

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Серебряков Евгений Борисович

**Физико-химическое изучение аддуктов фуллерена
C₇₀ с L-лизином и L-треонином**

Научная специальность 1.4.4. Физическая химия

Диссертация 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

2023 год

Содержание

Перечень сокращений.....	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	11
1.1. Общие сведения о фуллеренах	11
1.2. Получение аддуктов фуллеренов с аминокислотами	13
1.3. Термодинамические свойства фуллеренов и аддуктов фуллеренов.....	17
1.4. Физико-химические свойства аддуктов фуллеренов.....	22
1.6. Биологическая активность фуллеренов и их аддуктов	30
1.6.1 Токсичность фуллеренов и их аддуктов.....	30
1.6.2 Биодegradация фуллеренов.....	32
1.6.3. Фотосенсибилизация и прооксидантные свойства.....	32
1.6.4. Антиоксидантные и цитопротекторные свойства	35
1.6.5. Радиопротекторные свойства	36
1.6.6. Взаимодействие с белками	37
Глава 2. Экспериментальная часть.....	39
2.1. Синтез и идентификация аддуктов C ₇₀ -Lys и C ₇₀ -Thr	39
2.2. Физико-химическое изучение растворов, содержащих аддукты C ₇₀ -Lys и C ₇₀ -Thr.....	40
2.3. Изучение биосовместимости аддуктов C ₇₀ -Lys и C ₇₀ -Thr.....	41
2.3.1. Гемосовместимость	41
2.3.2. Антирадикальная активность	43
2.3.3. Цитотоксичность и пролиферация	43
2.3.4. Взаимодействие с ДНК	45
Глава 3. Обсуждение результатов	46
3.1. Синтез и идентификация аддуктов C ₇₀ -Lys и C ₇₀ -Thr	46
3.1.1. ¹³ C ЯМР-спектроскопия	46
3.1.2. ИК-Фурье спектроскопия.....	46

3.1.3. Термогравиметрический анализ.....	49
3.1.4. Спектроскопия в УФ и видимой области.....	50
3.1.5. Элементный анализ	51
3.1.6. ВЭЖХ.....	51
3.2. Физико-химические свойства водных растворов аддуктов C ₇₀ -Lys и C ₇₀ -Thr.....	53
3.2.1. Плотности водных растворов	53
3.2.2. Вязкости водных растворов.....	61
3.2.3. Рефракции водных растворов.....	65
3.2.4. Электропроводности водных растворов.....	69
3.2.5. Поверхностные свойства водных растворов.....	71
3.2.6. Избыточные термодинамические функции	75
3.2.7. Распределение наночастиц по размеру и ζ-потенциалы.....	83
3.2.8. Корреляция экспериментальных данных плотности и вязкости	89
3.3. Биосовместимость аддуктов C ₇₀ -Lys и C ₇₀ -Thr	93
3.3.1. Гемосовместимость	93
3.3.2. Антирадикальная активность	104
3.3.3. Пролиферация и цитотоксичность.....	107
3.3.4. Взаимодействие на ДНК	108
Основные результаты и выводы.....	115
Благодарности	117
Список цитированной литературы.....	118

Перечень сокращений

АСМ — атомно-силовая микроскопия;

БСА — бычий сывороточный альбумин;

АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время;

АФК — активные формы кислорода;

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека;

ДФПГ — 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил;

МКПК — моноклеарные клетки периферической крови человека;

НФА — *n*-нитрофенилацетат;

ПВ — протромбиновое время;

УФ — ультрафиолет;

ФДТ — фотодинамическая терапия;

ЧСА — человеческий сывороточный альбумин;

Ala — аланин;

Arg — аргинин;

Asp — аспарагин;

ВАМ — угловая микроскопия Брюстера;

СР/MAS — кросс-поляризация/вращение под магическим углом;

Cys — цистеин;

DE — прямое возбуждение;

EG — этиленгликоль;

Glu — глутаминовая кислота;

Gly — глицин;

НЕК293 — клетки почки эмбриона человека;

HeLa — клеточная линия карциномы шейки матки человека;

Нур — гидрокиспролин;

Lm8 — клеточная линия остеосаркомы мыши;

Lys — лизин;

Met — метионин;

МТТ — бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия;

PBS — фосфатно-солевой буфер;

Thr — треонин;

VD-AS — асимметричная модель вириального разложения.

Введение

В настоящее время, одним из наиболее динамично развивающихся направлений современной науки является химия наноструктур, в частности, фуллеренов и их производных. Это связано с тем, что соединения фуллеренового ряда (единственной растворимой формы углерода) проявляют уникальные физико-химические и биологические свойства, которые определяют перспективы их использования в различных областях науки и техники (материаловедение, механика, машиностроение, строительство, электроника, оптика, медицина, фармакология, сельское-хозяйство, пищевой и косметической промышленности и т. д.) [1–4]. Следует отметить, что одним из наиболее перспективных направлений использования фуллеренов является биомедицина. Показано, что легкие фуллерены C_{60} и C_{70} проявляют высокую антиоксидантную активность, обладают радиопротекторным действием, проникают через клеточные мембраны, модулируют трансмембранный транспорт ионов и т.д. [5,6]. Фуллерены могут являться основой для создания новых высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов, однако их применение лимитировано вследствие несовместимости с водой и водными растворами. Как известно, фуллерены растворимы в неполярных органических растворителях, при этом, они практически нерастворимы в воде ($<10^{-11}$ г·л⁻¹) [7,8].

Большим достижением в химии фуллеренов является то, что в последние годы были разработаны синтетические подходы, позволяющие получать водорастворимые аддукты фуллеренов, наиболее перспективными из которых являются полигидроксислированные фуллерены, карбоксилированные фуллерены, аддукты фуллеренов с аминокислотами и пептидами [1,2,5,6,9]. Перспективность указанных соединений связана с широким спектром их биологической активности. Анализ литературы показывает, что водорастворимые аддукты фуллеренов проявляют противоопухолевую [10], противовирусную [11–13], антибактериальную [14], антиоксидантную [15], нейропротекторную [16,17], фотодинамическую [18,19] и мембранотропную [20–22] активность.

Таким образом, большую актуальность имеет разработка новых масштабируемых, экспрессных методик синтеза водорастворимых производных фуллеренов, изучение их физико-химических свойств (плотность, вязкость, электропроводность, распределение частиц по размерам, ζ -потенциал, фазовые равновесия и др.), а также исследование

биосовместимости (гемосовместимость, связывание с ДНК, антиоксидантная активность цитотоксичность).

Цель работы

Целью работы является разработка методов синтеза, изучение физико-химических свойств водорастворимых аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином, имеющих потенциал применения в нанобиомедицине.

Достижение поставленной цели включает решение следующих задач:

Задачи

1. Разработка одностадийных методик синтеза аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином.
2. Идентификация синтезированных аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином, с использованием комплекса современных физико-химических методов: ^{13}C ЯМР-, ИК-Фурье, УФ-спектроскопия, термогравиметрический анализ, элементный анализ, ВЭЖХ.
3. Изучение физико-химических свойств водных растворов синтезированных аддуктов фуллерена C_{70} , а именно: температурных и концентрационных зависимостей плотности, вязкости, рефракции, электропроводности, поверхностных свойств, избыточных термодинамических функций, распределения наночастиц по размеру и ζ -потенциалов.
4. Изучение биосовместимости синтезированных водорастворимых аддуктов фуллерена C_{70} , включающее исследование гемосовместимости (спонтанный гемолиз, агрегация тромбоцитов, плазменно-коагуляционный гемостаз, связывание с человеческим сывороточным альбумином и его эстеразная активность), влияние на клеточные линии (цитотоксичность, клеточная пролиферация), а также взаимодействие с ДНК (связывание с ДНК и генотоксичность).

Научная новизна результатов

1. Впервые разработаны одностадийные методики получения водорастворимых аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином, позволяющие получать конечный продукт с выходом более 85 %.
2. Получен массив экспериментальных данных по изучению физико-химических свойств растворов аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином, что является основой для их дальнейшего применения в биологии и медицине.

3. Впервые применена полуэмпирическая модель VD-AS (Virial Decomposition Asymmetric Model), основанная на вириальном разложении молярной энергии Гиббса по мольным долям компонентов в растворе, и установлены границы устойчивости по отношению фазовому разделению водных растворов аддуктов фуллерена C₇₀ с L-лизином и L-треонином.
4. На основании данных по гемосовместимости, влиянию на клеточные линии, а также влиянию на ДНК было показано, что изучаемые аддукты являются биосовместимыми и нетоксичными.

Достоверность и апробация результатов исследования

Результаты диссертационной работы были опубликованы в пяти научных статьях в рецензируемых журналах первого и второго квартилей и доложены на четырёх международных и всероссийских научных конференциях.

Список публикаций

1. 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> (Q1, ИФ 6.633).
2. 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> (Q1, ИФ 6.633).
3. 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> (Q1, ИФ 6.633).
4. G.G. Panova, E.B. Serebryakov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, O.S. Shemchuk, E. V. Andrusenko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, A.M. Shpanev, L.L. Dulneva, N.E. Podolsky, V. V. Sharoyko. Bioactivity study of the C₆₀-L-threonine derivative for potential application in agriculture. *J Nanomater.* (2019) ID 2306518. <https://doi.org/10.1155/2019/2306518> (Q2, ИФ 3.791).
5. V. V. Sharoyko, E.B. Serebriakov, S. V. Ageev, A. V. Petrov, A.A. Meshcheriakov, N.A. Charykov, I. V. Murin, D.N. Maistrenko, O.E. Molchanov, K.N. Semenov.

Biocompatibility and biological activity of C_{70} fullerene adduct with L-threonine ($C_{70}(C_4H_9NO_3)_2$). *Biochem Biophys Res Commun.* 636 (2022) 50–56. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.10.054> (Q1, ИФ 3.322).

Список конференций

1. Е. Б. Серебряков, Н. Е. Подольский, К. Н. Семёнов, Н. А. Чарыков. Криометрическое изучение бинарной системы C_{70} -Lys- H_2O . «Всероссийский конкурс-конференция им. А. А. Яковкина», г. Санкт-Петербург, 2018.
2. Е. Б. Серебряков, Е. В. Андрусенко, К. Н. Семёнов, Н. А. Чарыков. Физико-химические свойства водных растворов C_{70} -L-лизин. Всероссийская конференция «Химия твёрдого тела и функциональные материалы», г. Санкт-Петербург, 2018.
3. Е. Б. Серебряков, С. В. Агеев. Физико-химические и биологические свойства производных легких фуллеренов с L-лизином и L-треонином. IX Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения – 2022», г. Санкт-Петербург, 2022.
4. Е. Б. Серебряков. Исследование влияния аддуктов лёгких фуллеренов с незаменимыми аминокислотами C_{70} -Lys и C_{70} -Thr на плазменно-коагуляционный гемостаз. XXIX всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023», г. Санкт-Петербург, 2023.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (государственное задание по теме «Разработка радиопротектора на основе водорастворимых форм наноуглерода, модифицированных L-аминокислотами», регистрационный № 123020800170-8).

Положения, выносимые на защиту

1. Одностадийная методика синтеза водорастворимых аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином, позволяющая получать конечный продукт с выходом более 85 %.
2. Данные по идентификации синтезированных аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином с использованием комплекса физико-химических методов.
3. Данные по изучению физико-химических свойств растворов в бинарных системах C_{70} -L-лизин – H_2O и C_{70} -L-треонин – H_2O .
4. Результаты исследований биосовместимости *in vitro* синтезированных аддуктов фуллерена C_{70} .

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения; в первой главе представлен обзор литературы, во второй главе описаны методы экспериментальных исследований, в третьей главе проведено обсуждение полученных результатов по синтезу, идентификации, физико-химическим свойствам и биосовместимости аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 59 рисунков, 24 таблицы и 171 ссылку.

Личный вклад автора заключался в синтезе и идентификации аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином, исследовании физико-химических свойств и биосовместимости полученных соединений, подготовке научных публикаций, представления полученных данных на научных конференциях.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Общие сведения о фуллеренах

Рассмотрим структурные характеристики двух характерных представителей фуллеренового ряда: C_{60} и C_{70} . В молекуле кластера I_h-C_{60} (Рис. 1) имеются связи двух типов: r_1 (только пятичленные циклы) и r_2 (общие для пяти- и шестичленных циклов). Расчётные методы приводят к выводу о разности длин связей r_1 и r_2 , что соответствует экспериментальным данным, согласно которым $r_1 = 1,401 \text{ \AA}$; $r_2 = 1,45 \text{ \AA}$ [23–25]. Из результатов теоретических работ следует, что среди полиэдрических изомеров C_{60} икосаэдрическая структура является наиболее стабильной. Стабильность I_h-C_{60} связана с наличием 12 эквивалентных кораннулевых структурных фрагментов. В каждом кораннулевом фрагменте содержится пятичленный цикл, окружённый пятью шестиугольниками, что обеспечивает изоляцию пятичленных циклов. Качественные соображения об энергетической невыгодности структур, содержащих смежные пятичленные циклы, подтверждены результатами расчётов [26].

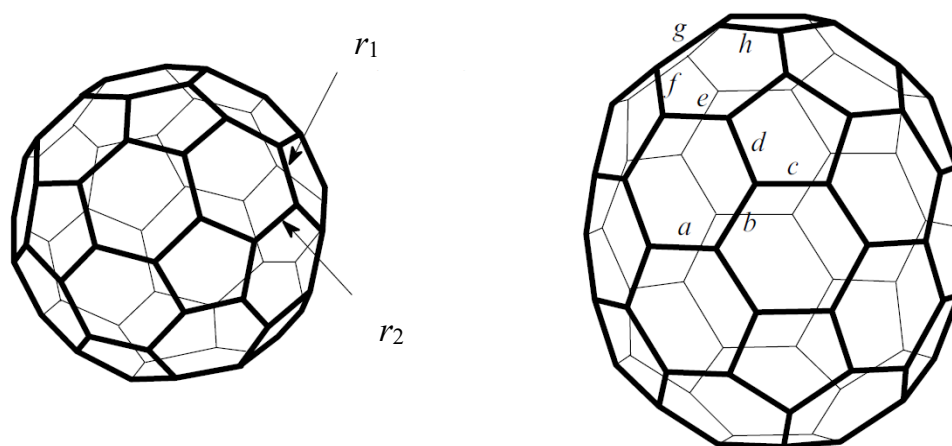


Рис. 1. Строение молекулы фуллерена C_{60} (слева) и C_{70} (справа) [27].

Согласно литературным данным [28], диаметр фуллерена C_{60} составляет $7,1 \text{ \AA}$, длины связей: $C=C$ $1,391 \text{ \AA}$, $C-C$ $1,455 \text{ \AA}$, расстояние между молекулами C_{60} в кристалле: $3,1 \text{ \AA}$, плотность: $1,65 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$. Спектральные характеристики: сродство к электрону составляет $2,6\text{--}2,8 \text{ эВ}$, потенциал ионизации — $7,6 \text{ эВ}$, ширина запрещённой зоны — $1,9 \text{ эВ}$, частоты колебаний: $528, 577, 1183, 1429 \text{ см}^{-1}$, индекс рефракции: $2,2$ (630 нм) [28].

Структура кластера C_{70} была определена методом электронной дифракции [29]. Установлено, что он имеет эллипсоидальную форму, описываемую группой симметрии D_{5h} . В молекуле 8 групп различных связей $C-C$, длины которых варьируются от $1,37 \text{ \AA}$ до $1,47 \text{ \AA}$ (Рис. 1, Табл. 1). Наиболее короткие связи соединяют вершины двух различных

пятиугольников, наиболее длинные расположены в 5-членных циклах. «Высота» молекулы 7,8 Å. Экваториальная часть C_{70} имеет диаметр 6,94 Å. Кластер $D_{5h}-C_{70}$ может быть получен из двух половин кластера C_{60} в результате вставки пяти пар атомов углерода в экваториальной плоскости, при этом он содержит только изолированные пятичленные циклы. Фуллерен C_{70} , как и другие фуллерены, подчиняются правилу изолированных пентагонов, т.е. все пятичленные циклы в этих соединениях окружены шестичленными циклами [30].

Табл. 1. Характеристика С–С связей в молекуле C_{70} (Рис.1) [29].

№	Обозначение на Рис.1	Число связей в молекуле	Группа связей	Длина связи, нм
1	<i>a</i>	5	шестиугольник - шестиугольник	$0,141 \pm 0,002$
2	<i>b</i>	20	шестиугольник - пятиугольник	$0,139 \pm 0,001$
3	<i>c</i>	10	внутри пятиугольника	$0,147 \pm 0,002$
4	<i>d</i>	20	внутри пятиугольника	$0,146 \pm 0,002$
5	<i>e</i>	10	пятиугольник - пятиугольник	$0,137 \pm 0,002$
6	<i>f</i>	20	внутри пятиугольника	$0,147 \pm 0,002$
7	<i>g</i>	10	пятиугольник - пятиугольник	$0,137 \pm 0,002$
8	<i>h</i>	10	внутри пятиугольника	$0,146 \pm 0,001$

Структуры высших фуллеренов ($n \geq 84$) были определены в работе [31]. Фуллерены с ещё большим числом атомов, в том числе и протяжённые фуллероидные углеродные структуры, обсуждаются в работе [32]. Результаты квантово-химических расчётов больших кластеров свидетельствуют о стабильности таких фуллеренов, имеющих икосаэдрическую симметрию, как C_{540} . Однако образование гигантских фуллеренов сфероидального типа является маловероятным, так как они должны заключать внутри себя довольно значительную часть «пустого пространства». Трудно представить, что при синтезе гигантских кластеров в их внутреннюю полость не будут попадать примесные атомы или более мелкие кластеры, состоящие из атомов углерода. Некоторые из гигантских фуллеренов могут иметь цилиндрическую форму или образовывать более сложные сетчатые структуры. Такие углеродные кластеры (тубулены, баррелены, капсулены и т.д.) рассматриваются в работе [32].

1.2. Получение аддуктов фуллеренов с аминокислотами

Вследствие напряжённости структуры фуллеренов, для них характерно относительно лёгкое протекание реакций присоединения: нуклеофильного присоединения, радикального присоединения, циклоприсоединения, электрофильного присоединения, реакции переноса электронов и др. Обобщённая схема, иллюстрирующая реакции функционализации фуллерена C_{60} , представлена на Рис. 2.

