems containing Radachlorin, $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH}_2)_3]$ and NaN_3 .

Test compound	$k_{\text{deg}} / \text{s}^{-1}$
Radachlorin	0.0205 ± 0.0018
Radachlorin + $10 \mu\text{M} \text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH}_2)_3]$	0.0281 ± 0.0021

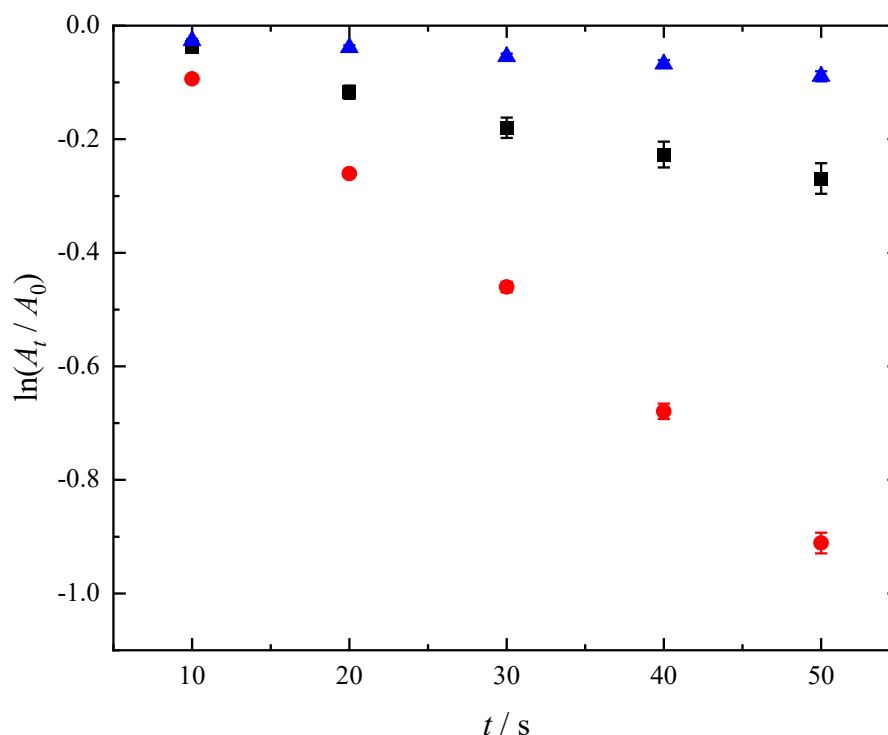


Fig. 4.16. Photobleaching of Radachlorin (\blacktriangle), and Radachlorin in the presence of $10 \mu\text{M}$ $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ (\bullet) and $500 \mu\text{M}$ NaN_3 (\blacksquare).

It can be seen from the obtained data that the addition of $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ to Radachlorin leads to an increase in the rate of photodegradation. Thus, carboxylated fullerene exhibits prooxidant properties under the experimental conditions. It can be concluded that carboxylated fullerene is a pro-oxidant under irradiation, and in the model reaction with DPPH (in the absence of irradiation) it is an antioxidant. The prospects of the conducted research are related to the potential of using carboxylated fullerene in photodynamic therapy of various diseases.

4.2.6. Cytotoxicity

The MTT method was used to determine the cytotoxicity of $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ on the HEK293 cell line. From Fig. 4.17 shows that the incubation of HEK293 cells with carboxylated fullerene in the concentration range $C = 0.1\text{--}10 \mu\text{M}$ does not cause toxic effects, in turn, a further increase in the concentration to $1000 \mu\text{M}$ leads to a fivefold decrease in cell survival compared to the control. It can be assumed that this fact is due to the aggregation of carboxylated fullerene with an increase in the concentration.

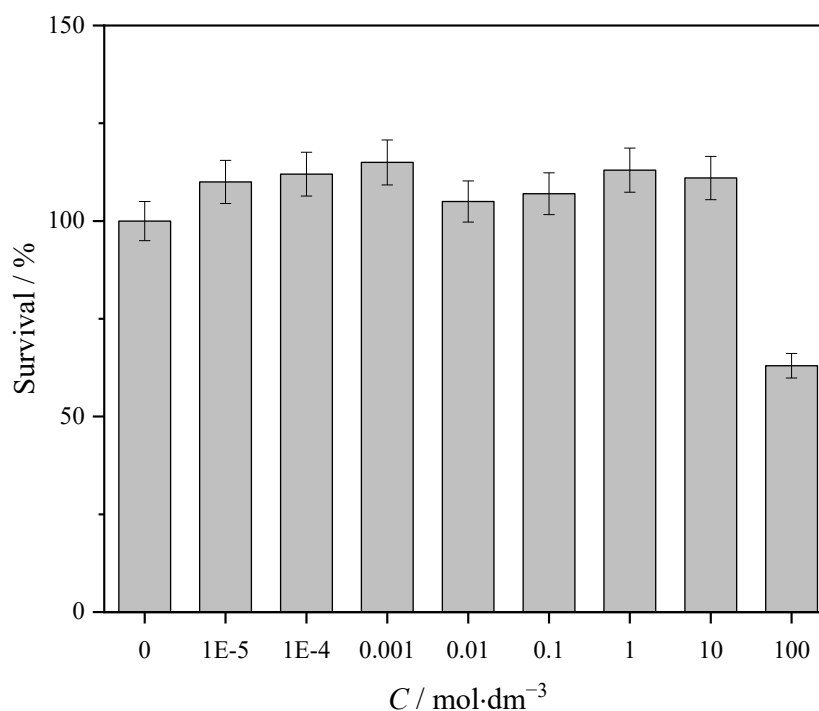


Fig. 4.17. The dependence of the survival of HEK293 cells on the concentration of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$.

4.2.7. Genotoxicity

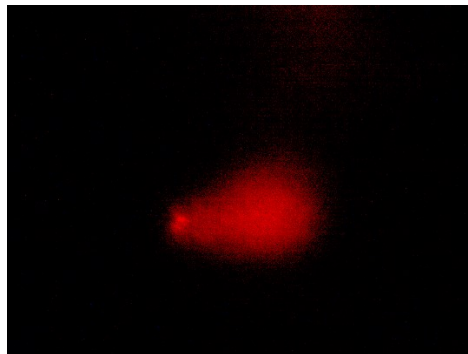
The toxic effect of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ on DNA was studied on human peripheral blood monocytes (HPBM). The mean values of the percentage of DNA in the comet tail (% DNA), tail length and tail moment of comets obtained from HPBM and incubated in the presence of H_2O_2 (positive control) and $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ are presented in Table 4.11.

Table 4.11. Influence of $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ on the percentage of DNA in the comet tail, tail length and tail moment of comets.

Characteristics	Negative control	$C(H_2O_2) / \mu M$				
		100.0	10.0	50.0	75.0	100.0
% DNA	54.6 ± 2.9	89.1 ± 6.7	52.3 ± 3.9	58.3 ± 4.3	56.1 ± 4.8	55.7 ± 4.3
Tail length	20.3 ± 3.1	492.8 ± 20.6	19.8 ± 2.8	25.6 ± 2.4	22.8 ± 3.4	23.3 ± 3.6
Tail moment	11.1 ± 0.1	439.1 ± 1.4	10.4 ± 0.1	14.9 ± 0.1	12.8 ± 0.2	11.3 ± 0.2

Damage to DNA of HPBM in the presence of H_2O_2 is significantly higher than in control cells. However, $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ in the studied concentration range ($C = 10\text{--}100 \mu\text{M}$) did not cause damage to the DNA of HPBM (Fig. 4.18) and, therefore, did not have a genotoxic effect.

(a)



(b)



(c)



Fig. 4.18. DNA comets after HPBM electrophoresis in microgel: positive control ($C(\text{H}_2\text{O}_2) = 100 \mu\text{M}$) — (a), negative control — (b), carboxylated fullerene ($C(\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3) = 100 \mu\text{M}$) — (c).

4.3. Biocompatibility of polyhydroxylated fullerene $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$

4.3.1. Spontaneous haemolysis

Fig. 4.19 shows that $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$, when incubated for 1 and 3 h, causes weak haemolysis over the entire concentration range ($C = 10\text{--}100 \mu\text{M}$); the degree of haemolysis depends on the

dose and time. Thus, fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$ can be attributed to non-haemolytic materials, since the degree of haemolysis does not exceed 5 % [218].

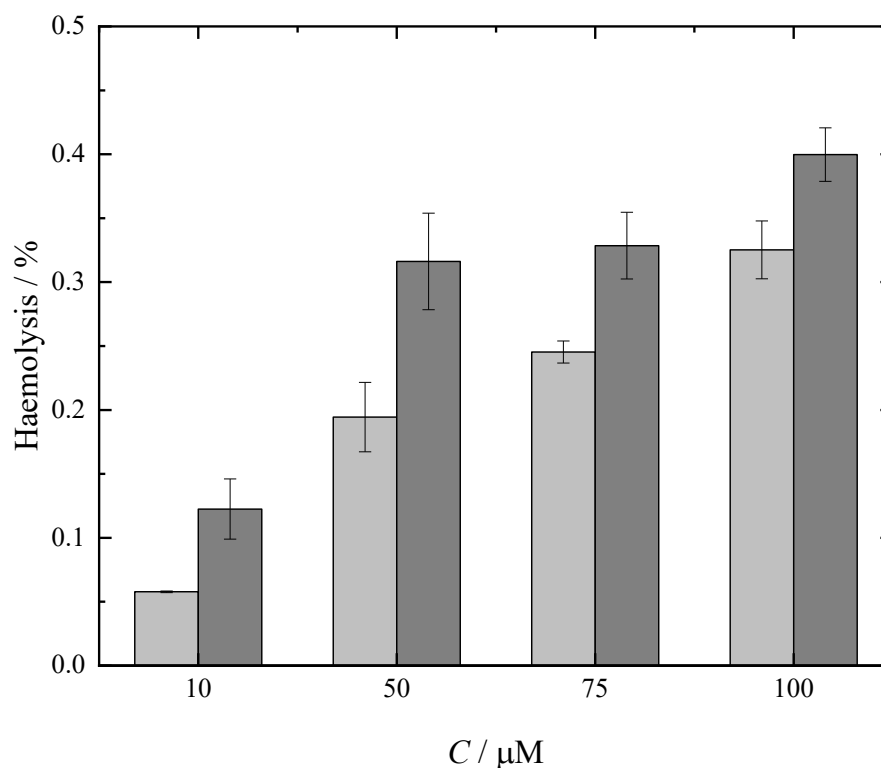


Fig. 4.19. Effect of $C_{60}(OH)_{24}$ on the degree of haemolysis of erythrocytes after 1 h (light grey) and 3 h (dark grey) incubation.

4.3.2. Platelet aggregation

Table 4.12 shows the results of measuring the effect of $C_{60}(OH)_{24}$ on human platelet aggregation in the presence of ADP (an inducer of platelet aggregation). It can be concluded that $C_{60}(OH)_{24}$ in the concentration range $C = 10\text{--}50\ \mu\text{M}$ does not affect platelet aggregation; a further increase in the concentration of $C_{60}(OH)_{24}$ leads to a decrease in aggregation compared to the control. Thus, $C_{60}(OH)_{24}$ has antiplatelet activity at $C > 50\ \mu\text{M}$ in tests for ADP-induced platelet aggregation.

Table 4.12. Effect of $C_{60}(OH)_{24}$ on platelet aggregation in the presence of ADP.

Amplitude / %				
$C_{60}(OH)_{24}$ concentration / μM				
Control	10	50	75	100
83.4 ± 7.32	77.50 ± 4.16	76.57 ± 5.28	56.87 ± 5.28	59.5 ± 5.91

4.3.3. Plasma coagulation haemostasis

As can be seen from the data presented in Table 4.13, $C_{60}(\text{OH})_{24}$ at concentrations of 50–100 μM leads to a statistically significant increase in PT and TT in the blood of healthy donors compared with controls. An increase in aPTT is observed at all studied concentrations of fullereneol. Thus, $C_{60}(\text{OH})_{24}$ exhibits pronounced anticoagulant properties in the studied concentration range ($C = 10\text{--}100 \mu\text{M}$).

Table 4.13. Indicators of coagulation haemostasis after addition of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ to human plasma.