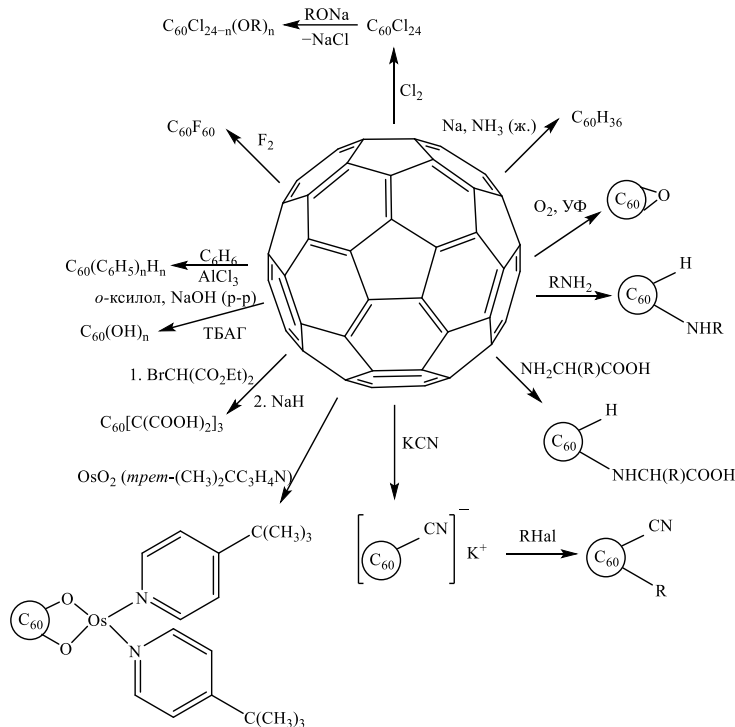


Рис. 2. Химические свойства фуллерена C_{60} [68,69].

Исследование наиболее перспективных для дальнейшего практического применения водорастворимых аддуктов лёгких фуллеренов с аминокислотами, пептидами, а также фуллеренолов и карбоксилированных фуллеренов 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 [1,2,5,6].

Рассмотрим основные способы получения аддуктов фуллеренов с аминокислотами. Первые исследования реакционной способности лёгких фуллеренов C_{60} и C_{70} показали, что фуллерены легко реагируют с первичными и вторичными аминами посредством реакции нуклеофильного присоединения [27,33].

В работах [34–45] были предложены одностадийные методики синтеза аддуктов C_{60} со следующими аминокислотами и пептидами: глицин, *n*-аминобензойная кислота, ω -аминокапроновая кислота, γ -аминомасляная кислота, L-пролин, L-аланин, метил-L-

аланинат, DL-серин, D-аргинин, L-аргинин, β -аланин, валин, цистин, фенилаланин, фолацин, карнозин и глутатион по механизму нуклеофильного присоединения в щелочной среде. Все полученные соединения были охарактеризованы с использованием физико-химических методов (ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР-спектроскопия, элементный анализ, динамическое рассеяние света и просвечивающая электронная микроскопия). Общая схема синтеза представлена на Рис. 3.

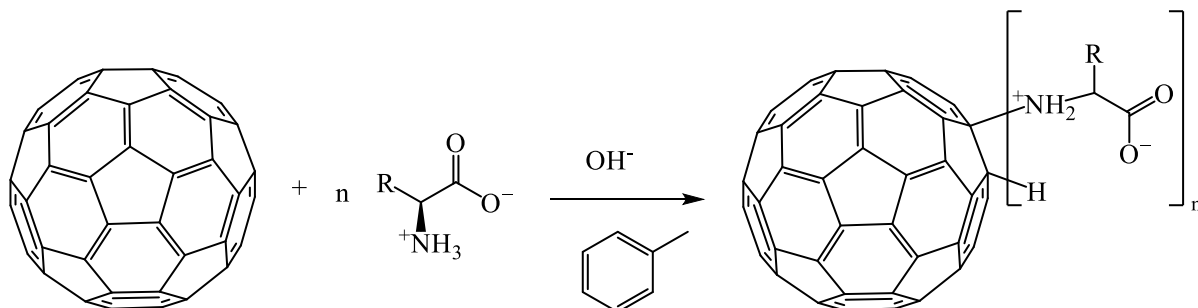


Рис. 3 Общая схема синтеза аддуктов фуллерена C_{60} с аминокислотами [34–45].

Посредством одностадийного процесса взаимодействия фуллерена и аминокислот в щелочной среде были получены натриевые соли фуллерена C_{60} с глицином и L-лизином: $\text{C}_{60}(\text{Gly-ONa})_6 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_{60}(\text{Lys-ONa})_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, а также аддукты смешанного состава: $\text{C}_{60}[(\text{Gly-ONa})_3(\text{Lys-ONa})_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}]$ и $\text{C}_{60}[(\text{Gly-ONa})_3(\text{Asp-ONa})_2\text{Arg-ONa}] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Структуры полученных соединений были охарактеризованы с помощью ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии [46].

Запатентован способ получения кристаллических гидратов аддуктов C_{60} с аминокислотами с химической формулой $\text{C}_{60}(\text{H})_3 \{ \text{NH}(\text{CH}_2)_n \text{COOH} \}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, где $n = 5-7$; $x = 8-10$ в растворе *o*-дихлорбензола и полиэтиленгликоля из фуллерена и калиевых солей соответствующих аминокислот. Аддукты были идентифицированы методами ИК-спектроскопии, элементного и термогравиметрического анализа [47].

В работе [48] была описана методика синтеза водорастворимых аддуктов фуллерена из C_{60}Cl_6 , в ходе синтеза пять атомов хлора замещаются на аминогруппы, один атом хлора остаётся в составе аддукта или замещается водородом (Рис. 4). Этими же авторами в работе [49] описан синтез водорастворимых пентааддуктов фуллерена C_{60} с фенилаланином, серином, β -аланином и γ -фенилбутириновой кислотой, в ходе которого пять атомов хлора замещались на аминокислоты, один атом хлора на водород. Полученные аддукты имеют пять высокополярных групп, введённых в одно из полушарий фуллеренового кора. Между тем, второе полушарие остаётся неизменным и высокогидрофобным. Такая молекулярная структура (Рис.5) отличает эти соединения от

подавляющего большинства других водорастворимых аддуктов фуллеренов. Полученные аддукты были охарактеризованы методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии.

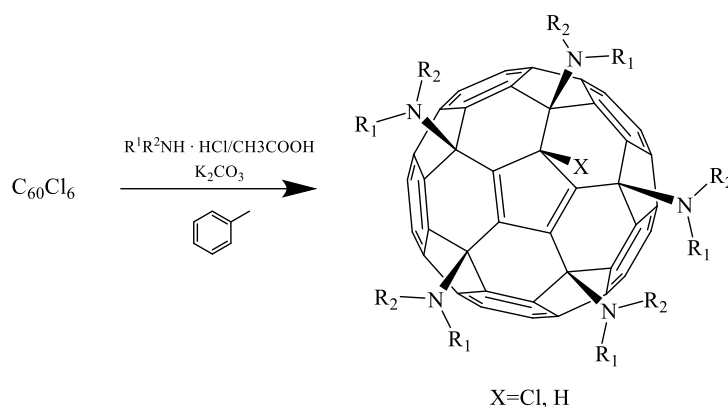


Рис. 4. Схема синтеза аддуктов из C_{60}Cl_6 [48].

В результате 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиновых илидов к C_{60} (реакция Прато), были получены аддукты фуллеропролина. Схема реакции представлена на Рис. 6. Полученные аддукты были идентифицированы с помощью ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии, а также оптической спектроскопии [50]. В работе [51] были предложены пути применения реакции Прато для синтеза аддуктов фуллеренов с аминокислотами, содержащими от четырёх до пяти метиленовых мостиков. Для характеристики полученных аддуктов использовали методы ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

В работе [52] описан синтез аддуктов C_{60} с аспарагиновой и глутаминовой кислотами. Авторы провели конденсацию *N*-замещенного фуллеропирролидина с *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой кислотами, содержащими защищённые α -амино- и α -карбоксылные группы. Их структуры были охарактеризованы методами масс-спектрометрии, УФ-, ИК- и ^1H ЯМР-спектроскопии.

В работе [53] был предложен новый подход к синтезу фуллеренов, функционализированных аминокислотами и пептидами посредством гидрофосфинирования с использованием вторичного фосфинборана в качестве сшивающего агента. Полученные продукты были идентифицированы с помощью ^1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР-спектроскопии.

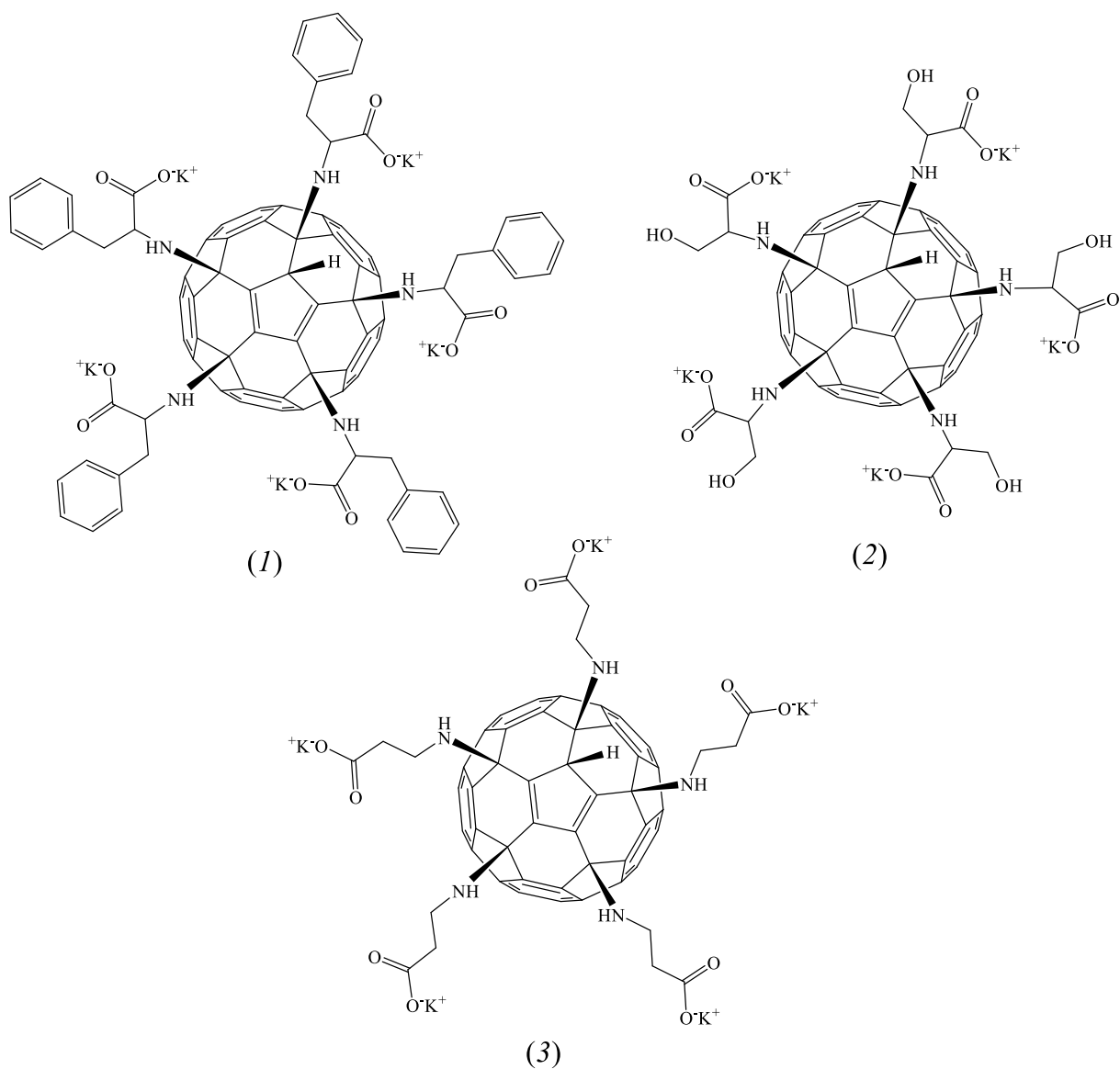


Рис. 5. Структура пентааддуктов C₆₀ с фенилаланином (1), серином (2), β-аланином (3), полученных синтезом из C₆₀Cl₆ [49].

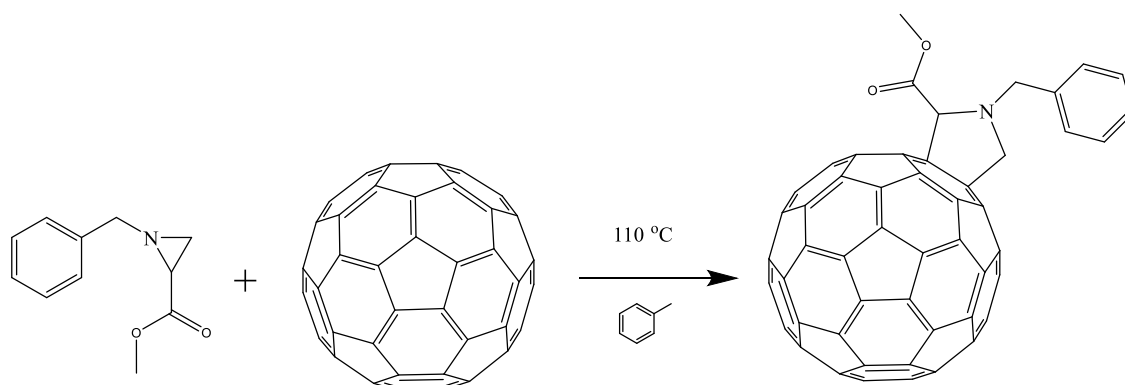


Рис.6. Схема синтеза фуллеропролина по реакции Прато [50].

1.3. Термодинамические свойства фуллеренов и аддуктов фуллеренов

Значения энтальпий сгорания ($\Delta_c H^0$, кДж·моль⁻¹) и энтальпий образования ($\Delta_f H^0$, кДж·моль⁻¹) фуллерена C₆₀ при 298,15 К и стандартном давлении, а также изменения энтропии ($\Delta_f S^0$, кДж·моль⁻¹·К⁻¹), энергии Гиббса ($\Delta_f G^0$, кДж·моль⁻¹) и логарифм константы равновесия ($\lg K_f^0$) реакции образования фуллерена C₆₀ из графита приведены в Табл. 2.

Табл. 2. Значения энтальпий сгорания ($\Delta_c H^0$) и образования ($\Delta_f H^0$) фуллерена C₆₀ при 298,15 К и стандартном давлении, а также изменение энтропии, энергия Гиббса и логарифм константы равновесия реакции образования фуллерена C₆₀ из графита [54].

$\Delta_c H^0$, кДж·моль ⁻¹	$\Delta_f H^0$, кДж·моль ⁻¹	$\Delta_f S^0$, кДж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	$\Delta_f G^0$, кДж·моль ⁻¹	$\lg K_f^0$
-25937 ± 16	2327 ± 17	420,8 ± 1,2	2202 ± 17	-0,386

Анализ экспериментальных данных температурной зависимости теплоёмкости (Рис. 7) демонстрирует, что C₆₀ может существовать в трёх физических состояниях: стеклоподобной кристаллической модификации (КШ), кристаллической (КП) и пластической (КИ). На кривой (Рис. 7) видны взаимопревращения КШ → КП (86 К), и КП → КИ (260,7 К). Кристаллы КИ имеют гранецентрированную кубическую решётку, в узлах которой сферические молекулы C₆₀ совершают свободное вращение, то есть существует ориентационный молекулярный беспорядок, характерный для пластических кристаллов. При охлаждении кристаллов КИ происходит перестройка кубической гранецентрированной решётки в простую кубическую решётку и одновременное ориентационное упорядочение C₆₀ в узлах решётки. Дальнейшее охлаждение приводит к переходу в стеклоподобную модификацию КШ. Таким образом, в интервале температур $T = 0\text{--}340$ К имеют место два перехода: второго рода (разупорядочение молекул в кристаллической решётке) и первого рода (переход из простой кубической решётки в гранецентрированную кубическую решётку).

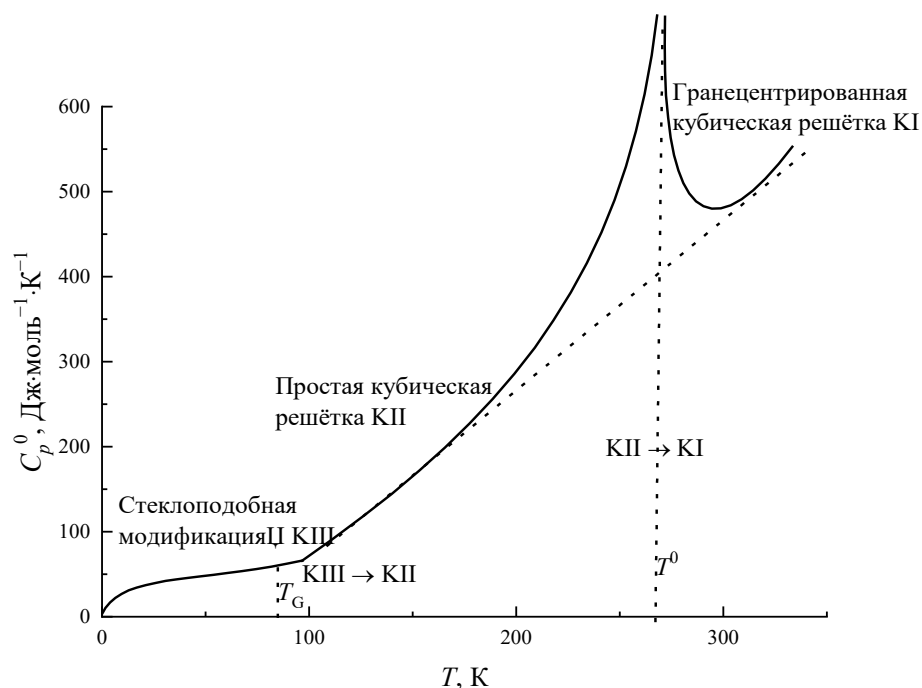


Рис. 7. Температурная зависимость теплоёмкости фуллерена C_{60} .

На основании экспериментальных данных по температурной зависимости изобарной теплоёмкости [54] были рассчитаны термодинамические функции фуллерена C_{60} [54–60].

В Табл. 3 представлены значения термодинамических функций для фуллерена C_{70} . Табл. 3. Значения энтальпий сгорания ($\Delta_c H^0$) и образования ($\Delta_f H^0$) фуллерена C_{70} при 298,15 К и стандартном давлении, а также изменение энтропии, энергии Гиббса и логарифм константы равновесия реакции образования фуллерена C_{70} из графита при тех же условиях [61].