Test	Standard	Control	$C / \mu\text{M}$			
			10	50	75	100
			Coagulation time / s			
TT / s	15–19	17.1 ± 1.6	16.2 ± 1.3	$40 \pm 1.2^*$	$42.6 \pm 1.8^*$	>120.0
aPTT / s	28–40	36.5 ± 1.9	$46.3 \pm 0.9^*$	$65.2 \pm 0.8^*$	$66.8 \pm 0.7^*$	$68.4 \pm 1.6^*$
PT / s	13–18	13.6 ± 1.8	15.0 ± 1.0	$16.5 \pm 1.3^*$	$21.2 \pm 1.5^*$	$20.1 \pm 1.2^*$

* $p < 0.05$ relative control.

4.3.4. Interaction with HSA

HSA has three main ligand binding sites: (i) site I located in subdomain IIA (warfarin binding site); (ii) site II located in subdomain IIIA (ibuprofen binding site); (iii) site III located in subdomain IB (digitonin binding site). To identify binding sites for $C_{60}(\text{OH})_{24}$ with HSA, competitive binding experiments were carried out in the presence of binding site markers and dependences in Hill coordinates were used ($\lg \frac{F_0 - F}{F}$ vs $\lg Q$, where F_0 is the fluorescence intensity of HSA in the absence of $C_{60}(\text{OH})_{24}$, F is the fluorescence intensity of HSA in the presence of $C_{60}(\text{OH})_{24}$, Q is the concentration of $C_{60}(\text{OH})_{24}$, M). Fig. 4.20 shows the dependence in Hill coordinates of the process of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ binding to HSA, the absence of binding site markers at $T = 298.15 \text{ K}$. It can be seen that there is one inflection point corresponding to the presence of two different binding sites [219].

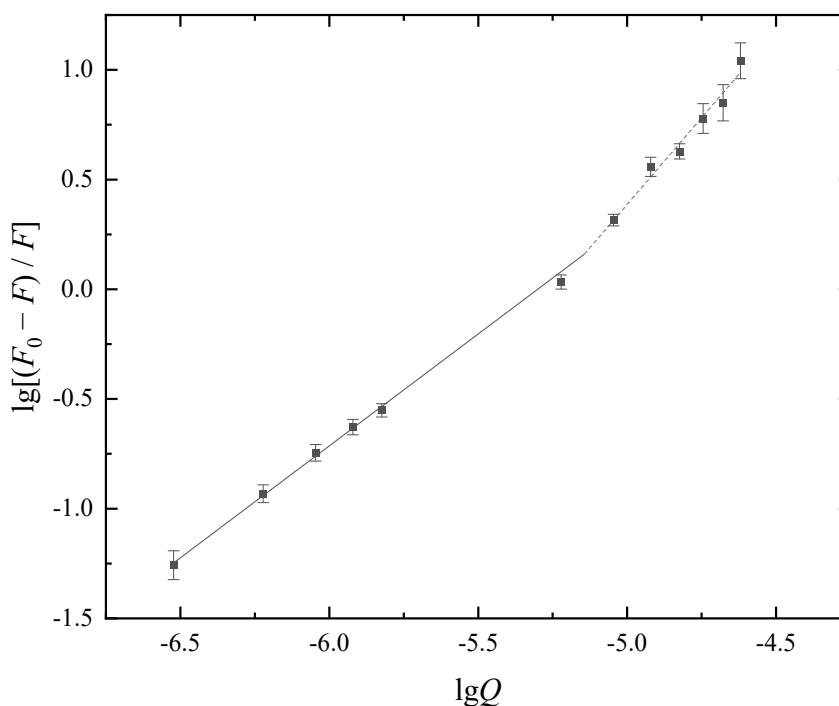


Fig. 4.20. Hill coordinate dependence of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ binding process with HSA with no binding site markers ($T = 298.15 \text{ K}$).

Eq. 29 was used to determine the binding constants (K_b) and the stoichiometric coefficients of the binding process (n) (Table 4.14). It can be seen from the obtained data that: (i) the values of $\lg K_b$ and n do not change at both sites when warfarin is added; (ii) in the first concentration region ($C = 0.3 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), a decrease in $\lg K_b$ and n is observed with the addition of digitonin; (iii) in the second concentration region ($C = 6.0 \cdot 10^{-6} - 24.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), a decrease in $\lg K_b$ and n is observed with the addition of ibuprofen. Based on the binding constants ($2.51 \pm 0.09 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ for the first concentration region and $7.9 \pm 0.5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ for the second), we can conclude that fullerenol forms a strong complex with HSA in the IB subdomain and weakly binds to IIIA subdomain.

Table 4.14. Binding constants and number of binding sites for $C_{60}(\text{OH})_{24}$ with HSA at $T = 298.15 \text{ K}$.

Site marker	$C = 0.3 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$		$C = 6.0 \cdot 10^{-6} - 24.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	
	$\lg K_b / \text{M}^{-1}$	n	$\lg K_b / \text{M}^{-1}$	n
No markers	5.4 ± 0.2	1.02 ± 0.03	2.9 ± 0.2	0.56 ± 0.03
Warfarin	5.2 ± 0.2	0.97 ± 0.03	3.3 ± 0.2	0.61 ± 0.04

Ibuprofen	5.1 ± 0.2	0.95 ± 0.04	1.0 ± 0.1	0.15 ± 0.02
Digitonin	4.5 ± 0.3	0.88 ± 0.05	3.0 ± 0.3	0.52 ± 0.04

4.3.5. Photobleaching

The degradation of the photosensitiser was assessed by measuring the rate constants of photodegradation, the values of which were determined, as the slope of the kinetic curves in the coordinates $\ln(A_t / A_0)$ vs t . The reference substance was NaN_3 solution ($C = 500 \mu\text{M}$), which is an antioxidant. Fig. 4.21 shows the absorption spectra of Radachlorin in the presence of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 2.5 \text{ mg l}^{-1}$) with and without irradiation (10–50 s).

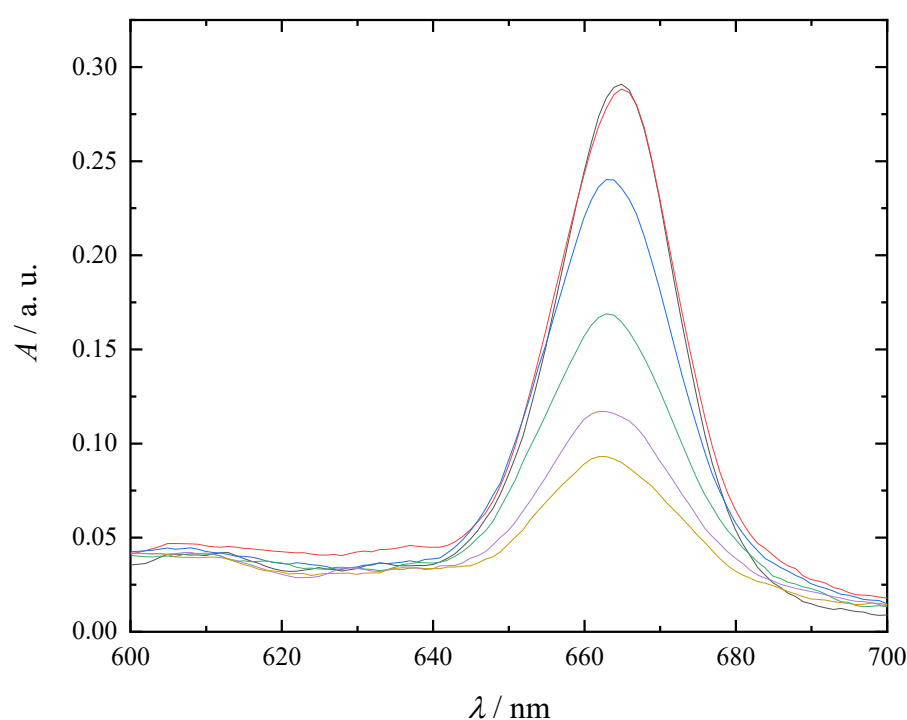


Fig. 4.21. Absorption spectra of Radachlorin + $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 2.5 \text{ mg l}^{-1}$) without radiation (—) and after irradiation (— 10 s, — 20 s, — 30 s, — 40 s, — 50 s).

Further, dependences in the $\ln(A_t / A_0)$ vs t coordinates were built from the obtained electronic spectra and k_{deg} was calculated (Fig. 4.22 and Table 4.15). It can be seen that the addition of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ to Radachlorin leads to a decrease in k_{deg} . Thus, it can be stated that $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ exhibits dose-dependent antioxidant properties upon irradiation.

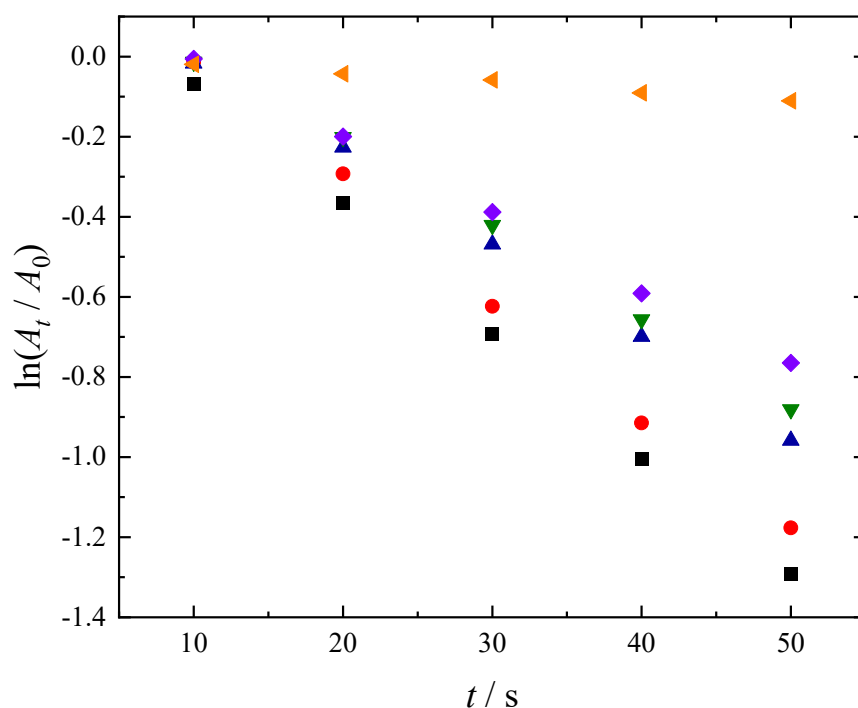


Fig. 4.22. Kinetic dependence of Radachlorin photobleaching in the presence of $C_{60}(OH)_{24}$ (● 10 μM , ▲ 50 μM , ▼ 75 μM , ◆ 100 μM) and NaN_3 (◄ 500 μM). A_t and A_0 are optical densities of Radachlorin solutions at 659 nm before and after irradiation.

Table 4.15. Radachlorin photobleaching constants in the presence of NaN_3 and $C_{60}(OH)_{24}$.

Test compound	$C / \mu\text{M}$	$k_{\text{deg}} / \text{s}^{-1}$
—	—	0.0308 ± 0.0004
$C_{60}(OH)_{24}$	10	0.0295 ± 0.0006
	50	0.0235 ± 0.0005
	75	0.0219 ± 0.0005
	100	0.0191 ± 0.0002
NaN_3	500	0.0023 ± 0.0001

4.3.6. Interaction with DNA

Fig. 4.23 shows the fluorescence spectra of DNA in the absence and presence of $C_{60}(OH)_{24}$ at 298.15 K.

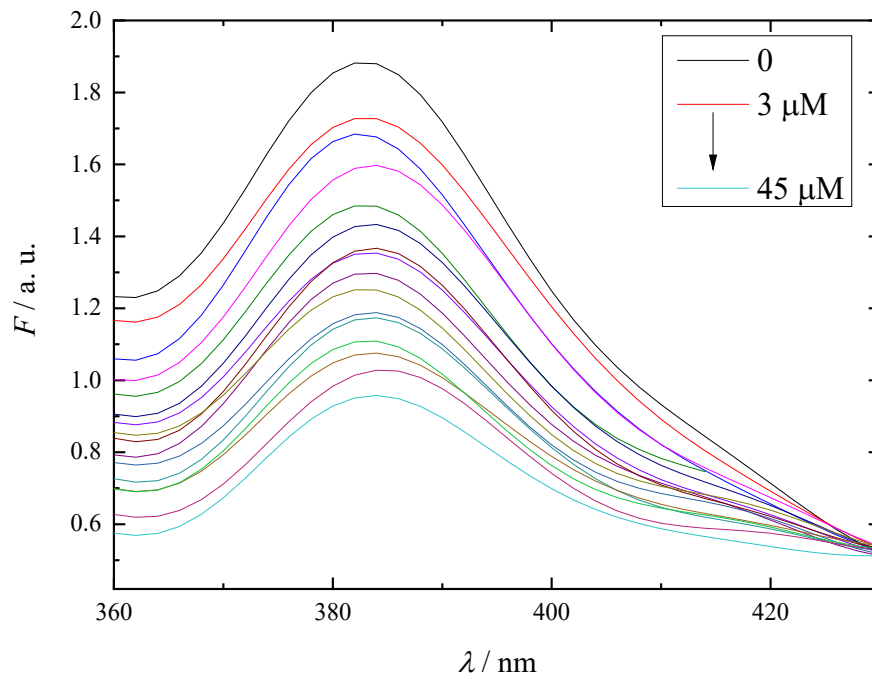


Fig. 4.23. Fluorescence spectra of DNA in the absence and presence of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 3\text{--}45 \mu\text{M}$) at $T = 303.15 \text{ K}$.

To determine the binding constants (K_b), as well as the stoichiometry of the binding reaction (n), Eq. 29 was used. Fig. 4.24 shows an example of the dependence of the process of binding $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ to DNA in Hill coordinates at $T = 303.15 \text{ K}$.

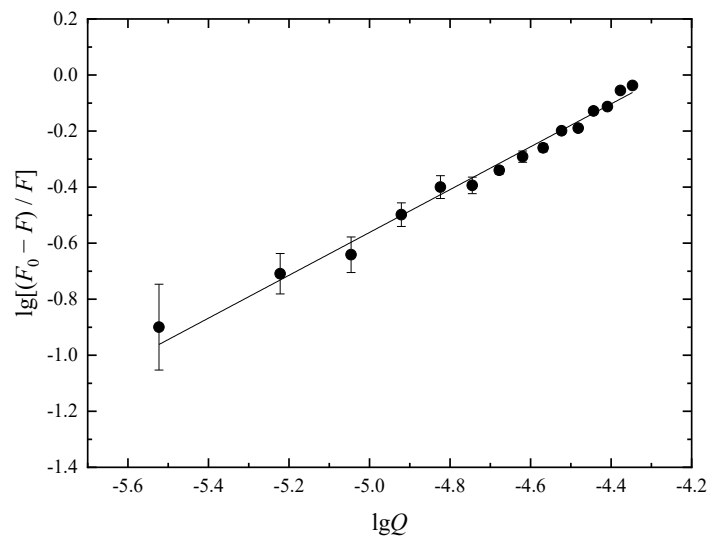


Fig. 4.24. Dependence in Hill coordinates of the process of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ binding to DNA at 303.15 K .

The calculated values of K_b and n are presented in Table 4.16. The order of the obtained K_b values in the temperature range $T = 303.15\text{--}318.15$ K ($10^3\text{--}10^4$ M $^{-1}$) indicates the formation of strong $C_{60}(\text{OH})_{24}$ complexes with DNA. The change in the enthalpy and entropy of the binding reaction of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ with DNA was calculated using the van't Hoff equation without taking into account the effect of temperature (Table 4.16).

Table 4.16. Thermodynamic parameters of the binding reaction of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ with DNA in the range $T = 303.15\text{--}318.15$ K.

T / K	n	$K_b \cdot 10^3 / \text{M}^{-1}$	$\Delta G / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta H / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
303.15	0.76 ± 0.04	1.8 ± 0.1	-19.0 ± 3.2	115 ± 15	443 ± 46
308.15	0.86 ± 0.04	4.8 ± 0.3	-21.3 ± 3.5		
313.15	0.89 ± 0.03	6.7 ± 0.3	-23.5 ± 3.9		
318.15	0.98 ± 0.07	17.9 ± 1.4	-25.7 ± 4.3		

Negative values of ΔG in the temperature range 303.15–318.15 K indicate that the interaction of fulleranol $C_{60}(\text{OH})_{24}$ with DNA is thermodynamically favourable. Positive values of ΔH and ΔS are characteristic of hydrophobic interactions; therefore, it can be assumed that the formation of complexes occurs due to the interaction of hydrophobic regions of the $C_{60}(\text{OH})_{24}$ molecule with DNA. In [220] the authors showed that fulleranol $C_{60}(\text{OH})_{24}$ interacts with the phosphate backbone of the outer side of the native DNA double helix, as well as with pairs of nitrogenous bases inside the DNA major groove. It should be noted that the K_b values obtained in [220], are one or two orders of magnitude higher than the K_b values presented in Table 4.16. This is due to the fact that the study of the interaction of $C_{60}(\text{OH})_{24}$ with DNA was carried out in different temperature ranges, as well as the fact that the synthesis of fulleranol was carried out according to different methods and, as a result, the synthesised adducts had different compositions.

4.3.7. Genotoxicity

Analysis of Table 4.17 shows that the amount of DNA damage in the presence of H_2O_2 is significantly higher than for control cells. As an example, Fig. 4.25 shows photographs of DNA comets in the presence of H_2O_2 ($C = 100$ μM), Dulbecco's buffer solution, and $C_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 10, 50, 75,$ and 100 μM). It can be concluded that $C_{60}(\text{OH})_{24}$ has a moderate dose-dependent genotoxic effect. The results obtained are consistent with the literature. It was shown in [115] that fulleranol $C_{60}(\text{OH})_{24}$ does not have a significant genotoxic effect on CHO-K1 cells (Chinese

hamster ovary cells K1) and HPBM, and its protective effect was established when the cell DNA was exposed to the alkylating agent Mitomycin.

Table 4.17. Effect of $C_{60}(OH)_{24}$ on the percentage of DNA in the comet tail, tail length and tail moment of comets.

Characteristics	Negative control	$C(H_2O_2) / \mu M$		$C(C_{60}(OH)_{24}) / \mu M$		
		100.0	10.0	50.0	75.0	100.0
% DNA	0.84 ± 0.38	82.14 ± 2.03	5.70 ± 1.85	13.18 ± 3.26	17.84 ± 2.60	22.47 ± 3.50
Tail length	28.59 ± 4.27	646.63 ± 67.67	15.08 ± 3.81	25.08 ± 4.51	31.10 ± 6.93	25.25 ± 5.95
Tail moment	0.24 ± 0.08	531.14 ± 19.89	0.85 ± 0.28	3.30 ± 0.43	5.54 ± 0.40	5.67 ± 0.21

(a)



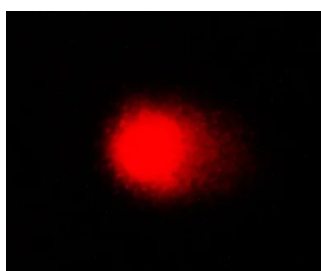
(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

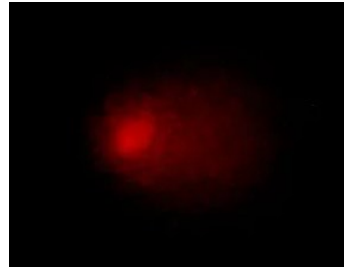


Fig. 4.25. Micrographs of DNA comets after HPBM electrophoresis in microgel: positive control (H_2O_2) — (a), negative control — (b), $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 10, 50, 75, 100 \mu\text{M}$) — (c–f).

Main results and conclusions

1. Scalable one-step procedures for the synthesis of C₆₀ fullerene adducts with L-amino acids (glycine, L-methionine, L-hydroxyproline, L-cysteine) have been developed, leading to the final product with a yield of more than 85 %.
2. The obtained adducts were identified using a complex of modern physicochemical methods. For the first time, solid-state ¹³C NMR spectroscopy was used to identify water-soluble derivatives of C₆₀ fullerene. The use of this method made it possible to confirm the covalent modification of fullerene and establish the qualitative composition of the adducts.
3. A comprehensive study of the physicochemical properties of aqueous solutions of C₆₀ fullerene adducts has been carried out and it has been shown that the synthesised compounds are compatible with water and aqueous solutions; The totality of data on density, viscosity, and particle size for the fullerene adduct–water model system testify to their haemocompatibility. The obtained physicochemical characteristics are key for the development of nanomaterials for biomedical purposes.
4. Fullerenol, carboxylated fullerene, fullerene C₆₀ adducts with L-amino acids are shown to be biocompatible: they do not have cyto- and genotoxicity, are haemocompatible, and exhibit antioxidant activity comparable to the industrial antioxidant ionol.
5. The UV photoprotective effect of the C₆₀ adduct with L-methionine was demonstrated, which manifests itself in dose-dependent inhibition of collagen photodegradation and photo-crosslinking. It is shown that the synthesised compound is promising for the development of photoprotective materials.
6. *In vitro* experiments found that fullerenol exhibits pronounced anticoagulant and antiaggregant properties. The results obtained show the promise of using fullerenols to create heart valves and vascular stents.

Acknowledgment

I express my gratitude to the supervisors Konstantin Nikolaevich Semenov and Vladimir Vladimirovich Sharoyko for scientific guidance, reviewing articles and abstracts of conferences and valuable comments, as well as Igor Vasilievich Murin, head of the Department of Solid State Chemistry, and the department staff for organising scientific work at the department and discussing the results obtained.

Identification and physicochemical study of adducts were carried out using the equipment of the resource centres 'Innovative technologies of composite nanomaterials', 'Magnetic resonance methods of research', 'Methods of analysis of the composition of matter', 'Interdisciplinary resource centre in the direction of 'Nanotechnology', 'Thermogravimetric and calorimetric research methods', 'Centre for Diagnostics of Functional Materials for Medicine, Pharmacology and Nanoelectronics' of the Science Park of St. Petersburg State University. Biomedical research was carried out on the basis of the Department of General and Bioorganic Chemistry and the Laboratory of Biomedical Materials Science of the Pavlov St. Petersburg State Medical University.

List of cited literature

- [1] K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Postnov, V.V. Sharoyko, I.V. Vorotyntsev, M.M. Galagudza, I.V. Murin, Fullerenols: Physicochemical properties and applications, *Prog. Solid State Chem.* 44 (2016) 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.04.002>.
- [2] K.N. Semenov, E. V. Andrusenko, N.A. Charykov, E. V. Litasova, G.G. Panova, A. V. Penkova, I. V. Murin, L.B. Piotrovskiy, Carboxylated fullerenes: Physico-chemical properties and potential applications, *Prog. Solid State Chem.* 47–48 (2017) 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2017.09.001>.
- [3] E.I. Pochkaeva, N.E. Podolskiy, D.N. Zakusilo, A. V. Petrov, N.A. Charykov, T.D. Vlasov, A. V. Penkova, L. V. Vasina, I. V. Murin, V. V. Sharoyko, K.N. Semenov, Fullerene derivatives with amino acids, peptides and proteins: from synthesis to biomedical application, *Prog. Solid State Chem.* (2020) 100255. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2019.100255>.
- [4] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, N.E. Podolskiy, A. V. Petrov, E. V. Litasova, T.D. Vlasov, L. V. Vasina, I. V. Murin, L.B. Piotrovskiy, K.N. Semenov, Biologically active water-soluble fullerene adducts: Das Glasperlenspiel (by H. Hesse)?, *J. Mol. Liq.* 323 (2021) 114990. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114990>.
- [5] V.N. Bezmel'nitsyn, A. V. Eletsii, M. V. Okun', Fullerenes in solutions, *Physics-Uspekhi.* 41 (1998) 1091–1114. <https://doi.org/10.1070/PU1998v041n11ABEH000502>.
- [6] D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama, F. Shahidi, *Bio-nanotechnology: A revolution in food, biomedical, and health sciences*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118451915>.
- [7] K. Matsubayashi, K. Kokubo, H. Tategaki, S. Kawahama, T. Oshima, One-step synthesis of water-soluble fullerenols bearing nitrogen-containing substituents, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 17 (2009) 440–456. <https://doi.org/10.1080/01490450903039263>.
- [8] X.L. Yang, C.H. Fan, H.S. Zhu, Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C(60)]fullerene derivatives and its mechanism, *Toxicol. Vit.* 16 (2002) 41–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812638>.
- [9] M.G. Medzhidova, M.V. Abdullaeva, N.E. Fedorova, V.S. Romanova, A.A. Kushch, *In vitro* antiviral activity of fullerene amino acid derivatives in cytomegalovirus infection,