$\Delta_c H^0,$	$\Delta_f H^0,$	$\Delta_f S^0,$	$\Delta_f G^0,$	$\lg K_f^0$
кДж·моль ⁻¹	кДж·моль ⁻¹	кДж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	кДж·моль ⁻¹	
-30101 ± 10	2555 ± 12	62,94 ± 1,41	2536 ± 12	-445

Согласно литературным данным, для фуллерена C_{70} характерен полиморфизм, и в настоящее время имеются данные о нескольких кристаллических модификациях. Кристаллы KI образуют гексагональную решётку, в узлах которой молекулы фуллерена совершают практически свободное вращение. При охлаждении кристаллов KI до области существования кристаллов KII, решётка перестраивается, оставаясь гексагональной. Одновременно происходит ориентационное упорядочение молекул C_{70} в кристаллической решётке. При дальнейшем понижении температуры, гексагональная решётка перестраивается в моноклинную и достигается полное ориентационное

упорядочение молекул C_{70} в кристаллах КIII. При охлаждении кристаллов КIII в интервале температур $T = 19\text{--}45\text{ К}$ происходит anomальное изменение теплоёмкости, обусловленное последовательными фазовыми переходами и наличием смеси нескольких кристаллических фаз [60], при этом просматриваются два интервала такого изменения (Рис. 8). Температуры фазовых переходов соответствуют максимальному значению кажущейся теплоёмкости. Рассмотренные переходы КIII \rightarrow КII и КII \rightarrow KI неэкзотермичны, на кривых кажущихся теплоёмкостей в интервале превращений отсутствуют разрывы графиков зависимости C_p от T . Оба перехода сопровождаются изменением кристаллической структуры C_{70} , что является одним из критериев переходов первого рода, однако они сопровождаются изменением ориентации молекулы от полного порядка в кристаллах КIII до полного беспорядка в кристаллах KI, которые обычно относят к переходам второго рода. Термодинамические функции фуллерена C_{70} в широком интервале температур представлены в работах [61,62].

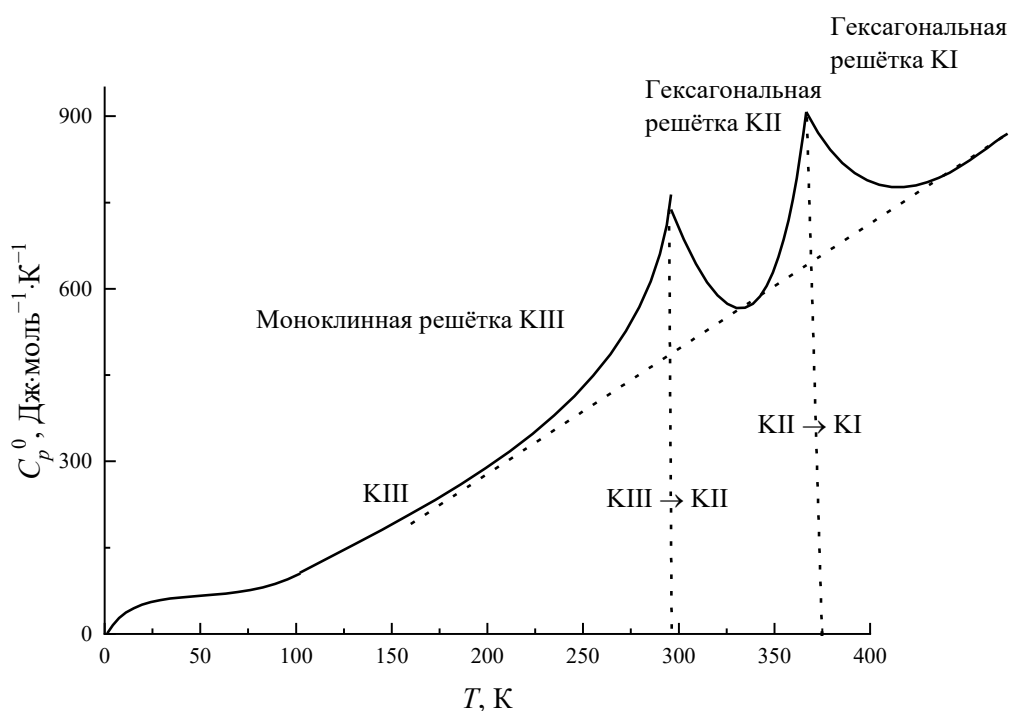
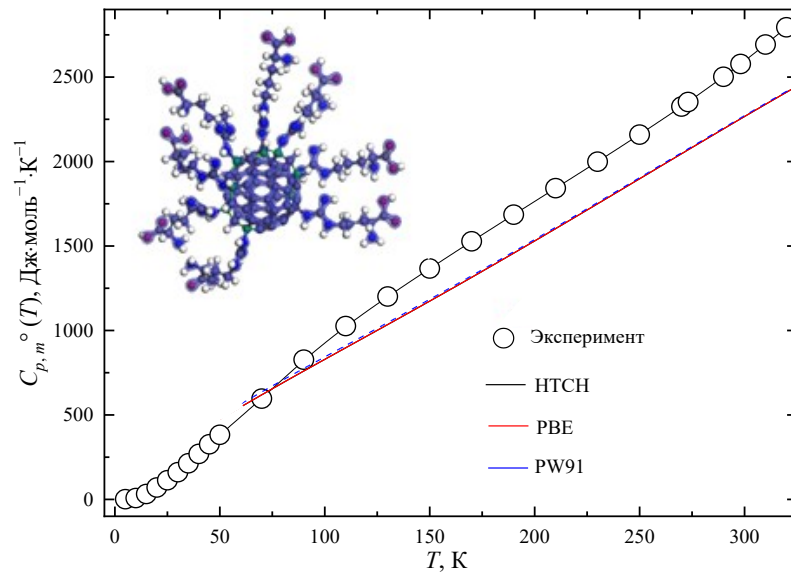


Рис. 8. Температурная зависимость теплоёмкости фуллерена C_{70} [60].

Анализ литературы показывает ограниченное число работ, посвящённых термодинамическому изучению аддуктов фуллеренов C_{60} и C_{70} . К настоящему времени исследованы изобарные теплоемкости кристаллосольвата $C_{60}Cl_{30} \cdot 0,09 Cl_2$ [63], димерного комплекса $[(Me_3Si)_3C_{60}]_2$ в диапазоне температур от 0 до 480 К [64], кристаллического комплекса $[(\eta^6\text{-PhCH}(\text{CH}_3)_2)_2\text{Cr}]^+ [C_{60}]^-$ в диапазоне температур от 0 до 310 К [65],

гидрофуллерена $C_{60}H_{36}$ в диапазоне температур от 5 до 340 К [66]. Авторы работы [67] 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 работы [68] определили стандартную молярную энтальпию сгорания и рассчитали стандартные молярные энтальпии образования в твёрдом и газообразном состояниях производного $C_{60}F_{48}$. В серии работ [69–72] представлены энтальпии сгорания и образования, а также изобарные теплоемкости и стандартные термодинамические функции (энтальпии, энтропии и энергии Гиббса) фуллеренов C_{60} и C_{70} . В работах [73–77] изучены температурные зависимости изобарной теплоёмкости монокарбоксилированного фуллерена $C_{60}CHCOOH$ в диапазоне температур от 6,8 до 326 К [73], фуллеренола $C_{60}(OH)_{40}$ в диапазоне температур от 5 до 326 К [74], фуллеренола $C_{70}(OH)_{12}$ в диапазоне температур от 9,2 до 304 К [75], аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином $C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$ в диапазоне температур от 5 до 328 К [79], аддукта фуллерена C_{60} с L-лизином $C_{60}(C_6H_{13}N_2O_2)_2H_2$ [73] в диапазоне температур от 13 до 326 К, а также рассчитаны значения стандартных термодинамических функций. В качестве примера, на Рис. 9 приведена температурная зависимость изобарной теплоёмкости аддукта C_{60} с L-аргинином, полученная методом адиабатической вакуумной калориметрии в сравнении с расчётными данными, полученными с помощью метода DFT, в программе DMol³ в рамках гармонического приближения. В области низких температур было получено хорошее соответствие между расчётными и экспериментальными данными для двух изомеров аддукта C_{60} с L-аргинином (для молекулы $C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$ с равномерным (Рис. 9, а) и экваториальным (Рис. 9, б) распределением функциональных групп).

(a)



(б)

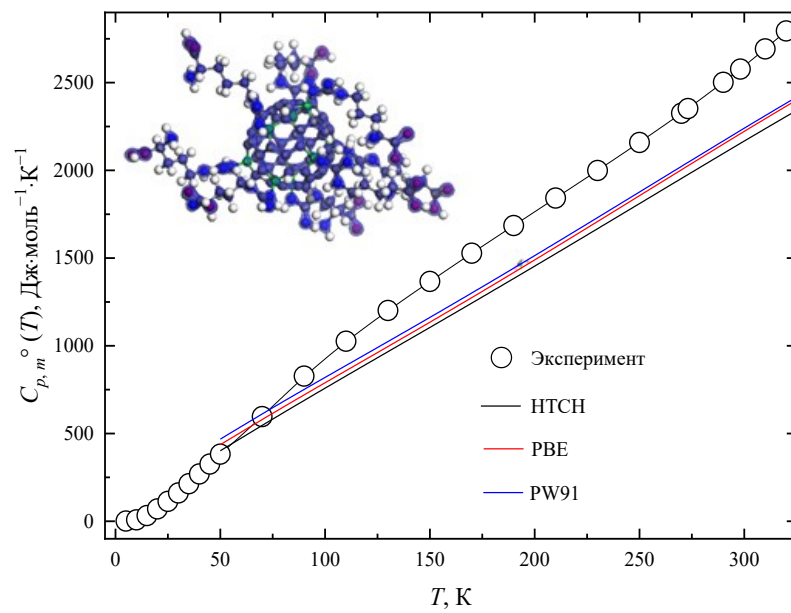


Рис. 9. Сопоставление экспериментальных и расчётных изобарных теплоёмкостей $\text{C}_{60}(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2)_8$ с экваториальным (a) и равномерным (б) распределением функциональных групп. Функционал НТСН – чёрная линия, функционал PBE — красная линия, функционал PW91 — синяя линия [77].

1.4. Физико-химические свойства аддуктов фуллеренов

Рассмотрим работы, посвящённые исследованию физико-химических свойств аддуктов фуллеренов с аминокислотами. Анализ литературы показывает, что можно выделить следующие направления, посвященные физико-химическому изучению аддуктов легких фуллеренов:

(1) физико-химическое исследование аддуктов фуллеренов методами квантовой химии и молекулярной динамики;

(2) физико-химическое исследование растворов аддуктов фуллеренов, а также установление корреляции между строением, физико-химическими свойствами и биологической активностью.

Кратко остановимся на работах, посвящённых применению методов компьютерного моделирования к изучению аддуктов фуллеренов с аминокислотами. Ahmadian и соавт. [78] провели расчёт электронной структуры комплекса на основе металлофуллерена $C_{60}Al$ и глицина методом DFT. Для проведения расчёта авторами применялся пакет SIESTA с численно определённым базисом, нормирующим псевдопотенциалом Troullier–Martins и функционалом PBE (с учётом поляризации для валентных электронов). При проведении расчётов авторами выполнялась полная оптимизация геометрии рассматриваемых систем и по разностям полных энергий определялась энергия взаимодействия Gly с $C_{60}Al$. В результате проведённых расчётов было показано, что влияние алюминия на электронную структуру системы $C_{60}Al$ очень значительно вследствие образования молекулярных орбиталей с фуллереном, тогда как электронная структура глицина не участвует в образовании молекулярных орбиталей с фуллереном. Также авторами сделан вывод о том, что глицин предпочтительнее связывается с фуллереновым остовом через аминогруппу с образованием неустойчивого комплекса с энергией взаимодействия $-2,54$ ккал·моль⁻¹.

Андреевой и соавт. [79] были рассчитаны изменения стандартных термодинамических функций (энергии Гиббса, энтальпии, энтропии) реакций образования amino- ($C_{60}H_n(NH_2)_n$) и карбоксамидных ($C_{60}H_n(NH_2)_n(CO_2)_n$) производных C_{60} с различной степенью замещения (Рис. 10). Для проведения расчётов авторами применялся гибридный метод теории функционала плотности (M11), реализованный в программе Gaussian 09. Авторами было показано, что реакция взаимодействия полиаминофуллерена с диоксидом углерода полностью определяется энтальпийным

вкладом в энергию Гиббса. Авторы отмечают, что по мере увеличения числа amino- и карбоксамидных групп увеличиваются свободные энергии гидратации молекул, а также из-за сильных электростатических взаимодействий карбоксамидные аддукты могут проявлять определенную степень агрегации (образование кластеров) в водных растворах.

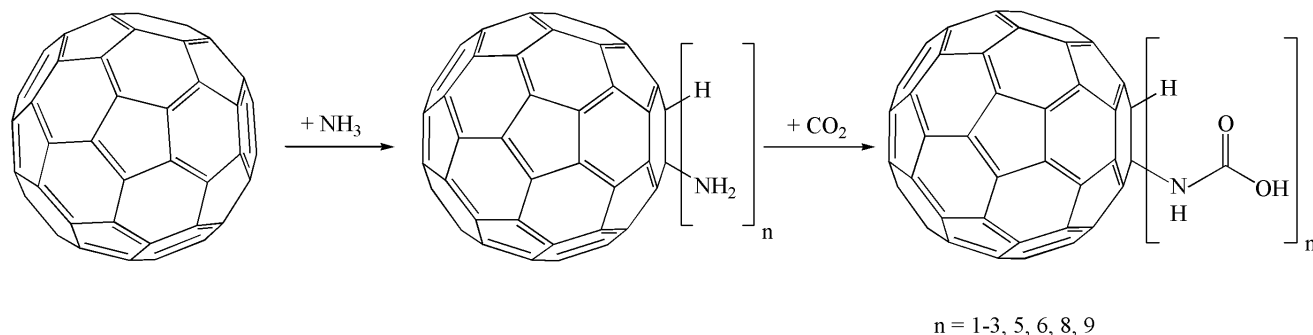
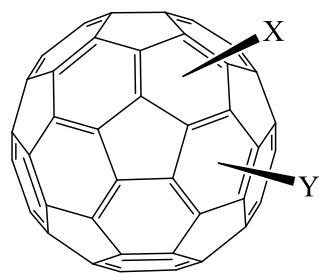


Рис. 10. Схема реакции образования amino- ($C_{60}H_n(NH_2)_n$) и карбоксамидных аддуктов C_{60} [79].

Basiuk и соавт. [80] рассчитали энергии нековалентного взаимодействия 20 протеиногенных L-аминокислот с фуллереном C_{60} в вакууме и воде (модель PCM). Для проведения расчётов применялся метод DFT, реализованный в модуле DMol³ из программного пакета Materials Studio с функционалом PBE и поправкой Гримме (поправка на нековалентные взаимодействия) на базисе DNP. Авторами проводилась оптимизация геометрии как для самих аминокислот, так и для комплексов с фуллереном. В результате проведённого исследования было установлено, что наибольшая энергии взаимодействия соответствует конъюгату C_{60} с L-метионином (в вакууме и в воде), а наименьшая энергия взаимодействия соответствует конъюгатам C_{60} с L-треонином (в вакууме) и C_{60} с L-фенилаланином (в воде).

Долинина и соавт. [81] методом DFT в программе Gaussian 03 изучили взаимодействие биологически активных 1,4-изомеров C_{60} , содержащих замещённый пролин и замещённую этильную группу (Рис. 11) с молекулами воды. Равновесные конформации рассмотренных аддуктов определялись с использованием функционала V3LYP и базиса 631G*. В результате проведённого исследования было показано, что наличие функциональных групп уменьшает площадь контакта фуллеренового кора с молекулами воды, однако, наличие нефункционализированной (гидрофобной) части молекулы фуллерена способствует образованию ассоциатов, что подтверждается экспериментально.



1. $X=C_2H_4OH$; $Y= Pro-COOMe$
2. $X=C_2H_4ONO_2$; $Y= Pro-COOMe$
3. $X=C_2H_4OH$; $Y= Pro-COOCH_2ONO_2$
4. $X=C_2H_4ONO_2$; $Y= Pro-COOCH_2ONO_2$
5. $X=C_2CH(ONO_2)CH_2ONO_2(S)$; $Y= Pro-COOMe$
6. $X=C_2H_4$ -карнозин; $Y= Pro-COOMe$

Рис. 11. Изомеры аддуктов фуллеренов, содержащих замещённый пролин и замещённую этильную группу [81].

Ganji с соавт. [82] методом DFT провели теоретическое изучение модельной системы на основе молекулы C_{60} , в котором один атом углерода заменён на атом бора, и установили механизм присоединения молекулы глицина к модифицированному бором фуллерену $C_{59}B$ и немодифицированному фуллерену C_{60} . Для проведения расчётов авторы использовали программу SIESTA и функционал PBE. В результате проведённых исследований было показано, что электронная плотность молекулы глицина смещена к фуллереновому остову при модифицировании последнего бором, тогда как в случае немодифицированного фуллерена практически не происходит смещения электронной плотности с аминокислоты.

Jalbout и соавт. [83] провели теоретическое изучение Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий металлофуллерена $Ca@C_{60}$ с молекулами аминокислот методом DFT, реализованным в программе DMol³ (функционал BLYP, базис DND). Авторами было установлено, что на поверхности фуллерена генерируется избыточный отрицательный заряд (вследствие нахождения атома кальция внутри фуллеренового остова), который играет значительную роль во взаимодействии такой системы с молекулами аминокислот.

Авторы работы [84] изучили механизм энантиоселективного присоединения L-гистидина к фуллерену C_{60} и к его производным (Рис. 12). Для расчётов были последовательно использованы методы PM3, HF и MP2. Рассчитанные авторами дипольные моменты, полная энергия, зарядовые состояния, частоты колебаний и ширина запрещённой зоны формируют представление о взаимодействии молекулы L-гистидина с фуллереном и его производными. Авторами было также установлено, что образование комплексов на основе производных фуллеренов с L-гистидином происходит за счёт водородных связей.

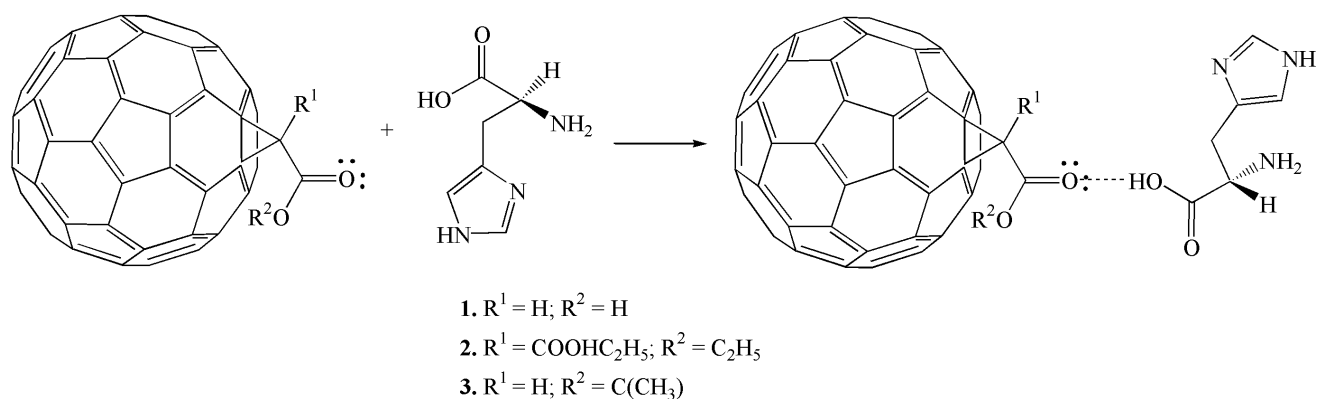


Рис. 12. Схема реакции энантиоселективного присоединения L-гистидина к фуллерену C_{60} и его производным [84].

Лужков и соавт. [85] рассчитали константы диссоциации моноаддукта C_{60} с L-аланином (C_{60} -L-Ala) в газовой фазе и в водном растворе с помощью методов HF и DFT в программе Gaussian 03 с использованием PCM модели. Авторами была рассчитана стабильность изомеров аддуктов C_{60} -L-Ala и показано, что карбоксильная группа является более сильной кислотой, чем группа CH (образованная при присоединении протонов к фуллереновому кору). При этом, водород, связанный непосредственно с фуллереновым кором, также относительно легко отщепляется и сообщает фуллереновому остову значительный отрицательный заряд. Аминогруппа аддукта C_{60} -L-Ala является электронейтральной ($pK_a(NH) = -1,44$), в то время как карбоксильная группа заряжена отрицательно в области физиологических значений pH. Расчёт констант диссоциации карбоксильной и CH-групп показал, что $pK_a(COOH) = 4,2$ и $pK_a(CH) = 5,8$. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными.

Basiuk и соавт. [86] изучили нековалентные взаимодействия олигопептидов глицина и L-аланина с фуллереном C_{60} методами DFT и молекулярной механики. Авторами было изучено влияние длины цепи пептида (содержащей до 10 аминокислот), а также различных конформаций пептидов на нековалентное взаимодействие с фуллереном. Для расчётов электронной структуры методом DFT использовались функционалы GGA-BLYP и LDA-VWN, при проведении расчётов методом молекулярной динамики использовались силовые поля AMBER, MM+. В результате проведённого исследования, авторами были рассчитаны теплоты образования комплексов пептидов с C_{60} и определены точки ближайших контактов взаимодействующих молекул.

Naderi и соавт. [87] с помощью метода DFT с функционалом B3LYP в программе Gaussian 98 были рассчитаны энергии образования комплексов фуллерена C_{36} с глицином.

Показана неустойчивость таких комплексов при взаимодействии как через атом азота, так и через атом кислорода аминокислоты.

В работах [88–95] проведены теоретические исследования молекулярной структуры, колебательных спектров, механизмов сольватации, а также оптических свойств и электропроводности растворов фуллеренолов $C_{20}(OH)_8$, $C_{60}(OH)_n$ ($n = 8, 12, 24, 36, 44$), $C_{70}(OH)_n$ ($n = 14, 16, 18, 20$).

Анализ литературы показывает, что число работ, посвящённых экспериментальному физико-химическому изучению водных растворов аддуктов лёгких фуллеренов с аминокислотами и пептидами, а также изучению фазовых равновесий в системах, содержащих указанные аддукты, невелико. Кратко остановимся на основных полученных результатах. Авторами работ [96–100] были изучены физико-химические свойства водных растворов и фазовые равновесия в системах, содержащих аддукты лёгких фуллеренов с глицином, L-аланином, L-аргинином, L-лизином, L-гидроксипролином, L-треонином. Авторами были получены концентрационные и температурные зависимости плотности, показателя преломления, электропроводности, вязкости, распределения ассоциатов по размерам и избыточных термодинамических функций.

В работах [96,101,102] проведено изучение степени ассоциации производных фуллеренов в зависимости от концентрации и природы заместителя для водных растворов следующих производных фуллеренов: аддуктов C_{60} с аминокислотами (глицин, L-аланин) и пептидами (глицил-L-глицин, глицил-L-аланин, глицил-L-валин и L-аланил-L-аланин), содержащих свободную карбоксильную группу [96]; метиловых эфиров пептидсодержащих малеимидофуллеренов (*N*-малеимидофуллеренил-L-валил-L-валин, *N*-малеимидофуллеренил-DL-аланил-L-лейцин, *N*-малеимидофуллеренил-DL-аланил-DL-аланин, *N*-малеимидофуллеренилглицил-L-валин, *N*-малеимидофуллеренил-L-валил-L-валил-L-валин) [101]; моно- и дизамещённых аддуктов C_{60} с пропионовой, γ -аминомасляной и ω -аминокапроновой кислотами (натриевая соль *N*-моногидрофуллеренил- ω -аминокапроновой кислоты, *N*-моногидрофуллеренил- γ -аминобутират натрия, L-*N*-моногидрофуллеренилпропионат натрия, *N*-2-гидроксиэтилфуллеренил- ω -аминокапроат натрия, метил *N*-2-гидроксиэтилфуллеренил- ω -аминокапроат, *N*-2-гидроксиэтил фуллеренил- γ -аминобутират натрия, метил L-*N*-2-гидроксиэтилфуллеренилпропионат, метил L-*N*-2-нитроксиэтилфуллеренилпропионат,

2-нитроксиэтил L-N-2 нитроксиэтилфуллеренпропионат, 2-нитроксиэтил L-N-2 гидроксиэтилфуллеренил пропионат) [102].

Тимофеева с соавт. [103] провела изучение степени ассоциации аддуктов C_{60} с аминокислотами и пептидами (*N*-моногидрофуллеренил-DL-серин, *N*-моногидрофуллеренил-L-аргинин, *N*-моногидрофуллеренил-DL-аланил-DL-аланин и *N*-моногидрофуллеренил-L-аланин) в водных растворах в зависимости от pH, ионной силы, концентрации и природы заместителя.

В работе [104] проведено изучение теплоёмкостей водных растворов аддуктов фуллерена C_{60} с аминокислотами и пептидами (DL-серин, L-аланин, L-аргинин, DL-аланил-DL-аланин и глицил-L-аргинин).

В нашей научной группе проведено комплексное изучение растворов и фазовых равновесий в системах, содержащих аддукты индивидуальных лёгких фуллеренов с L-аргинином, L-лизином, L-гидроксипролином, L-треонином [97–100,105–107]: изучены концентрационные и температурные зависимости плотности, показателя преломления, электропроводности, вязкости, распределения ассоциатов по размерам, избыточных термодинамических функций.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

(1) установлена высокая совместимость аддуктов фуллеренов с аминокислотами с водой и водными растворами. В качестве примера на Рис. 13 представлена температурная зависимость растворимости в бинарной системе аддукт C_{60} с L-аргинином ($C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$) – H_2O в интервале температур 293,15–333,15 К [105]. Из представленной на Рис. 13 зависимости растворимости от температуры хорошо видно, что растворимость аддукта варьируется от десятков до сотен граммов в литре (в зависимости от температуры).

На Рис. 14 для примера приведена изотерма растворимости в тройной системе фуллеренол $C_{60}(OH)_{22-24}$ – NaCl – H_2O при 25°C, полученная методом изотермического насыщения в ампулах [108]. Видно, что диаграмма состоит из двух ветвей, отвечающих кристаллизации кристаллогидрата фуллеренола ($C_{60}(OH)_{22-24} \cdot 30H_2O$) и безводного хлорида натрия, и содержит одну нонвариантную точку эвтонического типа (точка E на Рис. 14), отвечающую совместному насыщению обеими вышеуказанными твёрдыми фазами. При этом на ветви кристаллизации фуллеренола $C_{60}(OH)_{22-24}$ наблюдается эффект высаливания, а на ветви кристаллизации хлорида натрия – всаливания.

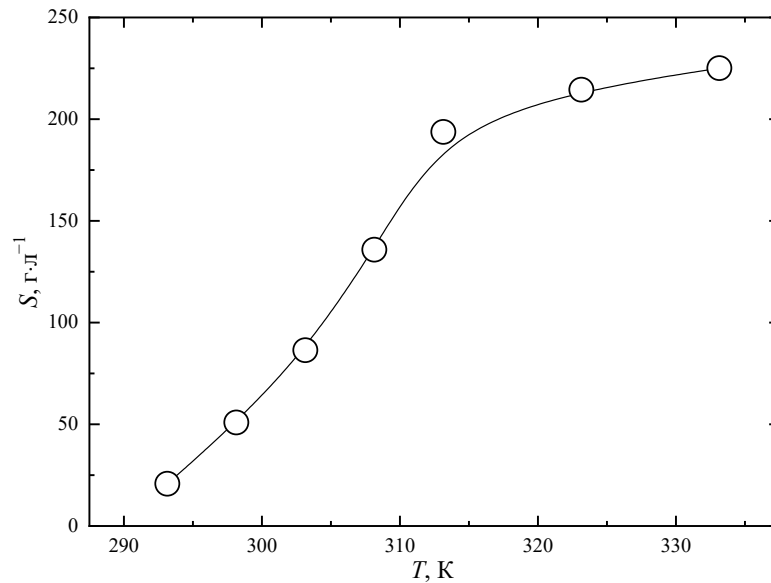


Рис. 13. Температурная зависимость растворимости аддукта C_{60} с L-аргинином ($C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$) в воде в интервале температур 293,15–333,15 К [105].

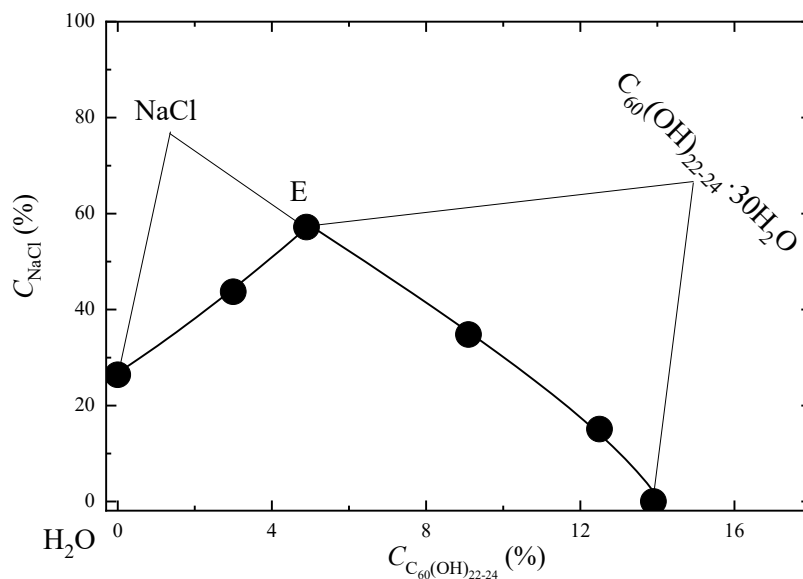


Рис. 14. Изотерма растворимости в тройной системе $NaCl - C_{60}(OH)_{22-24} - H_2O$ при 25°C [108].

(2) в разбавленных растворах водорастворимые аддукты фуллеренов с аминокислотами имеют, как правило, большие по модулю отрицательные парциальные объёмы, что свидетельствует об уплотнении и структурировании растворов [5,99,100,106,109]. В качестве примера, на Рис. 15 показана зависимость парциального молярного объёма аддукта C_{60} -Gly ($C_{60}(C_2H_4NO_2)_4H_4$) от его мольной доли;

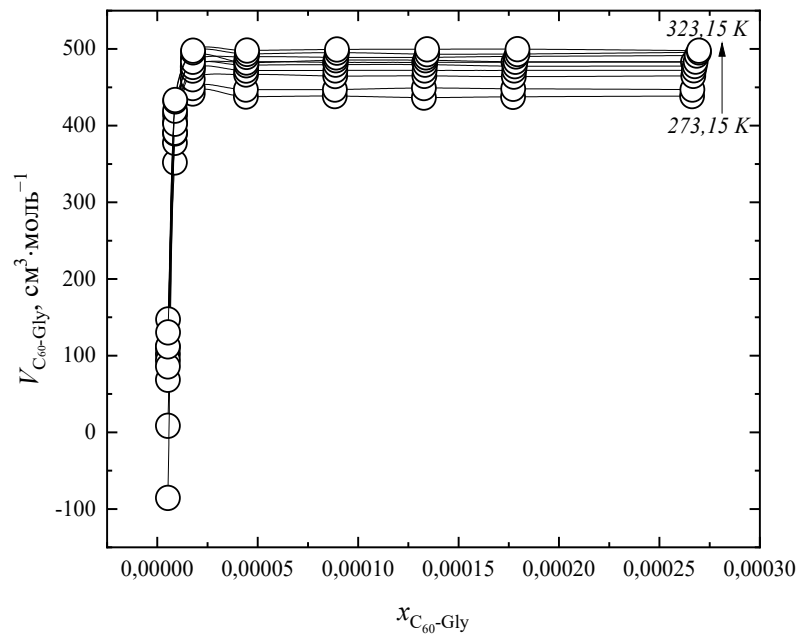


Рис. 15. Зависимость парциального молярного объёма C_{60} -Gly ($V_{C_{60}\text{-Gly}}$) от его мольной доли в температурном диапазоне 278,15–323,15 К [109].

(3) в работах [99,105,106] показано, что аддукты фуллеренов с аминокислотами в водных растворах являются сравнительно слабыми электролитами. В частности, $pK_D^{\text{терм}}$ ($C_{60}\text{-Arg}$) = 7,2 [105]; $pK_D^{\text{терм}}$ ($C_{60}\text{-Thr}$) [106] = 4,87; $pK_D^{\text{терм}}$ ($C_{60}\text{-Lys}$) = 3,7 [99];

(4) установлено [99,109], что водные растворы аддуктов фуллеренов с аминокислотами сильно ассоциированы (размеры ассоциатов составляют от десятков нм до тысяч нм в диапазоне концентраций от 0,01 до 10 г·л⁻¹). В качестве примера на Рис. 16 приведена концентрационная зависимость распределения по размерам ассоциатов C_{60} -Gly ($C_{60}(C_2H_4NO_2)_4H_4$) [109]. В растворе отсутствуют мономерные молекулы C_{60} -Gly с линейными размерами около 2 нм во всём диапазоне изученных концентраций. В диапазоне концентраций $C = 0,01\text{--}0,3$ г·дм⁻³ в растворе присутствуют ассоциаты первого порядка с линейным размером 30–50 нм. Ассоциаты второго порядка с линейным размером 100–400 нм наряду с ассоциатами первого порядка детектированы в диапазоне концентраций $C = 0,3\text{--}0,5$ г·дм⁻³. В более концентрированных растворах ($C = 0,5\text{--}10$ г·дм⁻³) помимо ассоциатов второго порядка присутствуют ассоциаты третьего порядка, линейный размер которых составляет 1–2 мкм.

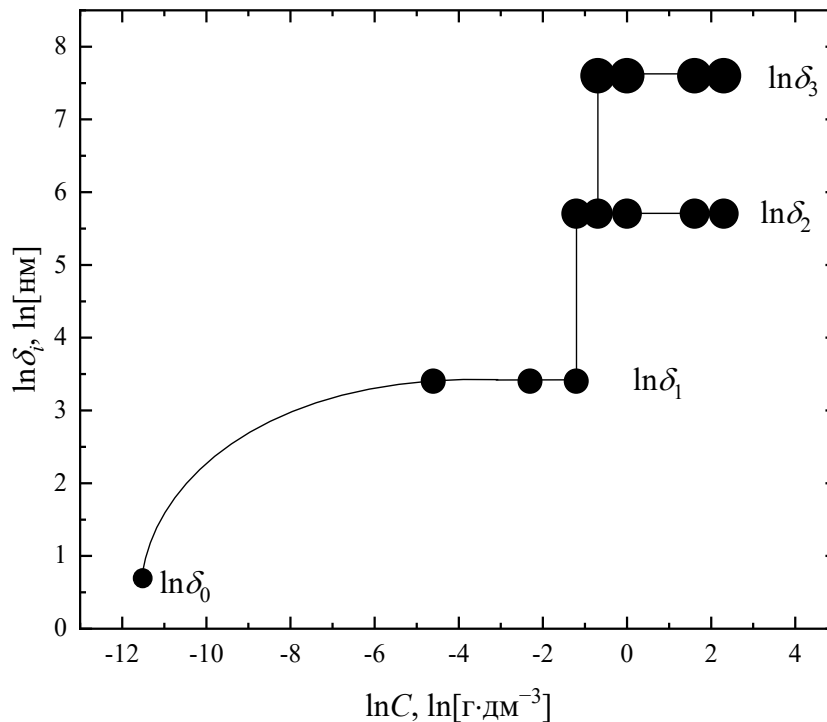


Рис. 16. Концентрационная зависимость распределения по размерам ассоциатов C_{60} -Gly в водных растворах при 298,15 К. C — объёмная концентрация C_{60} -Gly [109].

1.6. Биологическая активность фуллеренов и их аддуктов

1.6.1 Токсичность фуллеренов и их аддуктов

Первые исследования токсичности фуллеренов появились в 1995–1996 гг. Было установлено, что фуллерен C_{60} в концентрации до 1 мг/мл практически не влияет на жизнеспособность лейкоцитов человека при инкубации в течение 5 ч; при этом, через 24 ч отмечалось снижение жизнеспособности лейкоцитов на 35 % [110]. Внутривентриальное введение самцам мышей Swiss высокой дозы (около 4-5 г/кг) суспензии фуллерена C_{60} в физиологическом растворе, стабилизированного Твином-80 и натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы, не вызывало ни гибели мышей, ни каких-либо изменений в поведении животных в течение 8 недель наблюдения за ними [111].