- Antibiot. i Khimioterapiya. 49 (2004) 13–20.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727140>.
- [10] Y.-L. Lin, H.-Y. Lei, Y.-Y. Wen, T.-Y. Luh, C.-K. Chou, H.-S. Liu, Light-independent inactivation of Dengue-2 virus by carboxyfullerene C₃ isomer, *Virology*. 275 (2000) 258–262. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0490>.
- [11] N. Tsao, T.-Y. Luh, C.-K. Chou, J.-J. Wu, Y.-S. Lin, H.-Y. Lei, Inhibition of group A Streptococcus infection by carboxyfullerene, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 1788–1793. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1788-1793.2001>.
- [12] I.C. Wang, L.A. Tai, D.D. Lee, P.P. Kanakamma, C.K.-F. Shen, T.-Y. Luh, C.H. Cheng, K.C. Hwang, C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 4614–4620. <https://doi.org/10.1021/jm990144s>.
- [13] L.L. Dugan, D.M. Turetsky, C. Du, D. Lobner, M. Wheeler, C.R. Almlı, C.K. Shen, T.Y. Luh, D.W. Choi, T.S. Lin, Carboxyfullerenes as neuroprotective agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 9434–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9256500>.
- [14] L.L. Dugan, E.G. Lovett, K.L. Quick, J. Lotharius, T.T. Lin, K.L. O'Malley, Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders, *Parkinsonism Relat. Disord.* 7 (2001) 243–246. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331193>.
- [15] F. Käsermann, C. Kempf, Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses, *Rev. Med. Virol.* 8 (1998) 143–151. <https://doi.org/10.1002/%28SICI%291099-1654%28199807/09%298%3A3<143%3A%3AAID-RMV214>3.0.CO%3B2-B>.
- [16] B. Vileno, A. Sienkiewicz, M. Lekka, A.J. Kulik, L. Forró, *In vitro* assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C₆₀, *Carbon N. Y.* 42 (2004) 1195–1198. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2003.12.042>.
- [17] I.M. Andreev, V.S. Romanova, A.O. Petrukhina, S.M. Andreev, Amino-acid derivatives of fullerene C₆₀ behave as lipophilic ions penetrating through biomembranes, *Phys. Solid State.* 44 (2002) 683–685. <https://doi.org/10.1134/1.1470559>.
- [18] S.H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G.L. Kenyon, Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 6506–6509. <https://doi.org/10.1021/ja00068a005>.
- [19] S.H. Friedman, P.S. Ganapathi, Y. Rubin, G.L. Kenyon, Optimizing the binding of

- fullerene inhibitors of the HIV-1 protease through predicted increases in hydrophobic desolvation, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2424–2429. <https://doi.org/10.1021/jm970689r>.
- [20] M. Bühl, A. Hirsch, Spherical aromaticity of fullerenes, *Chem. Rev.* 101 (2001) 1153–1183. <https://doi.org/10.1021/cr990332q>.
- [21] K. Prassides, H.W. Kroto, R. Taylor, D.R.M. Walton, W.I.F. David, J. Tomkinson, R.C. Haddon, M.J. Rosseinsky, D.W. Murphy, Fullerenes and fullerides in the solid state: Neutron scattering studies, *Carbon* N. Y. 30 (1992) 1277–1286. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(92\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0008-6223(92)90068-8).
- [22] A.V. Eletsii, B.M. Smirnov, Fullerenes and the structures of carbon, *Adv. Phys. Sci.* 165 (1995) 977. <https://doi.org/10.3367/UFNr.0165.199509a.0977>.
- [23] A.H. Francis, *An Atlas of Fullerenes* By P. W. Fowler (University of Exeter), D. E. Manolopoulos (University of Nottingham). Oxford: New York. 1995. viii + 392 pp. \$98.00. ISBN 0-19-855787-6., *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5161–5161. <https://doi.org/10.1021/ja955342x>.
- [24] H. Shinohara, Endohedral metallofullerenes, *Reports Prog. Phys.* 63 (2000) 843–892. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/63/6/201>.
- [25] K.M. Kadish, R.S. Ruoff, eds., *Fullerenes: Chemistry, Physics, and Technology*, Wiley, 2000. <https://www.wiley.com/en-us/Fullerenes%3A+Chemistry%2C+Physics%2C+and+Technology-p-9780471290896>.
- [26] E. Yamamoto, M. Tansho, T. Tomiyama, H. Shinohara, H. Kawahara, Y. Kobayashi, ¹³C-NMR Study on the Structure of Isolated Sc₂@C₈₄ Metallofullerene, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 2293–2294. <https://doi.org/10.1021/ja953393o>.
- [27] R. Kitaura, H. Okimoto, H. Shinohara, T. Nakamura, H. Osawa, Magnetism of the endohedral metallofullerenes M@C₈₂ (M = Gd, Dy) and the corresponding nanoscale peapods: Synchrotron soft x-ray magnetic circular dichroism and density-functional theory calculations, *Phys. Rev. B.* 76 (2007) 172409. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.76.172409>.
- [28] C. Hansch, T. Fujita, ρ-σ-π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616–1626. <https://doi.org/10.1021/ja01062a035>.
- [29] C.T. Jafvert, P.P. Kulkarni, Buckminsterfullerene's (C₆₀) Octanol–Water Partition Coefficient (K_{ow}) and Aqueous Solubility, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5945–5950.

- <https://doi.org/10.1021/es702809a>.
- [30] A. Bagno, S. Claeson, M. Maggini, M.L. Martini, M. Prato, G. Scorrano, [60]Fullerene as a Substituent, *Chem. - A Eur. J.* 8 (2002) 1015. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020301\)8:5<1015::AID-CHEM1015>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020301)8:5<1015::AID-CHEM1015>3.0.CO;2-Q).
- [31] L.B. Piotrovsky, O.I. Kiselev, Fullerenes and viruses, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures*. 12 (2005) 397–403. <https://doi.org/10.1081/FST-120027198>.
- [32] A. Bianco, T. Da Ros, M. Prato, C. Toniolo, Fullerene-based amino acids and peptides, *J. Pept. Sci.* 7 (2001) 208–219. <https://doi.org/10.1002/psc.313>.
- [33] S. Sato, S. Seki, G. Luo, M. Suzuki, J. Lu, S. Nagase, T. Akasaka, Tunable charge-transport properties of I_h -C₈₀ endohedral metallofullerenes: Investigation of La₂@C₈₀, Sc₃N@C₈₀, and Sc₃C₂@C₈₀, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 11681–11686. <https://doi.org/10.1021/ja303660g>.
- [34] A. Rodríguez-Forteza, A.L. Balch, J.M. Poblet, Endohedral metallofullerenes: A unique host-guest association, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 3551–3563. <https://doi.org/10.1039/c0cs00225a>.
- [35] A.A. Popov, Synthesis and molecular structures of endohedral fullerenes, in: *Endohedral Fullerenes Electron Transf. Spin*, 2017: pp. 1–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47049-8_1.
- [36] M. Mędrek, F. Pluciński, A.P. Mazurek, M. Medrek, F. Pluciński, A.P. Mazurek, Endohedral complexes of fullerene C₆₀ with small covalent molecules (H₂O, NH₃, H₂, 2H₂, 3H₂, 4H₂, O₂, O₃) in the context of potential drug transporter system, *Acta Pol. Pharm.* 70 (2013) 659–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23923390>.
- [37] L.J. Wilson, D.W. Cagle, T.P. Thrash, S.J. Kennel, S. Mirzadeh, J.M. Alford, G.J. Ehrhardt, Metallofullerene drug design, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 199–207. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00080-6).
- [38] H. Bin Na, T. Hyeon, Nanostructured T1 MRI contrast agents, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 6267. <https://doi.org/10.1039/b902685a>.
- [39] V. V. Mody, M.I. Nounou, M. Bikram, Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 795–807. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.020>.
- [40] P. Chaudhuri, A. Paraskar, S. Soni, R.A. Mashelkar, S. Sengupta, Fullerenol–cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy, *ACS Nano*. 3 (2009) 2505–2514.

- <https://doi.org/10.1021/nn900318y>.
- [41] P.J. Krusic, E. Wasserman, P.N. Keizer, J.R. Morton, K.F. Preston, Radical reactions of C_{60} , *Science* (80-.). 254 (1991) 1183–1185. <https://doi.org/10.1126/science.254.5035.1183>.
- [42] C.S. Foote, Photophysical and photochemical properties of fullerenes, in: Springer, Berlin, Heidelberg, 1994: pp. 347–363. https://doi.org/10.1007/3-540-57565-0_80.
- [43] J.W. Arbogast, C.S. Foote, Photophysical properties of C_{70} , *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 8886–8889. <https://doi.org/10.1021/ja00023a041>.
- [44] J.W. Arbogast, A.P. Darmany, C.S. Foote, F.N. Diederich, R.L. Whetten, Y. Rubin, M.M. Alvarez, S.J. Anz, Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C_{60}), *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 11–12. <https://doi.org/10.1021/j100154a006>.
- [45] T. Nagano, K. Arakane, A. Ryu, T. Masunaga, K. Shinmoto, S. Mashiko, M. Hirobe, Comparison of singlet oxygen production efficiency of C_{60} with other photosensitizers, based on 1268 nm emission, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 42 (1994) 2291–2294. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.2291>.
- [46] T. Da Ros, G. Spalluto, M. Prato, Biological applications of fullerene derivatives: A brief overview, *Croat. Chem. Acta.* 74 (2001) 743–755. <https://pdfs.semanticscholar.org/66c5/0a3bdc019822a57e33073c4aa2b0b35ece05.pdf>.
- [47] V. V. Lebedev, K. B. Zhogova, T. A. Bykova, B. S. Kaverin, V. L. Karnatsevich, M. A. Lopatin, Thermodynamics of fullerene C_{60} in the region of 0–340 K, *Izvestiya Akademii Nauk. Series Chemical*. 9 (1996) 2229–2233.
- [48] J. de Bruijn, A. Dworkin, H. Szwarc, J. Godard, R. Céolin, C. Fabre, A. Rassat, Thermodynamic properties of a single crystal of fullerene C_{60} : A DSC study, *Europhys. Lett.* 24 (1993) 551–556. <https://doi.org/10.1209/0295-5075/24/7/008>.
- [49] C.K. Mathews, M.S. Baba, T.S. Lakshmi Narasimhan, R. Balasubramanian, N. Sivaraman, T.G. Srinivasan, P.R. Vasudeva Rao, Vapour pressure and enthalpy of sublimation of C_{70} , *Fuller. Sci. Technol.* 1 (1993) 101–109. <https://doi.org/10.1080/15363839308015519>.
- [50] V. V. Dikiy, G.Ya. Kabo, Thermodynamic properties of C_{60} and C_{70} fullerenes, *Russian Chemical Reviews*. 69 (2000) 95–104. <http://stacks.iop.org/0036-021X/69/i=2/a=R01?key=crossref.a13cf6b63274c1c4a9230d5cb3b064c3>.
- [51] T. Atake, T. Tanaka, H. Kawaji, K. Kikuchi, K. Saito, S. Suzuki, I. Ikemoto, Y. Achiba,