В исследовании [112] крысам-самцам внутрижелудочно вводили фуллерен C_{60} в виде водной дисперсии, содержащей 1% крахмала и 0,1% Твин-80, в течение 1 и 30 дней в суточных дозах 2000 и 250 мг/кг массы тела, соответственно. Статистически значимых различий в гематологических и биохимических показателях контрольной и экспериментальной групп после однократного и многократного введения препарата не обнаружено. В период проведения экспериментов летальности животных не

наблюдалось. При вскрытии патоморфологических изменений во внутренних органах не зафиксировано. Методом ВЭЖХ после экстракции толуолом фуллерен был обнаружен в желудке, тонком кишечнике, печени, легких, селезенке, почках и крови. Количество обнаруженного фуллерена по сравнению с введенными дозами значительно меньше, что свидетельствует о его выведении из организма. Авторы предполагают, что наночастицы фуллеренов проникают из желудочно-кишечного тракта крыс в кровяное русло и затем транспортируются во вторичные органы без выраженного токсического действия в условиях эксперимента.

В работе [113] установлено, что пероральное введение крысам фуллерена C_{60} , растворённого в оливковом масле (0,8 мг/мл), в повторяющихся дозах (1,7 мг/кг массы тела) не только не вызывает хронической токсичности, но почти удваивает продолжительность их жизни. Эффекты растворов C_{60} в оливковом масле в экспериментальной модели CCl_4 -индуцированного токсического гепатита у крыс свидетельствуют о том, что влияние C_{60} на продолжительность жизни связано с подавлением окислительного стресса.

В работе [114] были изучены механизмы цитотоксичности суспензии фуллерена C_{60} в воде, а также фуллеренола $C_{60}(OH)_n$ (состав фуллеренола не уточняется) в отношении клеточных культур фибросаркомы мышей, глиомы крыс и глиомы человека. В отличие от фуллеренола, который проявляет в основном антиоксидантную, цитопротекторную и невысокую проапоптотическую активность при концентрации $1000 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, C_{60} в виде суспензии, по-видимому, обладает сильной прооксидантной активностью, приводящей к быстрой некротической гибели клеток при концентрации $1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

В работе [115] авторы отмечали статистически значимое снижение жизнеспособности клеток эпидермальных кератиноцитов человека при 24 ч инкубации с фуллеренолом $C_{60}(OH)_{32}$ ($C = 42,5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$).

Результаты исследования [116] действия аддукта фуллерена C_{60} с модифицированной глутаминовой кислотой GluEG в течение 12 и 24 ч на клеточную линию HeLa (клеточная линия карциномы шейки матки человека) показали, что C_{60} -GluEG обладает низкой цитотоксичностью и высокой биосовместимостью.

В обзоре публикаций 2004 – 2012 гг. [117] представлена сравнительная оценка токсичности C_{60} и его аддуктов на клетки и ткани млекопитающих *in vitro* и *in vivo*. Было

показано, что цитотоксическое действие фуллерена C_{60} при его облучении обусловлено гиперпродукцией АФК, тогда как при отсутствии облучения токсическое действие фуллерена C_{60} заключается в повреждении клеточных мембран, реорганизации цитоскелета и иницировании аутофагического переваривания клеточных компонентов. Тем не менее, как отмечают авторы, цитотоксическое и цитопротекторное действие дисперсий C_{60} и его аддуктов зависит от концентрации и условий проведения эксперимента.

1.6.2. Биодegradация фуллеренов

Известно, что в биологических системах фуллерен образует эпоксиды, полуацетали и гидроксильированные аддукты [118–121]. При биодegradации фуллеренов преимущественно происходит промежуточное образование фуллеренолов [122–124].

Под действием пероксидаз, в частности, миелопероксидазы, эозинофилпероксидазы и лактопероксидазы, в условиях *in vitro* может происходить глубокая дegradация молекул фуллерена C_{60} [125,126]. Наноразмерные дисперсии C_{60} , полученные путём смешивания C_{60} в растворе толуола с водой с использованием ультразвука, подвергались биодegradации [127]. Реакцией фуллерена с гипохлоритом, генерируемым миелопероксидазой, приводит к разрушению ядра фуллерена, признаками которого являются исчезновение характерных для фуллеренового ко́ра полос поглощения в УФ-, видимой- и ИК- областях спектра [126].

Фотодegradация фуллерена C_{60} под действием реактива Фентона изучалась в работе [128]. Первой стадией процесса было гидроксильирование молекулы фуллерена, последующие превращения которого приводят к полициклическим насыщенным аддуктам при раскрытии ко́ра. Образующиеся полициклические фрагменты при раскрытии кольца приводят к образованию различных гидроксилзамещённых α,ω -дикарбоновых кислот, декарбоксилирование которых приводит к образованию уксусной кислоты, этанола, пропилена и других продуктов.

1.6.3. Фотосенсибилизация и прооксидантные свойства

В водной среде производные фуллеренов склонны к образованию ассоциатов вследствие гидрофобности фуллеренового ко́ра. Ассоциаты более интенсивно накапливаются опухолевыми клетками, по сравнению с нормальными тканями за счёт повышенной проницаемости сосудов, питающих опухоль, и относительной незрелости лимфатической системы [1]. Благодаря фотодинамической активности фуллерены и их

аддукты являются потенциальными противоопухолевыми агентами при лечении методом фотодинамической терапии (ФДТ). ФДТ — метод локальной световой активации фотосенсибилизатора, накапливающегося в опухоли и в присутствии тканевого кислорода, приводящего к развитию фотохимических реакций, разрушающих опухолевые клетки [129].

В работе [34] было изучено биологическое действие аддуктов фуллерена C_{60} с фолацином, L-фенилаланином и L-аргинином в отношении опухолевых клеток линии HeLa. Было показано, что при облучении данных клеток видимым светом наблюдалось снижение митохондриального мембранного потенциала, жизнеспособности клеток, активности ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, которые в конечном итоге приводят к активации каспазы-3 и запуску программы апоптоза.

В работе [45] изучалось биологическое действие аддуктов $C_{60}(NH_2CH_2COOH)_n$, полученных в различных условиях, на клеточные линии HeLa и Lm8 (клеточная линия остеосаркомы мыши). В результате исследований установлено, что аддукт C_{60} -Gly при облучении ($\lambda = 500\text{--}600$ нм) вызывает дозозависимую гибель клеточной линии Lm8 и индуцирует апоптоз клеточной линии HeLa. Под действием света C_{60} -Gly переходит из возбуждённого синглетного состояния в возбуждённое триплетное. Затем синглетный кислород мгновенно вступает в реакцию с белками, нуклеиновыми кислотами и фосфолипидами мембран, что приводит к повреждению макромолекул, клеточных мембран и гибели клеток.

Авторами [49] в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что аддукты фуллерена C_{60} с L-фенилаланином, L-серином и β -аланином и γ -фенилмасляной кислотой ингибируют пролиферацию клеток глиобластомы и уменьшают скорость её роста у рыб *Danio rerio* при искусственном освещении день-ночь. Было установлено, что аддукт фуллерена C_{60} с L-фенилаланином ингибирует рост глиобластомы, не замедляя при этом восстановление нейронов и не влияя на нейронные стволовые клетки.

В работе [130] аддукты фуллерена C_{84} с двумя, тремя и четырьмя остатками малоновой кислоты были протестированы в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ на клеточной линии HeLa. Из всех исследованных аддуктов наибольшую эффективность показал аддукт фуллерена с четырьмя остатками малоновой кислоты. Это соединение снижало 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.

В работе [131] в качестве фотосенсибилизаторов для фотоинактивации *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) были исследованы фуллерен-порфириновые диады; исследования *in vitro* показали их фототоксическое действие. Фотосенсибилизирующая способность водорастворимых аминоксидов фуллеренов к инактивации *S. Aureus* была исследована в работе [132]. В результате исследования *in vitro* наблюдалась фотоиндуцированная гибель *S. aureus* в присутствии 0,5 мкМ фуллеропирролидина C₆₀. Результаты, полученные авторами данной работы, указывают на возможность использования фуллеропирролидина C₆₀ для фотоинактивации микробных клеток.

В работе [133] исследовалась эффективность в качестве фотосенсибилизаторов водорастворимых карбоксифуллеренов: ди-, трис-, квадромалонатов C₆₀ и C₇₀. Оценку проводили по их фотодинамическому действию на клетки линии HeLa. Все соединения потенциально применимы для фотодинамической терапии; в работе был изучен механизм их фототоксичности. Было показано, что трисмалонат C₇₀ подвергается эндоцитозу клетками линии HeLa в виде небольших кластеров, которые накапливаются преимущественно в эндосомоподобных органеллах. Повышенная эффективность трисмалоната C₇₀ может быть объяснена дезагрегацией наночастиц в органеллах с образованием мелких ассоциатов, вплоть до отдельных молекул [134]. Прямые измерения размеров частиц трёх карбоксифуллеренов C₇₀ методом динамического светорассеяния в концентрации 2,5 мкМ в питательной среде показали, что трисмалонат C₇₀ образует частицы с гидродинамическим диаметром, меньшим, чем ди- и квадромалонаты C₇₀. Меньшие размеры агрегатов могут способствовать образованию АФК и ускорять фотоиндуцированную гибель клеток за счёт большей поверхности.

Авторы работ [135,136] изучали возможность использования водорастворимых катионных производных фуллеренов в качестве фотосенсибилизаторов для антимикробной ФДТ для уничтожения возбудителей инфекций: бактерий, простейших, грибов и вирусов. Антимикробное действие катионных производных фуллеренов оценивали *in vitro* при проведении ФДТ путём добавления к клеточным суспензиям грамположительных метициллинрезистентных *S. aureus*, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и гриба *Candida albicans*. Результаты исследования демонстрируют

высокую активность катионных производных фуллеренов, причём наибольшая активность характерна для соединений с более высокой растворимостью и меньшей склонностью к образованию ассоциатов.

1.6.4. Антиоксидантные и цитопротекторные свойства

Свободнорадикальные процессы являются неотъемлемой частью обмена веществ во всех живых системах. С одной стороны, избыточное образование свободных радикалов приводит к повреждению клеточных структур и может привести к развитию различных заболеваний. С другой стороны, свободные радикалы, генерируемые фагоцитами, являются важным фактором неспецифической иммунной защиты. Кроме того, свободнорадикальные процессы участвуют в регуляции многих важных биологических процессов, включая сигнальную трансдукцию, пролиферацию клеток и апоптоз [137].

Из всех аддуктов фуллеренов наиболее изученными являются фуллеренолы; исследованию их антиоксидантных и цитопротекторных свойств посвящено больше всего работ.

Авторами работы [138] была продемонстрирована способность фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ захватывать нитроксильный радикал. Предварительное введение крысам $C_{60}(OH)_{24}$ предотвращало снижение активности каталазы, глутатионтрансферазы и глутатионпероксидазы, вызванное нитроксильным радикалом. Фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ проявлял свойства антиоксиданта, снижая интенсивность перекисного окисления липидов. Эффективность фуллеренола сравнима с известным антиоксидантом ионолом.

В работе [139] для изучения возможных механизмов защитного действия фуллеренола использовалась CCl_4 -индуцированная модель гепатотоксичности и нефротоксичности у крыс линии Sprague-Dawley. Крысам вводили фуллеренол $C_{60}(OH)_{22-24}$ (0, 1, 1,5 и 5 мг/кг сут) внутривенно или внутривентально за 3 дня до воздействия CCl_4 . Через 24 ч после воздействия CCl_4 оценивали протекторный эффект фуллеренола с использованием биомаркеров сыворотки крови и гомогенатов тканей. Воздействие CCl_4 значительно повышало сывороточную активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, концентрацию мочевины и креатинина в крови. Существенно повышался уровень малонового диальдегида, в то время как отношение восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону в гомогенатах тканей было снижено. Фуллеренол, являясь ловушкой для свободных радикалов, оказывает нефро- и гепатопротекторное действие, защищая клетки печени и

почек от токсического действия CCl_4 . Протекторное действие фуллеренола заключалось в увеличении соотношения восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону, что указывает на то, что фуллеренол защищает ткани и органы от окислительного стресса.

Хорошо известно, что доксорубин является противоопухолевым препаратом, но его применение ограничено из-за его низкой селективности и кардиотоксичности. В цикле работ [140–143] в экспериментах *in vivo* была показана потенциальная защитная функция фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ при токсическом воздействии доксорубина на клетки печени, почек и сердца. Авторы установили, что фуллеренол проявляет свойства гепато-, кардио- и нефропротектора. В работе [144] показано, что применение конъюгата доксорубина с фуллереном C_{60} в экспериментах *in vivo* на мышах с карциномой легкого Льюиса приводило к увеличению продолжительности жизни в 2,5 раза и уменьшению объема опухоли на 63%, по сравнению с индивидуальным доксорубином.

Авторы работы [145] сравнили антиоксидантное действие фуллеренола $C_{60}(OH)_{18-20}$ и аскорбиновой кислоты. Было установлено, что оба соединения ингибируют пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов крыс и гладкомышечных клеток коронарной артерии человека. Примечательно, что фуллеренол в большей степени, чем аскорбиновая кислота, ингибировал аллоксан-индуцированное образование супероксидных анион-радикалов и дозозависимо снижал активность цитозольной протеинкиназы C и тирозинпротеинкиназы.

В работе [146] продемонстрировано, что фуллеренол в условиях *in vitro* блокирует действие пероксида водорода, который ингибирует передачу сигналов в нейронах гиппокампа крыс.

Авторы работы [43] впервые показали корреляционную зависимость между развитием цитомегаловирусной инфекции и интенсивностью перекисного окисления липидов в инфицированных клетках фибробластов лёгкого человека. Было установлено, что аддукты фуллерена C_{60} с натриевыми солями γ -аминомасляной и ϵ -аминокапроновой кислот уменьшают скорость образования малонового диальдегида в митохондриях.

1.6.5. Радиопротекторные свойства

В работе [147] сравнивали эффективность фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ ($C = 10$ и 100 мг/кг) и стандартного радиопротектора амифостина ($C = 300$ мг/кг) в защите крыс от воздействия ионизирующего излучения. Было установлено, что радиозащитное действие фуллеренола проявлялось в селезёнке, тонкой кишке и лёгких. В свою очередь,

амифостин превосходил фуллеренол по радиопротекторным свойствам при защите печени, сердца и почек. Фуллеренол, по сравнению с амифостином, более эффективно предотвращал радиационно-индуцированное снижение уровня лейкоцитов.

В работе [148] изучалась способность фуллеренола $C_{60}(OH)_{36}$ уменьшать повреждения, вызванные высокоэнергетическими электронами при действии на мембраны эритроцитов человека. Было обнаружено, что фуллеренол препятствовал пострадиационному гемолизу, оттоку калия и окислению тиоловых групп, а также предотвращал повышение текучести мембран и изменения конформаций белков. Предположительно, радиозащитные свойства фуллеренола обусловлены его способностью поглощать АФК.

В работе [149] исследовался захват свободных радикалов и цитопротекторное действие фуллеренолов $C_{60}(OH)_{6-12}$, $C_{60}(OH)_{32-34}$ и $C_{60}(OH)_{44}$ с использованием кератиноцитов человека (NaCaT), подвергнутых действию УФ-облучения. В результате УФ-облучения в клетках NaCaT быстро повышался уровень окислительного стресса, происходило образование циклобутанпиримидиновых димеров в молекуле ДНК и конденсация хроматина. Установлено, что повреждения NaCaT, вызванные УФ-облучением подавляются всеми исследованными фуллеренолами, цитопротекторное действие которых связано с поглощением АФК.

1.6.6. Взаимодействие с белками

Фуллерены образуют надмолекулярные комплексы с белками, как было показано в работах [150,151]. В частности, в работе [151] был проведён докинг карбоксифуллерена C_3 с четырьмя белками (протеаза ВИЧ, фуллерен-специфические антитела, ЧСА и БСА) и была обнаружена высокая степень гомологии сайтов связывания. На Рис. 17а приведен общий вид комплекса ЧСА-карбоксифуллерен. На Рис. 17б показано взаимодействие карбоксифуллерена с аминокислотным фрагментом Trp214 субдомена IIА ЧСА.

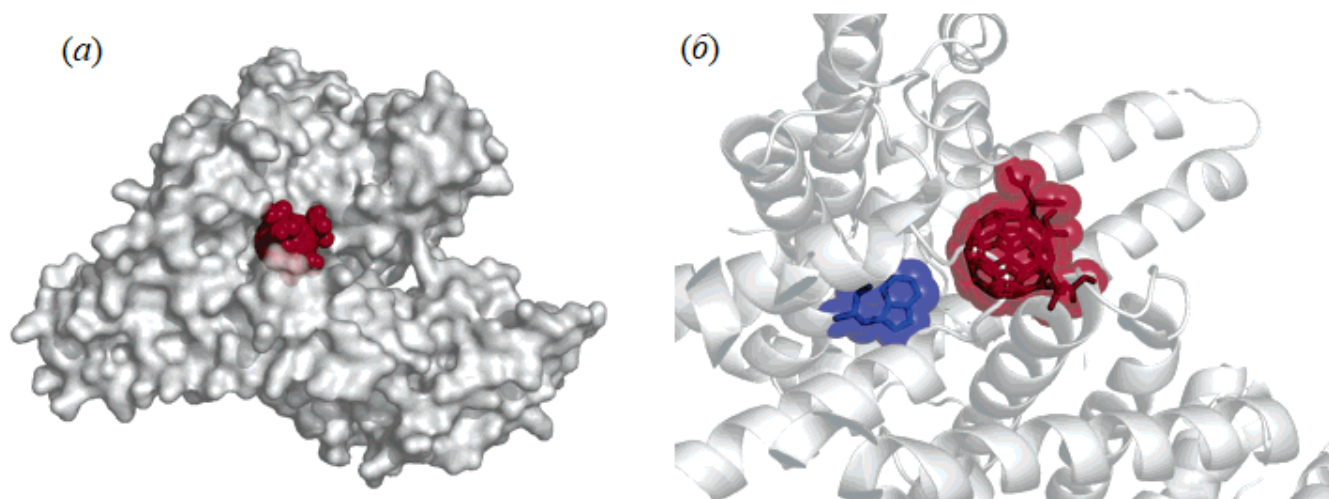


Рис. 17. Общий вид комплекса ЧСА с карбоксифуллереном C_3 (а); взаимодействие карбоксифуллерена с аминокислотным фрагментом Trp214 субдомена ПА ЧСА (б) [150].

В работе [152] было исследовано взаимодействие белков БСА и γ -глобулина с фуллеренолом $C_{60}(OH)_{44}$. Была обнаружена способность $C_{60}(OH)_{44}$ эффективно тушить внутреннюю флуоресценцию белков по динамическому механизму; рассчитанные значения констант связывания из данных по тушению флуоресценции имеют порядок 10^4 . Было установлено, что связывание фуллеренола с белками является экзотермическим процессом.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Синтез и идентификация аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr

Для проведения синтеза аддуктов C₇₀ с L-лизином (C₇₀-Lys) и L-треонином (C₇₀-Thr) использовался фуллерен C₇₀ (чистота 99,9 мас. %) производства ЗАО «ИЛИП» (г. Санкт-Петербург), L-лизин (Panreac, ХЧ), L-треонин (Panreac, ХЧ), толуол (Вектон, ОСЧ 22-5), деионизованная вода (18 МОм·см), гидроксид натрия (Вектон, хч), этанол (Росбио, 95 %). Синтез аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr проводился по методике, разработанной ранее в нашей научной группе (Рис. 18).