- Heat capacity measurements and thermodynamic studies of the new compound C₆₀, *Phys. C Supercond.* 185–189 (1991) 427–428. [https://doi.org/10.1016/0921-4534\(91\)92016-5](https://doi.org/10.1016/0921-4534(91)92016-5).
- [52] Y. Jin, J. Cheng, M. Varma-Nair, G. Liang, Y. Fu, B. Wunderlich, X.D. Xiang, R. Mostovoy, A.K. Zettl, Thermodynamic characterization of fullerene C₆₀ by differential scanning calorimetry, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 5151–5156. <https://doi.org/10.1021/j100191a073>.
- [53] T. Matsuo, H. Suga, W.I.F. David, R.M. Ibberson, P. Bernier, A. Zahab, C. Fabre, A. Rassat, A. Dworkin, The heat capacity of solid C₆₀, *Solid State Commun.* 83 (1992) 711–715. [https://doi.org/10.1016/0038-1098\(92\)90149-4](https://doi.org/10.1016/0038-1098(92)90149-4).
- [54] K. B. Zhogova, B. V. Lebedev, Thermodynamics of fullerene C₇₀ in the region of 0–390 K, *Izvestiya Akademii Nauk. Series Chemical.* 4 (1998) 647–649.
- [55] H.P. Diogo, M.E.M. Da Piedade, A.D. Darwish, T.J.S. Dennis, Enthalpy of formation of C₇₀, *J. Phys. Chem. Solids.* 58 (1997) 1965–1971. [https://doi.org/10.1016/S0022-3697\(97\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3697(97)00074-7).
- [56] A.I. Druzhinina, R.M. Varushchenko, S.I. Troyanov, L.N. Sidorov, The standard thermodynamic functions of fullerene chloride, C₆₀Cl₃₀, *J. Chem. Thermodyn.* 42 (2010) 165–168. <https://doi.org/10.1016/J.JCT.2009.07.007>.
- [57] A.V. Markin, N.N. Smirnova, T.A. Bykova, V.A. Ruchenin, S.N. Titova, E.A. Gorina, L.V. Kalakutskaya, A.M. Ob'edkov, S.Y. Ketkov, G.A. Domrachev, Thermodynamics of dimer fullerene complex [(Me₃Si)₃C₆₀]₂ in the range from 0 ≤ T/K ≤ 480, *J. Chem. Thermodyn.* 39 (2007) 798–803. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2006.10.002>.
- [58] A.V. Markin, V.A. Ruchenin, N.N. Smirnova, G.A. Abakumov, G.V. Markin, Y.A. Shevelev, V.A. Kuropatov, M.A. Lopatin, V.K. Cherkasov, G.A. Domrachev, Thermodynamic properties of bis-(η⁶-cumene)chromium fulleride [(η⁶-PhCH(CH₃)₂)₂Cr]⁺[C₆₀]⁻ over the range from T → (0 to 310) K, *J. Chem. Thermodyn.* 43 (2011) 1495–1499. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2011.05.005>.
- [59] B.V. Lebedev, T.A. Bykova, A.S. Lobach, Thermodynamic properties of hydrofullerene C₆₀H₃₆ from 5 to 340 K, *J. Therm. Anal. Calorim.* 62 (2000) 257–265. <https://doi.org/10.1023/A:1010139501374>.
- [60] D.N. Nikolaev, N.E. Podolsky, M.I. Lelet, N.R. Iamalova, O.S. Shemchuk, S.V. Ageev, A.V. Petrov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, L.B. Piotrovskiy, I.V. Murin, Thermodynamic and quantum chemical investigation of the monocarboxylated fullerene

- $C_{60}CHCOOH$, J. Chem. Thermodyn. 140 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.105898>.
- [61] M.I. Lelet, K.N. Semenov, E. V. Andrusenko, N.A. Charykov, I. V. Murin, Thermodynamic and thermal properties of the C_{60} -L-lysine derivative, J. Chem. Thermodyn. 115 (2017) 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.07.017>.
- [62] G.O. Iurev, M.I. Lelet, E.I. Pochkaeva, A. V. Petrov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, N.E. Podolsky, L.L. Dulneva, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, Thermodynamic and thermal properties of the C_{60} -L-Arg derivative, J. Chem. Thermodyn. 127 (2018) 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.07.007>.
- [63] N.E. Podolsky, M.I. Lelet, S. V. Ageev, A.G. Novikov, A. V. Petrov, A.S. Mazur, K.N. Semenov, N.A. Charykov, L. V. Vasina, I. V. Murin, Thermodynamic properties from calorimetry and density functional theory and the thermogravimetric analysis of the fullerene derivative $C_{60}(OH)_{40}$, J. Chem. Eng. Data. 64 (2019) 1480–1487. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b01075>.
- [64] N.E. Podolsky, M.I. Lelet, S. V. Ageev, A. V. Petrov, A.S. Mazur, N.R. Iamalova, D.N. Zakusilo, N.A. Charykov, L. V. Vasina, K.N. Semenov, I. V. Murin, Thermodynamic properties of the $C_{70}(OH)_{12}$ fullerenol in the temperature range $T = 9.2$ K to 304.5 K, J. Chem. Thermodyn. 144 (2020) 106029. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.106029>.
- [65] G. Gigli, G. Balducci, V.Y. Markov, O. V. Boltalina, A.A. Goryunkov, L.N. Sidorov, R. Taylor, Saturated vapor pressure and sublimation enthalpy of $C_{60}F_{18}$, J. Chem. Thermodyn. 34 (2002) 57–61. <https://doi.org/10.1006/jcht.2001.0902>.
- [66] T.S. Papina, V.P. Kolesov, V.A. Lukyanova, O.V. Boltalina, N.A. Galeva, L.N. Sidorov, The standard molar enthalpy of formation of fluorofullerene $C_{60}F_{48}$, J. Chem. Thermodyn. 31 (1999) 1321–1328. <https://doi.org/10.1006/jcht.1999.0544>.
- [67] L. B. Piotrovsky, O. I. Kiselev, Fullerenes in biology, Rostok, St. Petersburg, 2006.
- [68] A. Hirsch, ed., Fullerenes and Related Structures, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1999. <https://doi.org/10.1007/3-540-68117-5>.
- [69] L. N. Sidorov, M. A. Yurovskaya, A. Ya. Borshevsky, I. V. Trushkov, I. N. Ioffe, Fullerenes. Textbook, Exam Publishing House, Moscow, 2005. <https://www.labirint.ru/books/67480/>.
- [70] M. Yamada, M.T.H. Liu, S. Nagase, T. Akasaka, New Horizons in Chemical Functionalization of Endohedral Metallofullerenes, Molecules. 25 (2020) 3626.

<https://doi.org/10.3390/molecules25163626>.

- [71] J.C. Hummelen, M. Prato, F. Wudl, There Is a Hole in My Bucky, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7003–7004. <https://doi.org/10.1021/ja00131a024>.
- [72] K. Komatsu, Encapsulation of Molecular Hydrogen in Fullerene C₆₀ by Organic Synthesis, *Science* (80-.). 307 (2005) 238–240. <https://doi.org/10.1126/science.1106185>.
- [73] K. Kurotobi, Y. Murata, A Single Molecule of Water Encapsulated in Fullerene C₆₀, *Science* (80-.). 333 (2011) 613–616. <https://doi.org/10.1126/science.1206376>.
- [74] A. Krachmalnicoff, R. Bounds, S. Mamone, S. Alom, M. Concistrè, B. Meier, K. Kouřil, M.E. Light, M.R. Johnson, S. Rols, A.J. Horsewill, A. Shugai, U. Nagel, T. Rööm, M. Carravetta, M.H. Levitt, R.J. Whitby, The dipolar endofullerene HF@C₆₀, *Nat. Chem.* 8 (2016) 953–957. <https://doi.org/10.1038/nchem.2563>.
- [75] S. Bloodworth, G. Sitinova, S. Alom, S. Vidal, G.R. Bacanu, S.J. Elliott, M.E. Light, J.M. Herniman, G.J. Langley, M.H. Levitt, R.J. Whitby, First Synthesis and Characterization of CH₄@C₆₀, *Angew. Chemie Int. Ed.* 58 (2019) 5038–5043. <https://doi.org/10.1002/anie.201900983>.
- [76] T. Akasaka, S. Nagase, K. Kobayashi, M. Wälchli, K. Yamamoto, H. Funasaka, M. Kako, T. Hoshino, T. Erata, ¹³C and ¹³⁹La NMR Studies of La₂@C₈₀: First Evidence for Circular Motion of Metal Atoms in Endohedral Dimetallofullerenes, *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 36 (1997) 1643–1645. <https://doi.org/10.1002/anie.199716431>.
- [77] V.P. Bubnov, I.E. Kareev, A.I. Kotov, E.B. Yagubsky., New approaches to the synthesis of water-soluble endometallofullerenes with gadolinium, *Hydrog. Mater. Sci. Chem. Carbon Nanomater. X Intern. Conf.* (2007) 1150.
- [78] R. He, H. Zhao, J. Liu, Y. Jiao, Y. Liang, X. Li, C. Chen, Synthesis and Aggregation Studies of Bingel-Hirsch Monoadducts of Gadofullerene, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 21 (2013) 549–559. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2011.643423>.
- [79] N.E. Podolsky, M.A. Marcos, D. Cabaleiro, K.N. Semenov, L. Lugo, A. V. Petrov, N.A. Charykov, V. V. Sharoyko, T.D. Vlasov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of C₆₀(OH)_{22–24} water solutions: Density, viscosity, refraction index, isobaric heat capacity and antioxidant activity, *J. Mol. Liq.* 278 (2019) 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.148>.
- [80] W.J. Blau, H.J. Byrne, D.J. Cardin, T.J. Dennis, J.P. Hare, H.W. Kroto, R. Taylor, D.R.M. Walton, Large infrared nonlinear optical response of C₆₀, *Phys. Rev. Lett.* 67 (1991) 1423–

1425. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.67.1423>.
- [81] S. Nath, H. Pal, A. V. Sapre, Effect of solvent polarity on the aggregation of C₆₀, *Chem. Phys. Lett.* 327 (2000) 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00863-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00863-0).
- [82] Q. Ying, J. Marecek, B. Chu, Solution behavior of buckminsterfullerene (C₆₀) in benzene, *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 2665–2672. <https://doi.org/10.1063/1.467646>.
- [83] L.A. Bulavin, I.I. Adamenko, V.M. Yashchuk, T.Y. Ogul'chansky, Y.I. Prylutskyy, S.S. Durov, P. Scharff, Self-organization C₆₀ nanoparticles in toluene solution, *J. Mol. Liq.* 93 (2001) 187–191. [https://doi.org/10.1016/S0167-7322\(01\)00228-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7322(01)00228-8).
- [84] A.D. Bakare, A. Patnaik., C₆₀ aggregate structure and geometry in non-polar o-xylene, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 87–92.
- [85] H.E. Smorenburg, R.M. Crevecoeur, I.M. Schepper, L.A. de Graaf., Structure and dynamics of C₆₀ in liquid CS₂ from neutron scattering, *Phys.Rev. E.* 52 (1995) 2742–2752.
- [86] S. Nath, H. Pal, A. V. Sapre, Effect of solvent polarity on the aggregation of fullerenes: A comparison between C₆₀ and C₇₀, *Chem. Phys. Lett.* 360 (2002) 422–428. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(02\)00780-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(02)00780-7).
- [87] T. Rudalevige, A.H. Francis, R. Zand, Spectroscopic studies of fullerene aggregates, *J. Phys. Chem. A.* 102 (1998) 9797–9802. <https://doi.org/10.1021/jp9832591>.
- [88] Y.I. Prylutskyy, S.S. Durov, L.A. Bulavin, I.I. Adamenko, K.O. Moroz, A. Graja, A. Bogucki, P. Scharff, Structure, vibrational, and calorical properties of fullerene C₆₀ in toluene solution, *Fuller. Sci. Technol.* 9 (2001) 167–174. <https://doi.org/10.1081/FST-100102964>.
- [89] V.V. Golubkov, B.A. Shakhmatkin, N.A. Charykov, B.M. Akselrod., X-ray small-angle scattering of fullerene C₇₀ solutions in o-xylene, *Russ. J. Phys. Chem. A.* 75 (2001) 1821–1824.
- [90] D. Torok, V.T. Lebedev, L. Cher., Investigation of anomalous clustering of C₆₀ in toluene by small-angle neutron scattering, *Solid State Phys.* 44 (2002) 546–547.
- [91] Q. Ying, J. Marecek, B. Chu, Slow aggregation of buckminsterfullerene (C₆₀) in benzene solution, *Chem. Phys. Lett.* 219 (1994) 214–218. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(94\)87047-0](https://doi.org/10.1016/0009-2614(94)87047-0).
- [92] K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Postnov, V.V. Sharoyko, I.V. Murin, Phase equilibria in fullerene-containing systems as a basis for development of manufacture and application processes for nanocarbon materials, *Russ. Chem. Rev.* 85 (2016) 38–59.