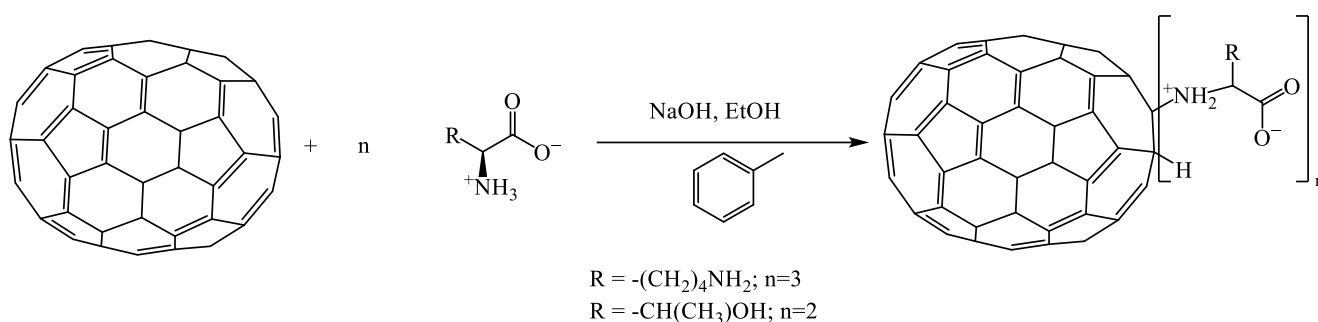


Рис. 18. Схема синтеза аддуктов фуллерена C₇₀ с аминокислотами.

Навески аминокислоты (0,1 моль) и NaOH (0,2 ммоль) растворяли в 30 мл воды. Щёлочь использовалась для создания сильнощелочной среды и перевода аминокислоты в солевую форму. Затем к раствору добавляли насыщенный раствор фуллерена C₇₀ в толуоле (1 г в 600 мл) и этанол (200 мл) для обеспечения взаимной растворимости фаз. Далее полученную реакцию смесь перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение семи дней. Из реакционной смеси отгоняли растворитель на ротационном испарителе и образовавшийся осадок растворяли в воде. Затем отфильтровывали раствор от нерастворимых примесей реагентов. Далее проводили перекристаллизацию аддукта фуллерена из этанола. После этого полученный осадок был промыт этанолом до нейтральной реакции среды (pH = 7). Полученные соединения высушивали при 60 °С. Выход полученных продуктов составил ~85 %.

Идентификация полученных соединений проводилась при помощи комплекса физико-химических методов: ¹³C ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 WB, США) методами CP/MAS (кросс-поляризация/вращение под магическим углом) и DE (прямое возбуждение), ИК-спектроскопии (Nicolet 8700, США), УФ-спектроскопии (SOLAR CM 2203, Беларусь), термогравиметрического анализа (NETZSCH TG 209 F1 Libra, Германия), элементного анализа C, H, N (Euro EA-3000, Италия) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, Shimadzu LC-20 Prominence, Япония).

2.2. Физико-химическое изучение растворов, содержащих аддукты C₇₀-Lys и C₇₀-Thr

Водные растворы C₇₀-Lys и C₇₀-Thr готовили с использованием аналитических весов (Sartorius CP224S, США, точность 10⁻⁷ кг). Для проведения физико-химических исследований использовалась деионизированная вода. Очистку воды проводили с использованием установки для получения деионизированной воды Millipore Simplicity UV (США).

Измерения плотностей растворов проводилось на анализаторе плотности Anton Paar DSA 5000 (Австрия). Повторяемость измерений — 1·10⁻⁶ г·см⁻³, точность измерения плотности — 5·10⁻⁶ г·см⁻³. Точность измерения температуры — 0,01 К. Калибровку прибора проводили по воде и сухому воздуху.

Значения вязкостей бинарных систем C₇₀-Lys – H₂O и C₇₀-Thr – H₂O в интервале температур (293,15 – 333,15) К были получены на микровискозиметре Lovis 2000 M Anton Paar (Австрия). Капилляр калибровали с использованием деионизированной воды, заполняли образцом и затем термостатировали в течение 15 мин. Точность контроля температуры — 0,02 К, точность определения вязкости 0,5 %.

Концентрационные зависимости показателей преломления водных растворов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr при температуре 298,15 К получали с использованием автоматического многоволнового рефрактометра Abbemat WR / MW Anton Paar (Австрия) при длине волны 589,3 нм. Точность измерения температуры — 0,03 К, точность определения показателя преломления — 4·10⁻⁵.

Прибор Cyber Scan PC-300 (США) применялся для определения удельной электропроводности водных растворов фуллереновых аддуктов. Относительная погрешность определения удельной электропроводности составляла 1 %.

Исследование поверхностных свойств водных растворов фуллереновых аддуктов при 298,15 К проводилось с использованием различных физико-химических методов, таких как метод пластины Вильгельми, угловая микроскопия Брюстера (ВАМ) и атомно-силовая микроскопия (АСМ). Морфологию плёнок, образующихся на поверхности водных растворов аддуктов, исследовали *in situ* с помощью углового микроскопа Брюстера (NFT, Германия), оснащённого гелий-неоновым лазером мощностью 10 мВт. Дополнительно была изучена морфология плёнок аддуктов, переносимых с поверхности раствора на твёрдую подложку методом Ленгмюра — Шефера. Эксперименты

проводились на сканирующем зондовом микроскопе Nano Scope IV (Digital Instruments, США).

Измерения распределения наночастиц C₇₀-Lys и C₇₀-Thr по размерам и электрофоретической подвижности в водных растворах проводили на приборе Malvern Zetasizer 3000 (Великобритания). Значения индекса полидисперсности составляли 0,24–0,47.

2.3. Изучение биосовместимости аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr

Исследования были одобрены Локальным этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, экспериментальные процедуры соответствовали руководящим принципам университета и этическим стандартам [153].

2.3.1. Гемосовместимость

2.3.1.1. Спонтанный гемолиз

Изучение спонтанного гемолиза проводили путём измерения оптической плотности супернатантов при длине волны 540 нм с помощью микропланшетного ридера Allsheng AMR-100 (Китай). Для приготовления образцов готовили смесь, содержащую 1 мл раствора аддукта фуллерена C₇₀-Lys или C₇₀-Thr ($C = 1–100$ мкМ) и 1 мл взвеси эритроцитов в изотоническом растворе NaCl. После этого образцы инкубировали при $37 \pm 0,2$ °C в течение 1 и 3 ч, а затем центрифугировали в течение 1 мин при 3000 об/мин.

2.3.1.2. 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 (BD, США), содержащие в качестве стабилизатора цитрат натрия ($C = 0,129$ М) в соотношении цитрат натрия: кровь — 1:9. Стабилизированную кровь центрифугировали 7 мин при комнатной температуре и 1000 об/мин (150g). Часть богатой 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 стандартизовали до получения концентрации тромбоцитов $(2,00–2,50) \cdot 10^{11}/л$ с учётом добавления тестируемых веществ.

Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме исследовали с использованием следующих индукторов агрегации: АДФ (конечная концентрация – $C = 10$ мкМ), коллагена (конечная концентрация $C = 2$ мг·мл⁻¹) и адреналина (конечная концентрация $C = 10$ мкг·мл⁻¹), (Chrono-Par Reagents, Chrono-Log Corporation, США). Влияние аддуктов фуллерена на индуцированную агрегацию тромбоцитов определяли, смешивая в кюветах 270 мкл богатой тромбоцитами плазмы и 30 мкл раствора исследуемого вещества при конечной концентрации 5, 10, 25, 50, 75 и 100 мкМ, соответственно. Индукторы вносили в кюветы через 5 мин после инкубации смеси. Агрегацию регистрировали до выхода кривой на плато. Данные представляли в виде «среднее ± стандартная ошибка среднего».

2.3.1.2. Плазменно-коагуляционный гемостаз

Влияние аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr на плазменно-коагуляционный гемостаз было изучено при добавлении раствора тестируемого вещества в плазму в тестах АПТВ (активированное парциальное тромбопластиновое время) и ПВ (протромбиновое время). Использовались наборы реагентов для определения АПТВ и ПВ (Технология-Стандарт, Россия). Измерения проводили на коагулометре АПГ2-02-П (ЭКМО, Россия). Для проведения исследований использовали коммерческую плазму здоровых доноров (Технология-Стандарт, Россия). Для каждой концентрации аддуктов проводилось три измерения. Для этого смешивали 50 мкл плазмы и 50 мкл раствора вещества при конечной концентрации 5, 10, 25, 50, 75 и 100 мкМ, инкубировали при 37 °С в течение 60 с и, в соответствии с протоколом исследования, определяли время образования сгустка на анализаторе в тестах АПТВ и ПВ.

2.3.1.3. Связывание с альбумином

Изучение связывания аддуктов фуллерена с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА; Биолот, Россия) проводили на спектрофлуориметре Solar (Беларусь). Регистрация спектров эмиссии осуществлялась в диапазоне длин волн 310–450 нм и интервале температур 298,15–318,15 К; длина волны возбуждения составляла 290 нм. Концентрация ЧСА составляла 3 мкМ, концентрация аддуктов фуллерена C₇₀ варьировалась в диапазоне $C = 0,3–1,5$ мкМ с шагом 0,3 мкМ и в диапазоне $C = 6,0–24,0$ мкМ с шагом 3,0 мкМ. Измерения проводились в отсутствие и в присутствии маркеров сайтов связывания, в качестве которых были использованы варфарин (Sigma, США),

ибупрофен (Sigma, США), дигитонин (Sigma, США) с конечной концентрацией $C = 3$ мкМ.

2.3.1.4. Эстеразная активность

Для оценки влияния аддуктов фуллеренов на эстеразную активность ЧСА были приготовлены растворы: *n*-нитрофенилацетат (НФА; Sisco Research Laboratories, Индия) в этаноле, ЧСА, C_{70} -Lys и C_{70} -Thr в фосфатно-солевом буфере (PBS; Панэко, Россия) с $pH=7,02$. После смешения растворов, финальная концентрация НФА составила 100 мкМ, ЧСА 3 мкМ, C_{70} -Lys и C_{70} -Thr от 0 до 24 мкМ. Скорость гидролиза НФА оценивали по образованию *n*-нитрофенола спектрофотометрическим методом при длине волны 405 нм. В результате были получены кинетические зависимости реакции гидролиза НФА ЧСА в отсутствие и в присутствии аддуктов фуллеренов.

2.3.2. Антирадикальная активность

Исследование антирадикальной активности аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ; Sigma, США) проводили на спектрофотометре Thermo Scientific Evolution 300 (США). Для этого был приготовлен раствор ДФПГ в этаноле с концентрацией (130 мкМ), растворы аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr в воде с концентрацией (200 мкМ). В кварцевую кювету добавляли раствор ДФПГ (1 мл) и раствор C_{70} -Lys или C_{70} -Thr (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 298,15–318,15 К в темноте через каждую минуту в течение 30 мин, а также через 6 дней после начала реакции. Точность термостатирования составляла 0,1 К.

2.3.3. Цитотоксичность и пролиферация

2.3.3.1. Цитотоксичность

Изучение цитотоксичности аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr было проведено с помощью МТТ-теста (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия; Панэко, Россия) на клетках почки эмбриона человека НЕК 293 (банк клеточных культур Института цитологии РАН). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при $+37$ °С в увлажнённой атмосфере, содержащей воздух и 5 % CO_2 в питательной среде DMEM (Панэко, Россия), содержащей 10 % термически инактивированную фетальную бычью сыворотку (Gibco, США), 1 % L-глутамин (Панэко, Россия), 50 Ед·мл⁻¹ пенициллина (Панэко, Россия) и 50 мкг·мл⁻¹ стрептомицина (Панэко, Россия).

В результате воздействия НАД(Ф)Н-зависимых клеточных оксидоредуктаз на МТТ образуется окрашенный продукт (формазан) с максимумом поглощения при длине волны 540 нм, содержание которого пропорционально количеству жизнеспособных клеток.

Для проведения эксперимента клетки высевали в 96-луночный планшет и помещали в течение ночи в CO₂-инкубатор: за это время происходило прикрепление клеток к поверхности лунок (в каждую лунку вносили 5000 клеток в 200 мкл среды DMEM). Подсчёт числа клеток проводился на анализаторе жизнеспособности клеток BioRad TC10 (Bio-Rad Laboratories, США), после чего в лунки был добавлен раствор, содержащий аддукты фуллеренов. Инкубация клеток в планшетах продолжалась 48 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С. По окончании инкубационного периода культуральную среду DMEM сливали путём инвертирования планшета. Далее в лунки вносили 100 мкл среды DMEM и 20 мкл МТТ-реагента и планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С. После удаления надосадочной жидкости полученные кристаллы формазана были растворены в течение 15 мин при перемешивании в 200 мкл диметилсульфоксида (Вектон, Россия) на лунку. Далее измеряли оптическую плотность полученных растворов на планшетном ридере Allsheng AMR-100 (Китай) при длинах волн 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 были нормированы в процентах по отношению к контрольным клеткам [152].

2.3.3.2. Клеточная пролиферация

Клеточную пролиферацию оценивали с использованием сульфородамина В (Sigma, США). Клетки НЕК293 высевали на 96-луночный микропланшет в концентрации $2 \cdot 10^4$ клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 48 ч в присутствии аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr или без них (контроль), а затем добавляли в каждую лунку 100 мкл 10 мас. % трихлоруксусной кислоты (Sigma, США). Планшеты инкубировали при 4 °С в течение 1 ч, промывали дистиллированной водой и сушили при комнатной температуре. После добавления 100 мкл 0,057 мас. % раствора сульфородамина В в 1 мас. % уксусной кислоты (Вектон, Россия) планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и промывали четыре раза 1 мас. % уксусной кислоты для удаления несвязанного красителя. Измерения оптической плотности проводились при 510 нм с использованием планшетного ридера Allsheng AMR-100 (Китай) после добавления 200 мкл 10 мМ буферного раствора Трис (рН = 10,5; Панэко, Россия) в каждую лунку.

2.3.4. Взаимодействие с ДНК

2.3.4.1. Связывание с ДНК

УФ-спектры поглощения растворов C_{70} -Lys и ДНК (Fluka, США), C_{70} -Thr и ДНК в диапазоне длин волн 220–340 нм регистрировали на спектрофотометре Beckman Coulter DU 800 (США) относительно контроля в кварцевой кювете ($l = 1$ см). Рабочие растворы получали смешиванием растворов ДНК и C_{70} -Lys, C_{70} -Thr при комнатной температуре. Итоговые концентрации ДНК составили $1,67 \cdot 10^{-8}$ – $3,89 \cdot 10^{-8}$ моль·л⁻¹; концентрации аддуктов — $4 \cdot 10^{-8}$ моль·л⁻¹. Эксперименты проводились в физиологическом растворе.

2.3.4.2. Генотоксичность

Генотоксичность аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr оценивалась методом ДНК-комет с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) при помощи щелочного гель-электрофореза [154]. ДНК-кометы визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Micromed 3 LUM (Россия). Измерения длин хвостов ДНК-комет проводились с использованием программного обеспечения CASP (версия 1.2.2). Содержание ДНК в хвосте и длина хвоста были определены экспериментально; момент хвоста был рассчитан как процентное содержание ДНК в хвосте, умноженное на длину между центром головы кометы и ее хвостом [155].

Глава 3. Обсуждение результатов

3.1. Синтез и идентификация аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr

3.1.1. ¹³C ЯМР-спектроскопия

В качестве примера на Рис. 19 представлен ЯМР-спектр аддукта C₇₀-Thr. Анализ спектра позволяет охарактеризовать образец C₇₀-Thr: (1) пик в области 177 м. д. может быть отнесён к атомам углерода фуллеренового ядра, связанного с молекулой аминокислоты (Рис. 19, а); (2) интенсивный пик при 166 м. д. соответствует атому углерода в карбоксильной группе аминокислоты (Рис. 19, б); (3) пики с химическими сдвигами 105 и 74 м. д. можно отнести к атомам углерода фуллеренового ядра, связанного с атомом водорода (Рис. 19, в и в*), одновременное присутствие двух пиков можно объяснить миграцией атома водорода при атаке L-треонина по связи C=C; (4) химический сдвиг, равный 62 м. д., можно идентифицировать как сигнал атомов углерода в аминокислоте, связанных с гидроксильными группами (Рис. 19, г); (5) пик около 45 м. д. может быть отнесен к атомам углерода, которые присоединены к атому азота (Рис. 19, д); (6) пик с химическим сдвигом 18 м. д. относится к атому углерода метильной группы молекулы L-треонина (Рис. 19, е). Для сравнения на Рис. 19 представлены спектры ¹³C ЯМР, полученные с использованием метода CP/MAS для чистого фуллерена C₇₀ (красный) и чистого треонина (зелёный). Значительное смещение химического сдвига атома углерода (по сравнению с чистым L-треонином, Рис. 19, д) может быть связано с тем, что этот атом связан с атомом азота, присоединённым к фуллереновому кору.

3.1.2. ИК-Фурье спектроскопия

Полученные данные ИК-Фурье спектроскопии позволяют охарактеризовать аддукты C₇₀-Lys (Рис. 20, а) и C₇₀-Thr (Рис. 20, б). Пики в длинноволновой области спектра (500–1100 см⁻¹) соответствуют колебаниям связей C–C молекулы фуллерена. В интервале 1335–1345 см⁻¹ находится пик, соответствующий валентным колебаниям связей C–O. Пик около 1400–1410 см⁻¹ относится к деформационным колебаниям OH-групп аминокислотных остатков. Пик в интервале 1577–1585 см⁻¹ можно отнести к деформационным колебаниям аминогруппы. Малоинтенсивный пик в области 2850–2950 см⁻¹ относится к валентным колебаниям метиленовых групп в остатках аминокислот. Наконец, широкий пик в интервале 3300–3500 см⁻¹ соответствует валентным колебаниям OH-групп аминокислотных остатков.