- <https://doi.org/10.1070/RCR4489>.
- [93] N.A. Charykov, K.N. Semenov, E.R. López, J. Fernández, E.B. Serebryakov, V.A. Keskinov, I. V. Murin, Excess thermodynamic functions in aqueous systems containing soluble fullerene derivatives, *J. Mol. Liq.* 256 (2018) 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.177>.
- [94] E.B. Serebryakov, K.N. Semenov, I. V. Stepanyuk, N.A. Charykov, A.N. Mescheryakov, A.N. Zhukov, A. V. Chaplygin, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₇₀-L-lysine aqueous solutions, *J. Mol. Liq.* 256 (2018) 507–518. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.057>.
- [95] K.N. Semenov, N.A. Charykov, I. V. Murin, Y. V. Pukharenko, Physico-chemical properties of the C₆₀-tris-malonic derivative water solutions, *J. Mol. Liq.* 201 (2015) 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.11.019>.
- [96] K.N. Semenov, N.A. Charykov, A.A. Meshcheriakov, E. Lahderanta, A. V. Chaplygin, Y.A. Anufrikov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₆₀-L-threonine water solutions, *J. Mol. Liq.* 242 (2017) 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.098>.
- [97] K.N. Semenov, A.A. Meshcheriakov, N.A. Charykov, M.E. Dmitrenko, V.A. Keskinov, I. V. Murin, G.G. Panova, V. V. Sharoyko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, Physico-chemical and biological properties of C₆₀-L-hydroxyproline water solutions, *RSC Adv.* 7 (2017) 15189–15200. <https://doi.org/10.1039/C6RA26621E>.
- [98] K.N. Semenov, N.A. Charykov, I. V. Murin, Y. V. Pukharenko, Physico-chemical properties of the fullerenol-70 water solutions, *J. Mol. Liq.* 202 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.12.002>.
- [99] E.B. Serebryakov, D.N. Zakusilo, K.N. Semenov, N.A. Charykov, A. V. Akentiev, B.A. Noskov, A. V. Petrov, N.E. Podolsky, A.S. Mazur, L. V. Dul'neva, I. V. Murin, Physico-chemical properties of C₇₀-L-threonine bisadduct (C₇₀(C₄H₉NO₂)₂) aqueous solutions, *J. Mol. Liq.* 279 (2019) 687–699. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.013>.
- [100] D.M. Guldi, M. Prato, Excited-state properties of C₆₀ fullerene derivatives, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 695–703. <https://doi.org/10.1021/ar990144m>.
- [101] A. V. Markin, Y.S. Samosudova, T.G. Ogurtsov, N.N. Smirnova, S. V. Ageev, N.E. Podolsky, A. V. Petrov, I. V. Murin, K.N. Semenov, Heat capacity and standard thermodynamic functions of the fullerenol C₆₀(OH)₂₄, *J. Chem. Thermodyn.* 149 (2020) 106192. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106192>.

- [102] A.A. Shestopalova, K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Postnov, N.M. Ivanova, V. V. Sharoyko, V.A. Keskinov, D.G. Letenko, V.A. Nikitin, V. V. Klepikov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₆₀-arginine water solutions, *J. Mol. Liq.* 211 (2015) 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.07.022>.
- [103] K.N. Semenov, N.A. Charykov, G.O. Iurev, N.M. Ivanova, V.A. Keskinov, D.G. Letenko, V.N. Postnov, V. V. Sharoyko, N.A. Kulenova, I. V. Prikhodko, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the C₆₀-L-lysine water solutions, *J. Mol. Liq.* 225 (2017) 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.11.003>.
- [104] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A.A. Meshcheriakov, A. V. Akentiev, B.A. Noskov, I.T. Rakipov, N.A. Charykov, N.A. Kulenova, B.K. Shaimardanova, N.E. Podolsky, K.N. Semenov, Physicochemical study of water-soluble C₆₀(OH)₂₄ fullereneol, *J. Mol. Liq.* 311 (2020) 113360. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113360>.
- [105] N.A. Charykov, K.N. Semenov, V.A. Keskinov, N.A. Kulenova, Z.K. Shaimardanov, B.K. Shaimardanova, L.V. Gerasimova, A. Kanbar, D.G. Letenko, Cryometry and excess thermodynamic functions in water soluble of the fullereneol C₆₀(OH)₂₄, *Nanosyst. Physics, Chem. Math.* 11 (2020) 205–213. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2020-11-2-205-213>.
- [106] E.I. Pochkaeva, A.A. Meshcheriakov, S. V. Ageev, N.E. Podolsky, A. V. Petrov, N.A. Charykov, L. V. Vasina, O.Y. Nikolaeva, I.N. Gaponenko, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, K.N. Semenov, Polythermal density and viscosity, nanoparticle size distribution, binding with human serum albumin and radical scavenging activity of the C₆₀-L-arginine (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈) aqueous solutions, *J. Mol. Liq.* 297 (2020) 111915. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111915>.
- [107] A.A. Meshcheriakov, G.O. Iurev, M.D. Luttsev, N.E. Podolsky, S. V. Ageev, A. V. Petrov, L. V. Vasina, I.L. Solovtsova, V. V. Sharoyko, I. V. Murin, K.N. Semenov, Physicochemical properties, biological activity and biocompatibility of water-soluble C₆₀-Hyp adduct, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 196 (2020) 111338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111338>.
- [108] C.T. Chien, P.H. Lee, C.F. Chen, M.C. Ma, M.K. Lai, S.M. Hsu, *De Novo* Demonstration and Co-localization of Free-Radical Production and Apoptosis Formation in Rat Kidney Subjected to Ischemia/Reperfusion, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (2001) 973–982. <https://doi.org/10.1681/ASN.V125973>.

- [109] L.Y. Chiang, R.B. Upasani, J.W. Swirczewski, Versatile nitronium chemistry for C₆₀ fullerene functionalization, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10154–10157. <https://doi.org/10.1021/ja00052a010>.
- [110] H.-S. Lai, W. Chen, L.Y. Chiang, Free radical scavenging activity of fulleranol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs, *World J. Surg.* 24 (2000) 450–454. <https://doi.org/10.1007/s002689910071>.
- [111] M.-C.C. Tsai, Y.H. Chen, L.Y. Chiang, Polyhydroxylated C₆₀, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro., *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 438–45. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06821.x>.
- [112] S.M. Mirkov, A.N. Djordjevic, N.L. Andric, S.A. Andric, T.S. Kostic, G.M. Bogdanovic, M.B. Vojinovic-Miloradov, R.Z. Kovacevic, Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fulleranol, C₆₀(OH)₂₄, *Nitric Oxide.* 11 (2004) 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.08.003>.
- [113] Y. Zha, B. Yang, M. Tang, Q. Guo, J. Chen, L. Wen, M. Wang, Concentration-dependent effects of fulleranol on cultured hippocampal neuron viability, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 3099–109. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30934>.
- [114] S. Ye, M. Chen, Y. Jiang, M. Chen, Y. Wang, Z. Hou, L. Ren, T. Zhou, Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system, *Int. J. Nanomedicine.* (2014) 2073. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56973>.
- [115] J. Mrđanović, S. Šolajić, V. Bogdanović, K. Stankov, G. Bogdanović, A. Djordjevic, Effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 680 (2009) 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.08.008>.
- [116] Y. Saitoh, A. Miyanishi, H. Mizuno, S. Kato, H. Aoshima, K. Kokubo, N. Miwa, Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS generation and DNA damages, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 102 (2011) 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.09.006>.
- [117] L.-H. Lu, Y.-T. Lee, H.-W. Chen, L.Y. Chiang, H.-C. Huang, The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fulleranol, polyhydroxylated C₆₀, on vascular smooth

- muscle cells, *Br. J. Pharmacol.* 123 (1998) 1097–1102. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701722>.
- [118] H.C. Huang, T.R. Jan, S.F. Yeh, Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation, *Eur. J. Pharmacol.* 221 (1992) 381–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1426014>.
- [119] H.C. Huang, Y.L. Huang, J.H. Chang, C.C. Chen, Y.T. Lee, Possible mechanism of immunosuppressive effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin), *Eur. J. Pharmacol.* 217 (1992) 143–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425935>.
- [120] H.-C. Huang, C.-R. Lee, Y.-I. Weng, M.-C. Lee, Y.-T. Lee, Vasodilator effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) from a Chinese herb, *Eur. J. Pharmacol.* 218 (1992) 123–128. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90155-W](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90155-W).
- [121] H.-C. Huang, L.-M. Hsieh, H.-W. Chen, Y.-S. Lin, J.-S. Chen, Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells, *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 268 (1994) 73–78. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90121-X](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90121-X).
- [122] H.-C. Huang, M.-W. Lai, H.-R. Wang, Y.-L. Chung, L.-M. Hsieh, C.-C. Chen, Antiproliferative effect of esculetin on vascular smooth muscle cells: possible roles of signal transduction pathways, *Eur. J. Pharmacol.* 237 (1993) 39–44. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90090-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90090-5).
- [123] H.-C. Huang, H.-R. Wang, L.-M. Hsieh, Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell, *Eur. J. Pharmacol.* 251 (1994) 91–93. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90447-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90447-2).
- [124] M.G. Alvarez, C. Prucca, M.E. Milanesio, E.N. Durantini, V. Rivarola, Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C₆₀ dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2006) 2092–2101. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.019>.
- [125] I. Nakanishi, S. Fukuzumi, T. Konishi, K. Ohkubo, M. Fujitsuka, O. Ito, N. Miyata, DNA cleavage via electron transfer from NADH to molecular oxygen photosensitized by γ -cyclodextrin-bicapped C₆₀, in: *Fullerenes New Millenn.*, The Electrochemical Society, Inc., 2001: pp. 138–151. https://books.google.ru/books?id=sqOb5ORTKRkC&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.

- [126] Y. Yamakoshi, N. Umezawa, A. Ryu, K. Arakane, N. Miyata, Y. Goda, T. Masumizu, T. Nagano, Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂^{-*} versus ¹O₂, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 12803–12809. <https://doi.org/10.1021/ja0355574>.
- [127] A. Ikeda, Y. Doi, M. Hashizume, J. Kikuchi, T. Konishi, An extremely effective DNA photocleavage utilizing functionalized liposomes with a fullerene-enriched lipid bilayer, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 4140–4141. <https://doi.org/10.1021/ja070243s>.
- [128] A. Ikeda, T. Hatano, M. Kawaguchi, S. Shinkai, H. Suenaga, Water-soluble [60]fullerene–cationic homooxalix[3]arene complex which is applicable to the photocleavage of DNA, *Chem. Commun.* 0 (1999) 1403–1404. <https://doi.org/10.1039/a903872h>.
- [129] R. Bernstein, F. Prat, C.S. Foote, On the mechanism of DNA cleavage by fullerenes investigated in model systems: Electron transfer from guanosine and 8-oxo-guanosine derivatives to C₆₀, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1998) 464–465. <https://doi.org/10.1021/JA983335D>.
- [130] Y. Liu, Y.-L. Zhao, Y. Chen, P. Liang, L. Li, A water-soluble β-cyclodextrin derivative possessing a fullerene tether as an efficient photodriven DNA-cleavage reagent, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 2507–2511. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.01.181>.
- [131] G.W. Buchko, J.R. Wagner, J. Cadet, S. Raoul, M. Weinfeld, Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1263 (1995) 17–24. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(95\)00078-U](https://doi.org/10.1016/0167-4781(95)00078-U).
- [132] T. Da Ros, G. Spalluto, A.S. Boutorine, M. Prato, Current chemistry: Fullerene derivatives as potential DNA photoprobes, *Aust. J. Chem.* 54 (2001) 223–224. <https://doi.org/10.1071/CH01058>.
- [133] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 761–770. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763058>.
- [134] J.P. Kamat, T.P.A. Devasagayam, K.I. Priyadarsini, H. Mohan, Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications, *Toxicology.* 155 (2000) 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00277-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00277-8).
- [135] Z. Hu, C. Zhang, Y. Huang, S. Sun, W. Guan, Y. Yao, Photodynamic anticancer activities of water-soluble C₆₀ derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line,

- Chem. Biol. Interact. 195 (2012) 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.11.003>.
- [136] A.M. Vaiserman, O. V. Lushchak, A.K. Koliada, Anti-aging pharmacology: Promises and pitfalls, *Ageing Res. Rev.* 31 (2016) 9–35. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.004>.
- [137] F. Beuerle, P. Witte, U. Hartnagel, R. Lebovitz, C. Parng, A. Hirsch, Cytoprotective activities of water-soluble fullerenes in zebrafish models, *J. Exp. Nanosci.* 2 (2007) 147–170. <https://doi.org/10.1080/17458080701502091>.
- [138] L.B. Piotrovsky, O.I. Kiselev, *Fullerenes in biology*, Rostok, Saint Petersburg, 2006.
- [139] G.A. Burley, P.A. Keller, S.G. Pyne, [60]Fullerene Amino Acids and Related Derivatives, *Fuller. Sci. Technol.* 7 (1999) 973–1001. <https://doi.org/10.1080/10641229909350301>.
- [140] M. Bjelaković, T. Kop, V. Maslak, D. Milić, Synthesis and characterization of highly ordered self-assembled bioactive fulleropeptides, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 739–747. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9396-z>.
- [141] H.M. Huang, H.C. Ou, S.J. Hsieh, L.Y. Chiang, Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fulleranol-1, carboxylate C₆₀ in PC12 cells, *Life Sci.* 66 (2000) 1525–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794500>.
- [142] A.S. Basso, D. Frenkel, F.J. Quintana, F.A. Costa-Pinto, S. Petrovic-Stojkovic, L. Puckett, A. Monsonogo, A. Bar-Shir, Y. Engel, M. Gozin, H.L. Weiner, Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1532–1543. <https://doi.org/10.1172/JCI33464>.
- [143] S.S. Ali, J.I. Hardt, L.L. Dugan, SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: A structure-activity study, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 4 (2008) 283–94. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.05.003>.
- [144] L.L. Dugan, L. Tian, K.L. Quick, J.I. Hardt, M. Karimi, C. Brown, S. Loftin, H. Flores, S.M. Moerlein, J. Polich, S.D. Tabbal, J.W. Mink, J.S. Perlmutter, Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in Parkinsonian nonhuman primates, *Ann. Neurol.* 76 (2014) 393–402. <https://doi.org/10.1002/ana.24220>.
- [145] F. Moussa, P. Chretien, P. Dubois, L. Chuniaud, M. Dessante, F. Trivin, P.-Y. Sizaret, V. Agafonov, R. Céolin, H. Szwarc, V. Greugny, C. Fabre, A. Rassat, The influence of C₆₀ powders on cultured human leukocytes, *Fuller. Sci. Technol.* 3 (1995) 333–342. <https://doi.org/10.1080/153638X9508543788>.
- [146] F. Moussa, F. Trivin, R. Céolin, M. Hadchouel, P.Y. Sizaret, V. Greugny, C. Fabre, A. Rassat, H. Szwarc, Early effects of C₆₀ administration in swiss mice: A preliminary

- account for *in vivo* C₆₀ toxicity, Fuller. Sci. Technol. 4 (1996) 21–29. <https://doi.org/10.1080/10641229608001534>.
- [147] L.B. Piotrovskii, Fullerenes in the drug design, Nanotechnologies Russ. 4 (2009) 541–555. <https://doi.org/10.1134/S1995078009090018>.
- [148] O.D. Hendrickson, O. V. Morozova, A. V. Zherdev, A.I. Yaropolov, S.G. Klochkov, S.O. Bachurin, B.B. Dzantiev, Study of distribution and biological effects of fullerene C₆₀ after single and multiple intragastrical administrations to rats, Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures. 23 (2015) 658–668. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2014.949695>.
- [149] J. Gao, H.L. Wang, A. Shreve, R. Iyer, Fullerene derivatives induce premature senescence: A new toxicity paradigm or novel biomedical applications, Toxicol. Appl. Pharmacol. 244 (2010) 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.025>.
- [150] A. Trpkovic, B. Todorovic-Markovic, V. Trajkovic, Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress, Arch. Toxicol. 86 (2012) 1809–1827. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0859-6>.
- [151] G. Andrievsky, V. Klochkov, L. Derevyanchenko, Is the C₆₀ Fullerene Molecule Toxic?!, Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures. 13 (2005) 363–376. <https://doi.org/10.1080/15363830500237267>.
- [152] T. Baati, F. Bourasset, N. Gharbi, L. Njim, M. Abderrabba, A. Kerkeni, H. Szwarc, F. Moussa, The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene, Biomaterials. 33 (2012) 4936–4946. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>.
- [153] J.-Y. Xu, Y.-Y. Su, J.-S. Cheng, S.-X. Li, R. Liu, W.-X. Li, G.-T. Xu, Q.-N. Li, Protective effects of fullerenol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats, Carbon N. Y. 48 (2010) 1388–1396. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.12.029>.
- [154] M. Slavic, A. Djordjevic, R. Radojicic, S. Milovanovic, Z. Orescanin-Dusic, Z. Rakocevic, M.B. Spasic, D. Blagojevic, Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction, J. Nanoparticle Res. 15 (2013) 1650. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1650-1>.
- [155] A. Isakovic, Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, N. Nikolic, S. Vranjes-Djuric, M. Mirkovic, M. Dramicanin, L. Harhaji, N. Raicevic, Z. Nikolic, V. Trajkovic, Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene, Toxicol. Sci. 91 (2006)

- 173–183. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj127>.
- [156] R. Injac, M. Perse, M. Boskovic, V. Djordjevic-Milic, A. Djordjevic, A. Hvala, A. Cerar, B. Strukelj, Cardioprotective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ on a single dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm, *Technol. Cancer Res. Treat.* 7 (2008) 15–25. <https://doi.org/10.1177/153303460800700102>.
- [157] V. Djordjević-Milić, A. Djordjević, S. Dobrić, R. Injac, D. Vučković, K. Stankov, V. Dragojević-Simić, L. Suvajdžić, Influence of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ on doxorubicin induced cardiotoxicity in rats, *Mater. Sci. Forum.* 518 (2006) 525–530. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.518.525>.
- [158] R. Injac, M. Boskovic, M. Perse, E. Koprivec-Furlan, A. Cerar, A. Djordjevic, B. Strukelj, Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fulleranol C₆₀(OH)₂₄ via suppression of oxidative stress, *Pharmacol. Rep.* 60 (2008) 742–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066422>.
- [159] R. Injac, M. Perse, N. Obermajer, V. Djordjevic-Milic, M. Prijatelj, A. Djordjevic, A. Cerar, B. Strukelj, Potential hepatoprotective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas, *Biomaterials.* 29 (2008) 3451–3460. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.048>.
- [160] J.G. Saathoff, A.O. Inman, X.R. Xia, J.E. Riviere, N.A. Monteiro-Riviere, *In vitro* toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells, *Toxicol. Vitro.* 25 (2011) 2105–2112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.013>.
- [161] D. Xu, M. Liu, Q. Huang, J. Chen, H. Huang, F. Deng, J. Tian, Y. Wen, X. Zhang, Y. Wei, A novel method for the preparation of fluorescent C₆₀ poly(amino acid) composites and their biological imaging, *J. Colloid Interface Sci.* 516 (2018) 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.01.085>.
- [162] J.G. Rouse, J. Yang, A.R. Barron, N.A. Monteiro-Riviere, Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes, *Toxicol. Vitro.* 20 (2006) 1313–1320. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.04.004>.
- [163] M. Lucafò, S. Pacor, C. Fabbro, T. Da Ros, S. Zorzet, M. Prato, G. Sava, Study of a potential drug delivery system based on carbon nanoparticles: Effects of fullerene derivatives in MCF7 mammary carcinoma cells, *J. Nanoparticle Res.* 14 (2012) 830. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0830-8>.
- [164] M. Chen, X. Qin, G. Zeng, Biodegradation of carbon nanotubes, graphene, and their

- derivatives, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 836–846. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.001>.
- [165] B.L. Allen, G.P. Kotchey, Y. Chen, N.V.K. Yanamala, J. Klein-Seetharaman, V.E. Kagan, A. Star, Mechanistic investigations of horseradish peroxidase-catalyzed degradation of single-walled carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 17194–17205. <https://doi.org/10.1021/ja9083623>.
- [166] V.E. Kagan, A.A. Kapralov, C.M. St. Croix, S.C. Watkins, E.R. Kisin, G.P. Kotchey, K. Balasubramanian, I.I. Vlasova, J. Yu, K. Kim, W. Seo, R.K. Mallampalli, A. Star, A.A. Shvedova, Lung macrophages “digest” carbon nanotubes using a superoxide/peroxynitrite oxidative pathway, *ACS Nano.* 8 (2014) 5610–5621. <https://doi.org/10.1021/nm406484b>.
- [167] D. Li, J.D. Fortner, D.R. Johnson, C. Chen, Q. Li, P.J.J. Alvarez, Bioaccumulation of 14C60 by the Earthworm *Eisenia fetida*, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 9170–9175. <https://doi.org/10.1021/es1024405>.
- [168] R. Avanesi, W.A. Jackson, B. Sherwin, J.F. Mudge, T.A. Anderson, C₆₀ fullerene soil sorption, biodegradation, and plant uptake, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 2792–2797. <https://doi.org/10.1021/es405306w>.
- [169] D.A. Navarro, R.S. Kookana, M.J. McLaughlin, J.K. Kirby, Fate of radiolabeled C₆₀ fullerenes in aged soils, *Environ. Pollut.* 221 (2017) 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.077>.
- [170] T.D. Berry, T.R. Filley, A.P. Clavijo, M. Bischoff Gray, R. Turco, Degradation and Microbial Uptake of C₆₀ Fullerenes in Contrasting Agricultural Soils, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 1387–1394. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04637>.
- [171] D.A. Navarro, R.S. Kookana, M.J. McLaughlin, J.K. Kirby, Fullerol as a potential pathway for mineralization of fullerene nanoparticles in biosolid-amended soils, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3 (2016) 7–12. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00292>.
- [172] A.J. Tiwari, J.R. Morris, E.P. Vejerano, M.F. Hochella, L.C. Marr, Oxidation of C₆₀ aerosols by atmospherically relevant levels of O₃, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 2706–2714. <https://doi.org/10.1021/es4045693>.
- [173] J.D. Fortner, D. Il Kim, A.M. Boyd, J.C. Falkner, S. Moran, V.L. Colvin, J.B. Hughes, J.-H.H. Kim, Reaction of water-stable C₆₀ aggregates with ozone, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 7497–7502. <https://doi.org/10.1021/es0708058>.
- [174] J. Sanchís, Y. Aminot, E. Abad, A.N. Jha, J.W. Readman, M. Farré, Transformation of

- C_{60} fullerene aggregates suspended and weathered under realistic environmental conditions, *Carbon* N. Y. 128 (2018) 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.11.060>.
- [175] I. Gitsov, A. Simonyan, L. Wang, A. Krastanov, S.W. Tanenbaum, D. Kiemle, Polymer-assisted biocatalysis: Unprecedented enzymatic oxidation of fullerene in aqueous medium, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 50 (2012) 119–126. <https://doi.org/10.1002/pola.24995>.
- [176] E.V. Litasova, V.V. Iljin, A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev, M.A. Dumpis, L.B. Piotrovskiy, The biodegradation of fullerene C_{60} by myeloperoxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.* 471 (2016) 417–420. <https://doi.org/10.1134/S1607672916060119>.
- [177] J.A. Brant, J. Labille, J.Y. Bottero, M.R. Wiesner, Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry, *Langmuir.* 22 (2006) 3878–3885. <https://doi.org/10.1021/la053293o>.
- [178] T. Li, C.Z. Zhang, X. Fan, Y. Li, M. Song, Degradation of oxidized multi-walled carbon nanotubes in water via photo-Fenton method and its degradation mechanism, *Chem. Eng. J.* 323 (2017) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.081>.
- [179] T. Li, C.Z. Zhang, D. Ding, X. Fan, Y. Li, Experimental and theoretical study on degradation of oxidized C_{60} in water *via* photo-Fenton method, *Chem. Eng. J.* 334 (2018) 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.062>.
- [180] S. Trajković, S. Dobrić, V. Jaćević, V. Dragojević-Simić, Z. Milovanović, A. Đorđević, Tissue-protective effects of fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ and amifostine in irradiated rats, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 58 (2007) 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.005>.
- [181] J. Grebowski, P. Kazmierska, G. Litwinienko, A. Lankoff, M. Wolszczak, A. Krokosz, Fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ protects human erythrocyte membrane against high-energy electrons, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 1528–1536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.005>.
- [182] M.A. Orlova, T.P. Trofimova, A.P. Orlov, O.A. Shatalov, Y.K. Napolov, A.A. Svistunov, V.P. Chekhonin, Fullerene and apoptosis, *Oncohematology.* 8 (2014) 65–71. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2013-8-1-65-71>.
- [183] P. Mroz, G.P. Tegos, H. Gali, T. Wharton, T. Sarna, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy with fullerenes, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 1139–1149.