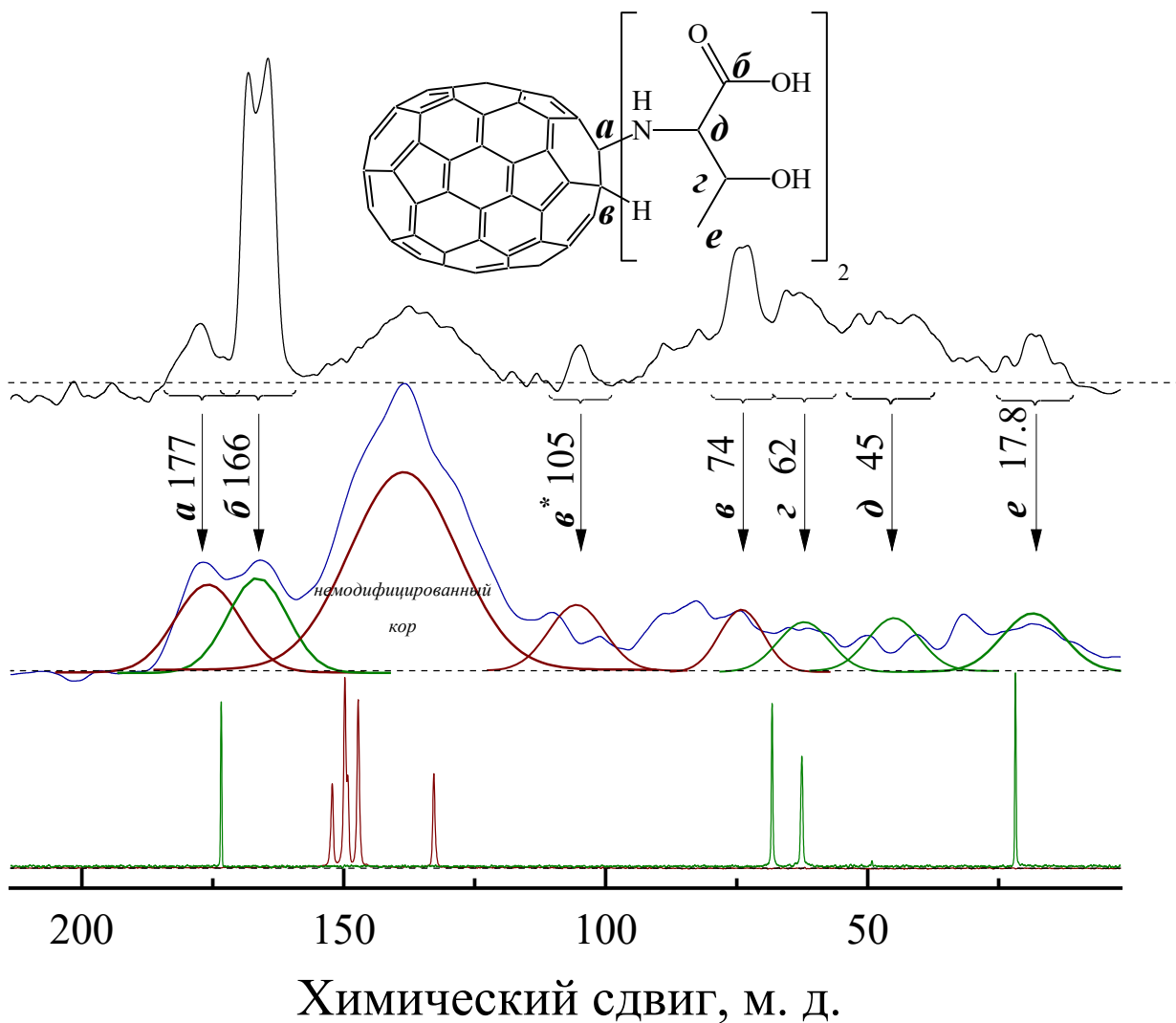
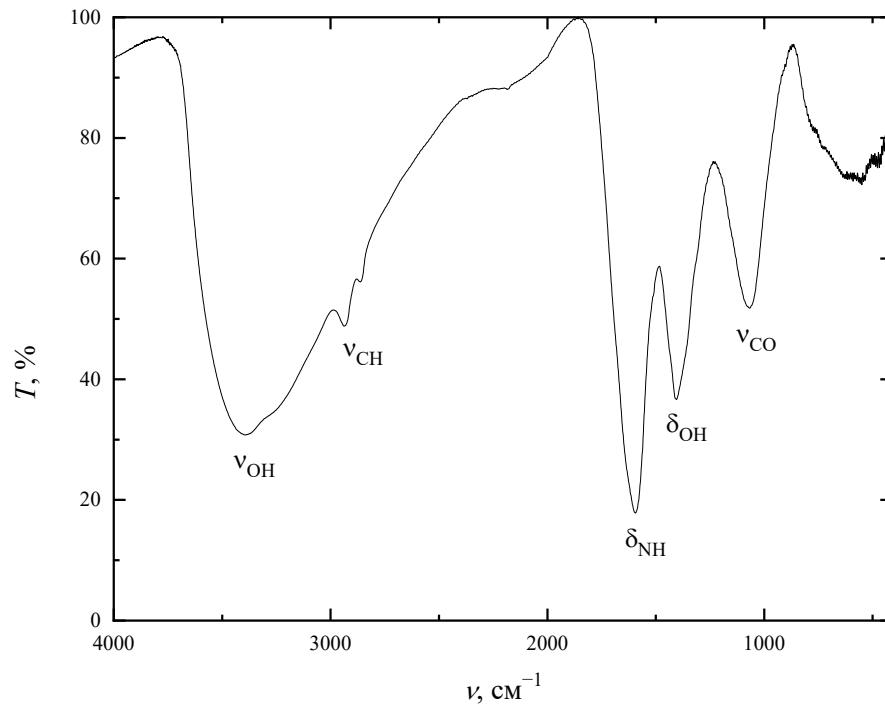
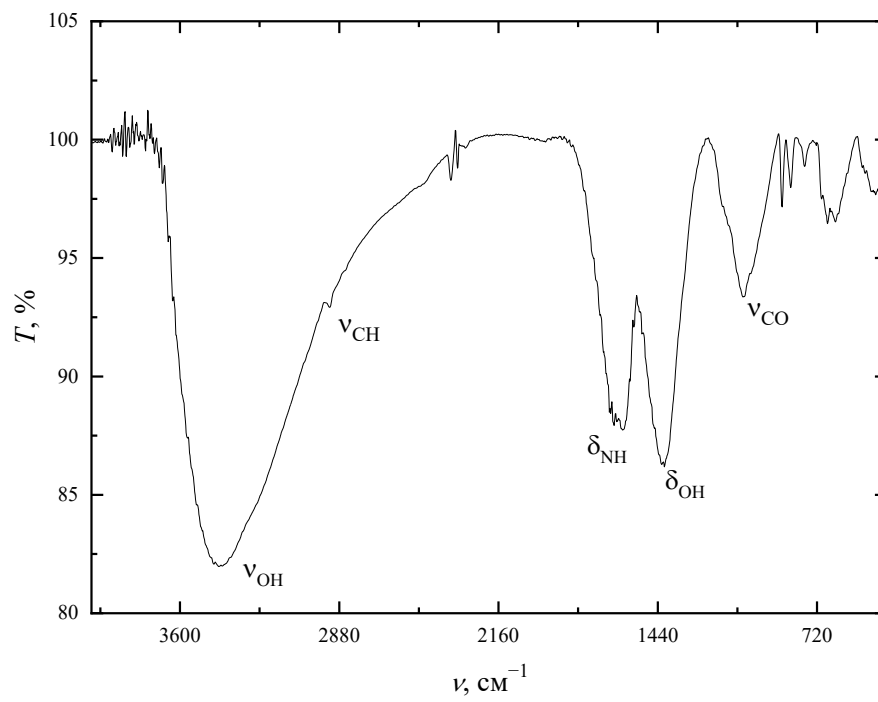


Рис. 19. ^{13}C ЯМР-спектры C_{70} -Thr (—), фуллерена C_{70} (—) и L-треонина (—), полученные методом CP/MAS и ^{13}C ЯМР-спектр аддукта C_{70} -Thr (—), полученный методом DE.

(a)



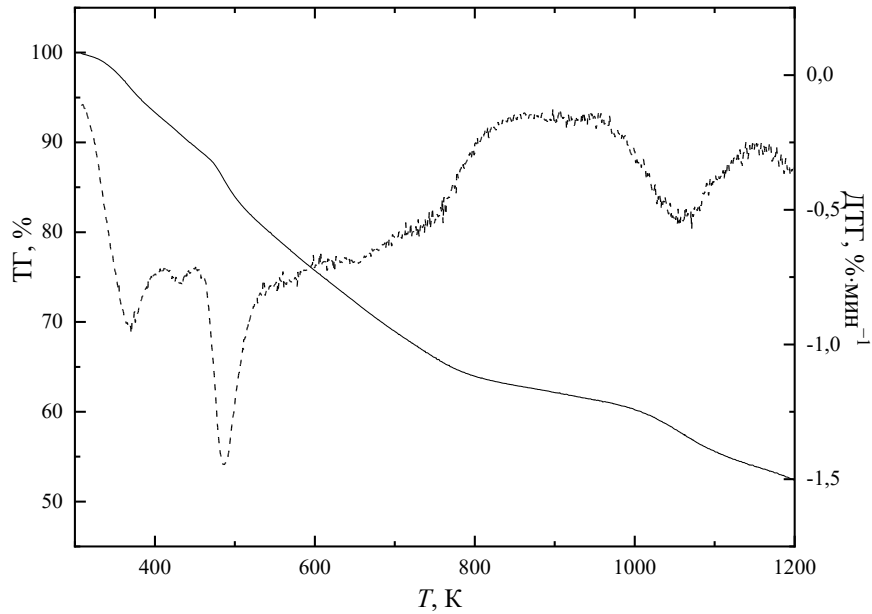
(б)

Рис. 20. ИК-Фурье спектры аддуктов C_{70} -Lys (a) и C_{70} -Thr (б).

3.1.3. Термогравиметрический анализ

На Рис. 21 представлены результаты термогравиметрического анализа аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr.

(a)



(б)

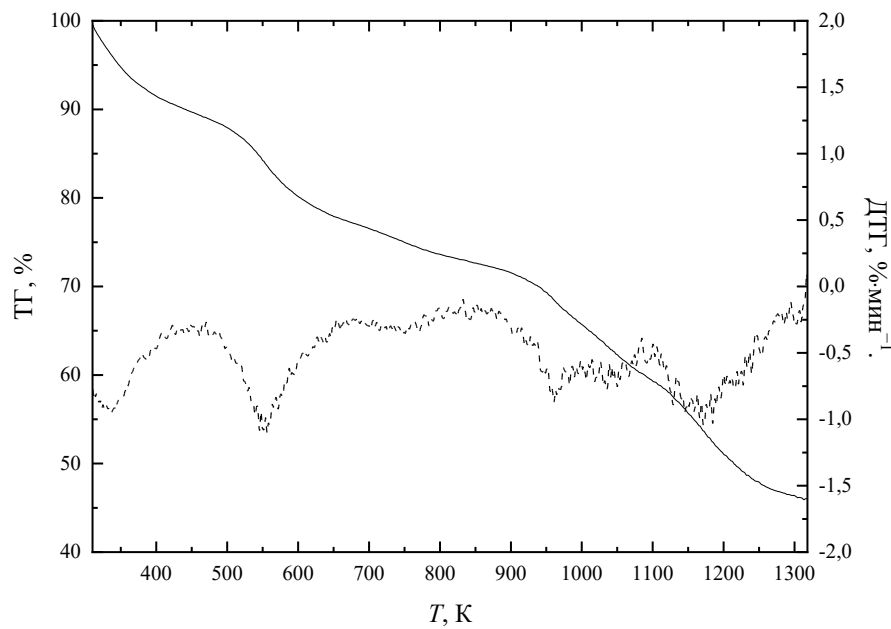


Рис. 21. Результаты термогравиметрического анализа: температурная зависимость потери массы аддуктов C_{70} -Lys (a) и C_{70} -Thr (б) (сплошная линия) и дифференциальная кривая (пунктирная линия).

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: (1) вначале происходит десорбция воды из кристаллогидратов аддуктов фуллеренов; (2) при дальнейшем повышении температуры происходит разложение аминокислотных остатков аддуктов, сопровождающееся процессами деазотирования, дегидратации и декарбоксилирования; (3) при значительно более высоких температурах происходит частичное окисление фуллеренового коа.

3.1.4. Спектроскопия в УФ и видимой области

Результаты электронной спектроскопии представлены на Рис. 22. Можно сделать выводы, что (1) в электронном спектре образцов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr отсутствуют видимые полосы поглощения; (2) отсутствуют пики поглощения, характерные для фуллерена C_{70} в области 335, 385 и 472 нм; (3) сравнение спектров свидетельствует об отсутствии непрореагировавшего исходного фуллерена C_{70} .

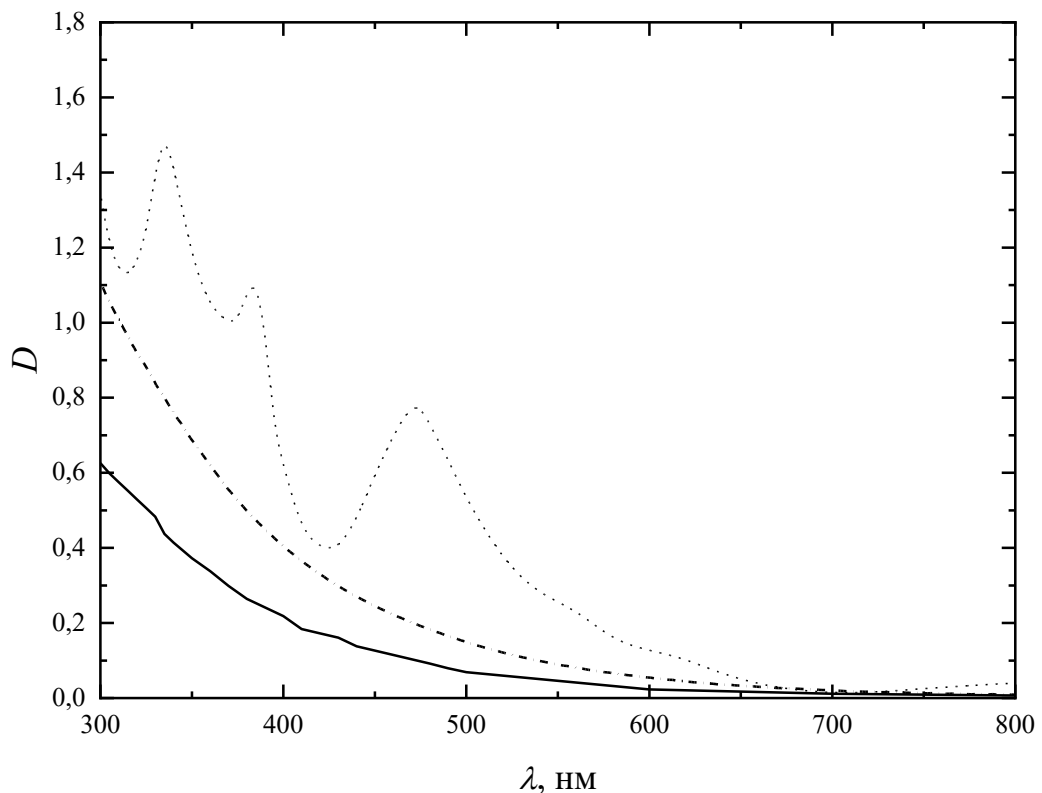


Рис. 22. Электронные спектры поглощения образцов C_{70} -Lys (- · -), C_{70} -Thr (-) с концентрацией $C = 0,1 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ и исходного фуллерена C_{70} (раствор в *o*-ксилоле) с концентрацией $C = 0,029 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ (···).

Несмотря на то, что спектры водных растворов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr не являются информативными, они могут быть использованы для спектрофотометрического анализа фуллереновых аддуктов в воде и водных растворах [156].

3.1.5. Элементный анализ

Результаты элементного анализа аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr представлены в Табл. 4, из которой видно хорошее соответствие между расчётными и экспериментальными значениями. На основании данных элементного анализа был определён состав синтезированных аддуктов: трис-аддукт в случае C_{70} -Lys ($C_{70}(C_6H_{14}N_2O_2)_3$, $C_{88}H_{42}N_6O_6$, $M=1279,31$ г·моль⁻¹) и бис-аддукт в случае C_{70} -Thr ($C_{70}(C_4H_9NO_3)_2$, $C_{78}H_{18}N_2O_6$, $M=1078,99$ г·моль⁻¹).

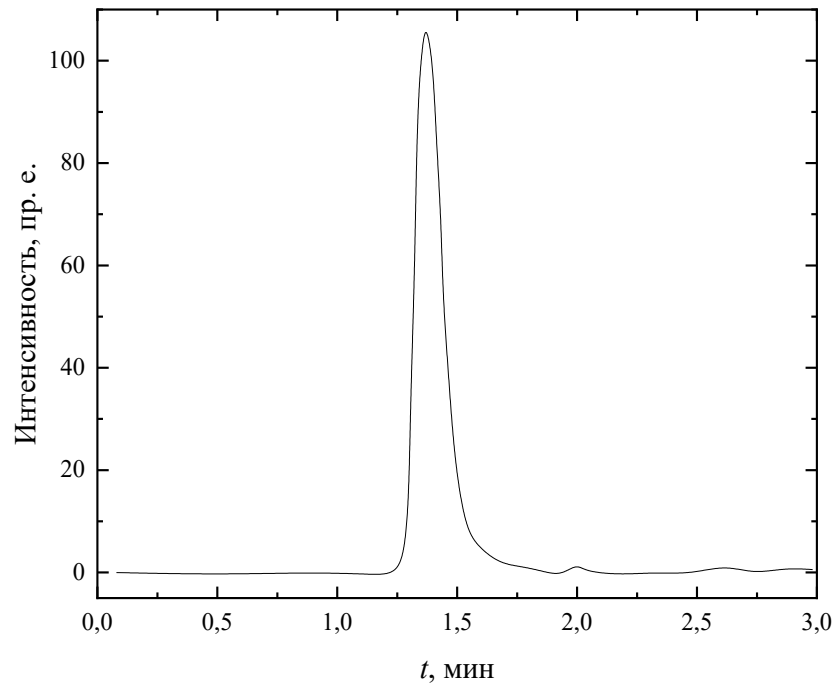
Табл. 4. Результаты элементного анализа аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr.