- <https://doi.org/10.1039/b711141j>.
- [184] G. Jiang, F. Yin, J. Duan, G. Li, Synthesis and properties of novel water-soluble fullerene–glycine derivatives as new materials for cancer therapy, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 24. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5348-4>.
- [185] L.B. Piotrovskiy, E.V. Litasova, M.A. Dumpis, D.N. Nikolaev, E.E. Yakovleva, O.A. Dravolina, A.Y. Beshpalov, Enhanced brain penetration of hexamethonium in complexes with derivatives of fullerene C₆₀, *Dokl. Biochem. Biophys.* 468 (2016) 173–175. <https://doi.org/10.1134/S1607672916030030>.
- [186] F.-Y. Hsieh, A. V. Zhilenkov, I.I. Voronov, E.A. Khakina, D. V. Mischenko, P.A. Troshin, S. Hsu, Water-soluble fullerene derivatives as brain medicine: Surface chemistry determines if they are neuroprotective and antitumor, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 11482–11492. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01077>.
- [187] S.M. Rezayat, S.V. Boushehri, B. Salmanian, A.H. Omidvari, S. Tarighat, S. Esmaeili, S. Sarkar, N. Amirshahi, R.N. Alyautdin, M.A. Orlova, I.V. Trushkov, A.L. Buchachenko, K.C. Liu, D.A. Kuznetsov, The porphyrin–fullerene nanoparticles to promote the ATP overproduction in myocardium: ²⁵Mg²⁺-magnetic isotope effect, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1554–1569. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.07.030>.
- [188] N. Amirshahi, R.N. Alyautdin, S. Sarkar, S.M. Rezayat, M.A. Orlova, I. V. Trushkov, A.L. Buchachenko, D.A. Kuznetsov, Fullerene-based low toxic nanocationite particles (porphyrin adducts of cyclohexyl fullerene-C₆₀) to treat hypoxia-induced mitochondrial dysfunction in mammalian heart muscle, *Arch. Med. Res.* 39 (2008) 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.05.007>.
- [189] Y. Ma, Y. Li, M. Guan, C₈₄-carboxyfullerenes as efficient photosensitizers against cancer cells, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.216>.
- [190] Q. Liu, M. Guan, L. Xu, C. Shu, C. Jin, J. Zheng, X. Fang, Y. Yang, C. Wang, Structural effect and mechanism of C₇₀-carboxyfullerenes as efficient sensitizers against cancer cells, *Small.* 8 (2012) 2070–2077. <https://doi.org/10.1002/smll.201200158>.
- [191] W. Li, L. Zhao, T. Wei, Y. Zhao, C. Chen, The inhibition of death receptor mediated apoptosis through lysosome stabilization following internalization of carboxyfullerene nanoparticles, *Biomaterials.* 32 (2011) 4030–4041. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.008>.
- [192] M.L. Agazzi, M.B. Spesia, N.S. Gsponer, M.E. Milanesio, E.N. Durantini, Synthesis,

- spectroscopic properties and photodynamic activity of a fulleropyrrolidine bearing a basic amino group and its dicationic analog against *Staphylococcus aureus*, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 310 (2015) 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.05.022>.
- [193] L. Huang, B. Bhayana, W. Xuan, R.P. Sanchez, B.J. McCulloch, S. Lalwani, M.R. Hamblin, Comparison of two functionalized fullerenes for antimicrobial photodynamic inactivation: Potentiation by potassium iodide and photochemical mechanisms, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 186 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.027>.
- [194] G.P. Tegos, T.N. Demidova, D. Arcila-Lopez, H. Lee, T. Wharton, H. Gali, M.R. Hamblin, Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers, *Chem. Biol.* 12 (2005) 1127–1135. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.08.014>.
- [195] M.B. Ballatore, M.B. Spesia, M.E. Milanesio, E.N. Durantini, Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Med. Chem.* 83 (2014) 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.077>.
- [196] L.-Y. Yang, S.-Y. Hua, Z.-Q. Zhou, G.-C. Wang, F.-L. Jiang, Y. Liu, Characterization of fulleranol-protein interactions and an extended investigation on cytotoxicity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 157 (2017) 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.065>.
- [197] B. Belgorodsky, L. Fadeev, V. Ittah, H. Benyamini, S. Zelner, D. Huppert, A.B. Kotlyar, M. Gozin, Formation and characterization of stable human serum albumin–tris-malonic acid [C₆₀]fullerene complex, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 1058–1062. <https://doi.org/10.1021/BC050103C>.
- [198] H. Benyamini, A. Shulman-Peleg, H.J. Wolfson, B. Belgorodsky, L. Fadeev, M. Gozin, Interaction of C₆₀-fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 378–386. <https://doi.org/10.1021/bc050299g>.
- [199] P.A. Troshin, A.S. Astakhova, R.N. Lyubovskaya, Synthesis of Fullerenols from Halofullerenes, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 13 (2005) 331–343. <https://doi.org/10.1080/15363830500237192>.
- [200] A. Djordjević, M. Vojinović-Miloradov, N. Petranović, A. Devečerski, D. Lazar, B. Ribar, Catalytic preparation and characterization of C₆₀Br₂₄, *Fuller. Sci. Technol.* 6 (1998) 689–

694. <https://doi.org/10.1080/10641229809350229>.
- [201] A. Hirsch, I. Lamparth, H.R. Karfunkel, Fullerene Chemistry in Three Dimensions: Isolation of Seven Regioisomeric Bisadducts and Chiral Trisadducts of C₆₀ and Di(ethoxycarbonyl)methylene, *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 33 (1994) 437–438. <https://doi.org/10.1002/ANIE.199404371>.
- [202] I. Lamparth, A. Hirsch, Water-soluble malonic acid derivatives of C₆₀ with a defined three-dimensional structure, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 1727–1728. <https://doi.org/10.1039/C39940001727>.
- [203] S. V. Ageev, G.O. Iurev, N.E. Podolsky, I.T. Rakipov, L. V. Vasina, B.A. Noskov, A. V. Akentiev, N.A. Charykov, I. V. Murin, K.N. Semenov, Density, speed of sound, viscosity, refractive index, surface tension and solubility of C₆₀[C(COOH)₂]₃, *J. Mol. Liq.* 291 (2019) 111256. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111256>.
- [204] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, A.A. Meshcheriakov, N.E. Podolsky, J.P. Vallejo, L. Lugo, I.T. Rakipov, A. V. Petrov, A. V. Ivanova, N.A. Charykov, K.N. Semenov, Physicochemical investigation of water-soluble C₆₀(C₂NH₄O₂)₄H₄ (C₆₀-Gly) adduct, *J. Mol. Liq.* 344 (2021) 117658. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117658>.
- [205] E.G. Vlakh, E.V. Grachova, D.D. Zhukovsky, A.V. Hubina, A.S. Mikhailova, J.R. Shakirova, V.V. Sharoyko, S.P. Tunik, T.B. Tennikova, Self-assemble nanoparticles based on polypeptides containing C-terminal luminescent Pt-cysteine complex, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41991. <https://doi.org/10.1038/srep41991>.
- [206] I.N. Gaponenko, S. V. Ageev, G.O. Iurev, O.S. Shemchuk, A.A. Meshcheriakov, A. V. Petrov, I.L. Solovtsova, L. V. Vasina, T.B. Tennikova, I. V. Murin, K.N. Semenov, V. V. Sharoyko, Biological evaluation and molecular dynamics simulation of water-soluble fullerene derivative C₆₀[C(COOH)₂]₃, *Toxicol. Vitr.* 62 (2020) 104683. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104683>.
- [207] V. V. Sharoyko, N.R. Iamalova, S. V. Ageev, A.A. Meshcheriakov, G.O. Iurev, A. V. Petrov, D.A. Nerukh, V.S. Farafonov, L. V. Vasina, A. V. Penkova, K.N. Semenov, *In Vitro and In Silico* Investigation of Water-Soluble Fullerenol C₆₀(OH)₂₄: Bioactivity and Biocompatibility, *J. Phys. Chem. B.* 125 (2021) 9197–9212. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03332>.
- [208] C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van den Bergh, G. Wagnières, Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of

- meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 45 (1998) 170–178. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00177-8).
- [209] L. V. Galebskaya, I.L. Solovtsova, E.B. Miroshnikova, I.A. Mikhailova, M.E. Sushkin, A. V. Razumny, A. V. Babina, V.A. Fomina, The importance of a photosensitizer bleaching registration for the evaluation of mechanism of preparation action on the photo-induced hemolysis, *Biomed. Photonics.* 6 (2017) 33–38. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2017-6-3-33-38>.
- [210] V. V. Sharoyko, O.S. Shemchuk, A.A. Meshcheriakov, L. V. Vasina, N.R. Iamalova, M.D. Luttsev, D.A. Ivanova, A. V. Petrov, D.N. Maystrenko, O.E. Molchanov, K.N. Semenov, Biocompatibility, antioxidant activity and collagen photoprotection properties of C₆₀ fullerene adduct with L-methionine, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 40 (2022) 102500. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102500>.
- [211] G.A. Glushnev, A. Kanbar, V.A. Keskinov, N.A. Charykov, K.N. Semenov, Z.K. Shaimardanov, B.K. Shaimardanova, N.A. Kulenova, D.G. Letenko, Solubility phase equilibrium in ternary system fullerenol C₆₀(OH)₂₄ and praseodymium salt: PrCl₃–C₆₀(OH)₂₄–H₂O at 25 °C, *Nanosyst. Physics, Chem. Math.* 11 (2020) 462–467. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2020-11-4-462-467>.
- [212] D. Cabaleiro, C. Gracia-Fernández, J.L. Legido, L. Lugo, Specific heat of metal oxide nanofluids at high concentrations for heat transfer, *Int. J. Heat Mass Transf.* 88 (2015) 872–879. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2015.04.107>.
- [213] M.A. Marcos, D. Cabaleiro, M.J.G. Guimarey, M.J.P. Comuñas, L. Fedele, J. Fernández, L. Lugo, PEG 400-based phase change materials nano-enhanced with functionalized graphene nanoplatelets, *Nanomater. (Basel, Switzerland)*. 8 (2017) 16. <https://doi.org/10.3390/nano8010016>.
- [214] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability, *Biochemistry.* 20 (1981) 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- [215] F. Awan, E. Bulger, R.M. Berry, K.C. Tam, Enhanced radical scavenging activity of polyhydroxylated C₆₀ functionalized cellulose nanocrystals, *Cellulose.* 23 (2016) 3589–3599. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1057-0>.
- [216] M. V. Parkhats, V.A. Galievsky, A.S. Stashevsky, T. V. Trukhacheva, B.M. Dzhagarov,

- Dynamics and efficiency of the photosensitized singlet oxygen formation by chlorin e_6 : The effects of the solution pH and polyvinylpyrrolidone, *Opt. Spectrosc.* 107 (2009) 974–980. <https://doi.org/10.1134/S0030400X09120200>.
- [217] F. Vargas, Y. Díaz, Yartsev Viatcheslav, A. Marcano, Lappa Alexander, Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media, *Ciencia.* 12 (2004) 70–77. https://www.researchgate.net/publication/228372391_Photophysical_properties_of_novel_PDT_photosensitizer_Radachlorin_in_different_media.
- [218] Z.R. Huang, S.C. Hua, Y.L. Yang, J.Y. Fang, Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion, *Acta Pharmacol. Sin.* 29 (2008) 1094–1102. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00829.x>.
- [219] J. Tang, F. Luan, X. Chen, Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3210–3217. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.12.034>.
- [220] C. Ungurenasu, Pinteala, Dascalu, Binding fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ to dsDNA, *Int. J. Nanomedicine.* 4 (2009) 193. <https://www.dovepress.com/binding-fullereneol-c60oh24-to-dsdna-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>.