Вещество	Теоретическое содержание,			Экспериментальное содержание,		
	мас. %			мас. %		
	С	Н	Н	С	Н	Н
C_{70} -Lys	82,6	3,3	6,5	$82,6 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,3$
C_{70} -Thr	86,8	1,7	2,6	$86,9 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$

3.1.6. ВЭЖХ

На Рис. 23 приведены результаты ВЭЖХ C_{70} -Lys (Рис. 23, а) и C_{70} -Thr (Рис. 23, б). На основании полученных данных видно, что чистота полученных соединений составляет не менее 99,5 %.

(a)



(б)

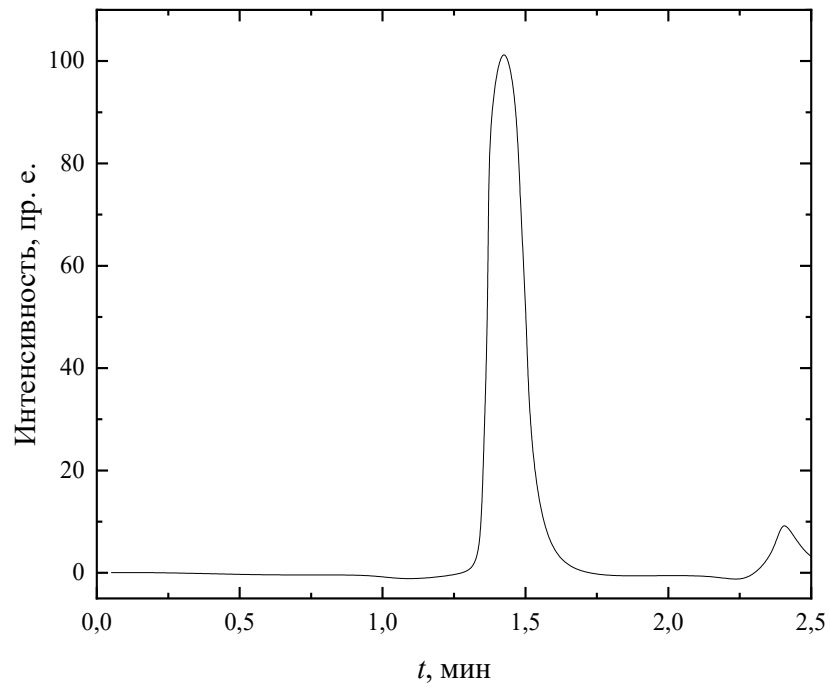


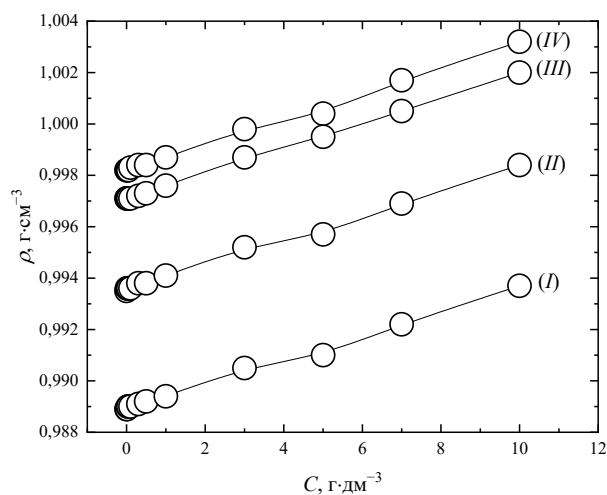
Рис. 23. Результаты ВЭЖХ образцов C₇₀-Lys (a) и C₇₀-Thr (б).

3.2. Физико-химические свойства водных растворов аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr

3.2.1. Плотности водных растворов

На Рис. 24 и Табл. 5, 6 представлены концентрационные зависимости плотностей водных растворов C₇₀-Lys (Рис. 24, а) и C₇₀-Thr (Рис. 24, б) в интервале температур $T = 293,15\text{--}333,15$ К.

(а)



(б)

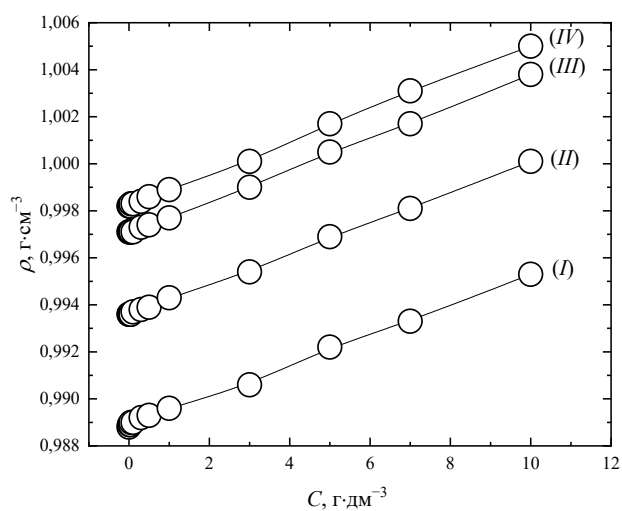


Рис. 24. Концентрационная зависимость плотности (ρ) водных растворов C₇₀-Lys (а) и C₇₀-Thr (б) при 293,15 К (IV), 298,15 К (III), 313,15 К (II), 333,15 К (I). $C_{C_{70}\text{-Thr}}$ и $C_{C_{70}\text{-Lys}}$ — объёмные концентрации C₇₀-Lys и C₇₀-Thr, соответственно.

Табл. 5. Температурная и концентрационная зависимости плотности (ρ) водных растворов C₇₀-Lys. C — объёмная концентрация C₇₀-Lys в водном растворе.

$C, \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$	$x_{\text{C}_{70}\text{-Lys}} \cdot 10^{-4}$	$\rho, \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$			
		293,15 К	298,15 К	313,15 К	333,15 К
0,00	0,0000	0,9982	0,9971	0,9935	0,9889
0,01	0,0014	0,9982	0,9971	0,9936	0,9889
0,03	0,0042	0,9982	0,9971	0,9936	0,9890
0,05	0,0070	0,9982	0,9971	0,9936	0,9890
0,10	0,0141	0,9983	0,9971	0,9936	0,9890
0,30	0,0422	0,9984	0,9972	0,9938	0,9891
0,50	0,0704	0,9984	0,9973	0,9938	0,9892
1,0	0,1408	0,9987	0,9976	0,9941	0,9894
3,0	0,4234	0,9998	0,9987	0,9952	0,9905
5,0	0,7070	1,0004	0,9995	0,9957	0,9910
7,0	0,9918	1,0017	1,0005	0,9969	0,9922
10,0	1,4212	1,0032	1,0020	0,9984	0,9937

Концентрационная зависимость среднего молярного объёма (\bar{V}) раствора рассчитывалась по Ур. 1:

$$\bar{V} = \frac{V}{n_{\text{H}_2\text{O}} + n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \quad (1),$$

где V — объём водного раствора аддукта фуллерена, $n_{\text{H}_2\text{O}}$ и $n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}$ — количества веществ воды и аддукта фуллерена в 1 дм³ раствора. В соответствии с Ур. 2 и 3 были рассчитаны парциальные молярные объёмы компонентов раствора ($V_{\text{H}_2\text{O}}$ и $V_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}$) [157]:

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P,n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \quad V_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \right)_{T,P,n_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (2),$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \bar{V} - x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \right)_{T,P} \quad V_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} = \bar{V} - x_{\text{H}_2\text{O}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P} \quad (3).$$

В качестве примера на Рис. 25, 26 представлены концентрационные зависимости парциальных молярных объёмов C₇₀-Lys, C₇₀-Thr и воды при 298,15 К.

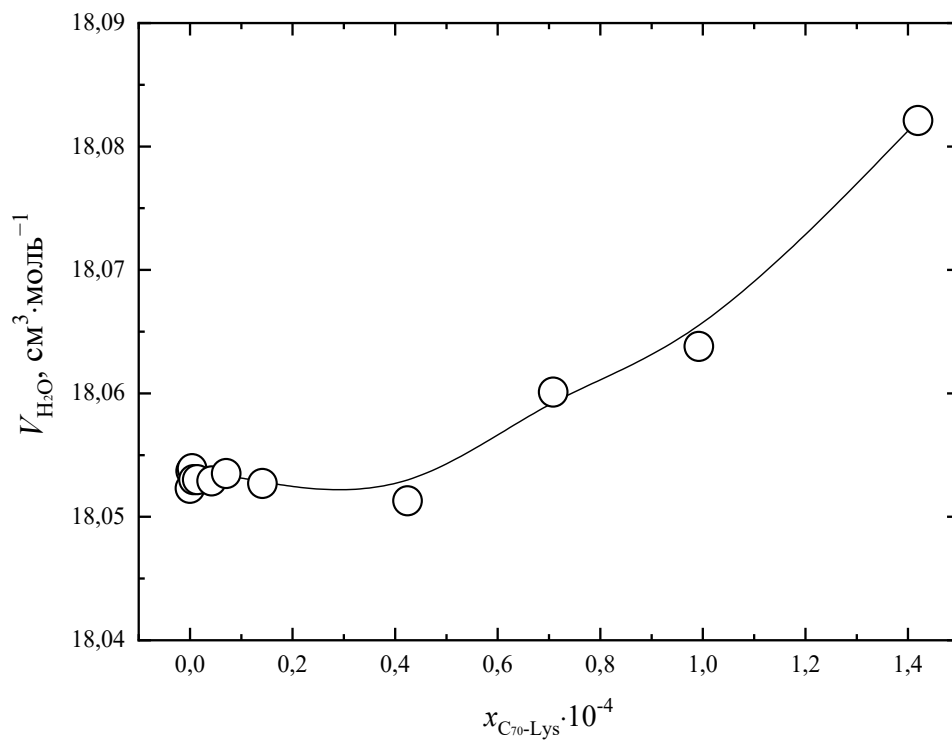
Табл. 6. Температурная и концентрационная зависимости плотности (ρ) водных растворов C_{70} -Thr. C — объёмная концентрация C_{70} -Thr в водном растворе.

$C, \text{г}\cdot\text{дм}^{-3}$	$x_{C_{70}\text{-Thr}} \cdot 10^{-4}$	$\rho, \text{г}\cdot\text{см}^{-3}$			
		293,15 К	298,15 К	313,15 К	333,15 К
0,00	0,0000	0,9982	0,9971	0,9936	0,9888
0,01	0,0017	0,9982	0,9971	0,9936	0,9889
0,03	0,0050	0,9982	0,9971	0,9936	0,9889
0,05	0,0083	0,9983	0,9971	0,9936	0,9890
0,10	0,0167	0,9983	0,9971	0,9937	0,9890
0,30	0,0501	0,9984	0,9973	0,9938	0,9892
0,50	0,0835	0,9986	0,9974	0,9939	0,9893
1,0	0,1670	0,9989	0,9977	0,9943	0,9896
3,0	0,5020	1,0001	0,9990	0,9954	0,9906
5,0	0,8383	1,0017	1,0005	0,9969	0,9922
7,0	1,1760	1,0031	1,0017	0,9981	0,9933
10,0	1,6851	1,0050	1,0038	1,0001	0,9953

Следует отметить сложный характер концентрационной зависимости парциального молярного объёма C_{70} -Lys и C_{70} -Thr.

Высокие абсолютные значения парциальных молярных объёмов в разбавленных растворах показывают, что добавление даже небольших порций аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr приводит к значительному уплотнению и структурированию водного раствора. Можно сделать вывод, что молекулы изучаемых фуллереновых аддуктов встраиваются в структуру водного раствора. Подобные эффекты ранее были обнаружены в бинарных системах, содержащих такие водорастворимые аддукты фуллеренов, как карбоксилированные фуллерены. ($C_{60}[C(\text{COOH})_2]_3$, $C_{70}[C(\text{COOH})_2]_3$) [158,159], фуллеренолы ($C_{60}(\text{OH})_{22-24}$, $C_{70}(\text{OH})_{12}$) [160,161], аддукты лёгких фуллеренов с L-аргинином ($C_{60}(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2)_8\text{H}_8$), L-треонином ($C_{60}(\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3)_2$), L-лизином ($C_{60}(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2)_2$) и L-гидроксипролином ($C_{60}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3)_2$) [98,100,105,106].

(a)



(б)

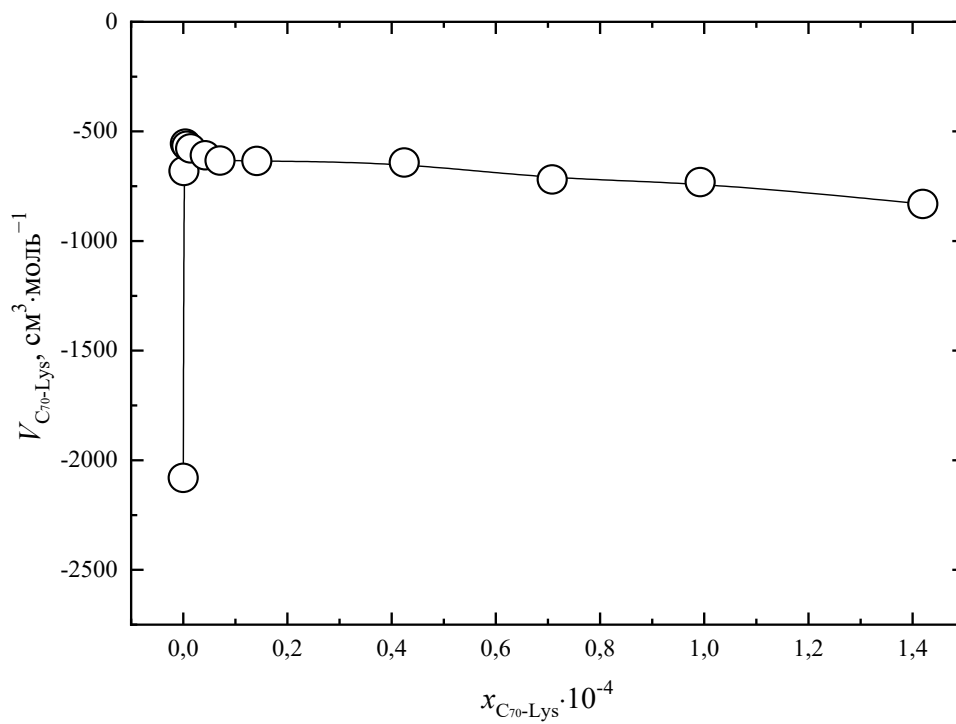
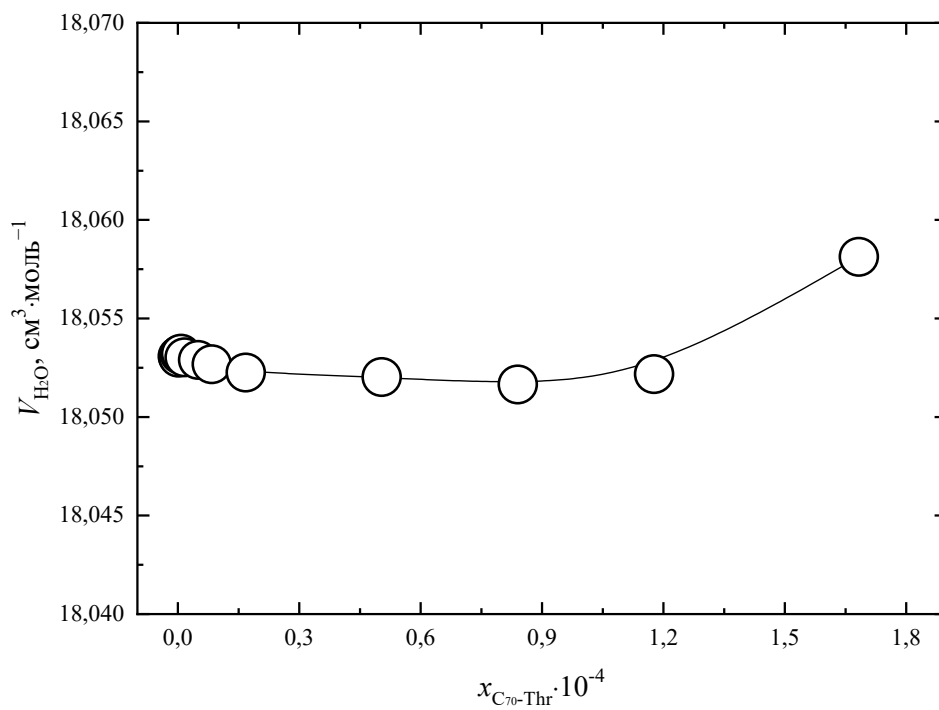


Рис. 25. Зависимость парциального молярного объёма воды (a) и C₇₀-Lys (б) от мольной доли аддукта C₇₀-Lys.

(a)



(б)

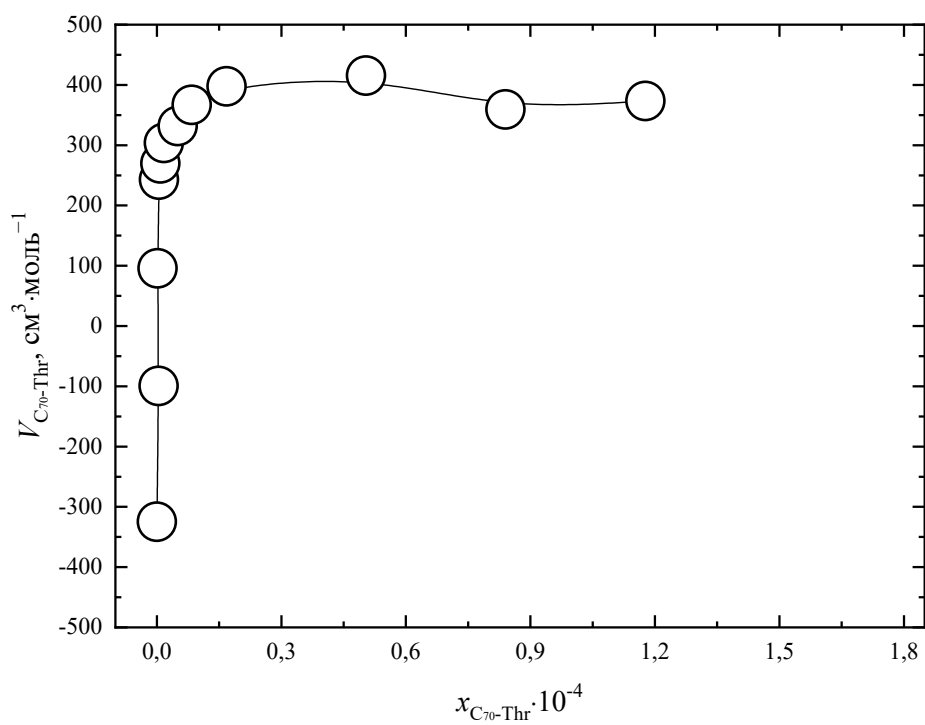
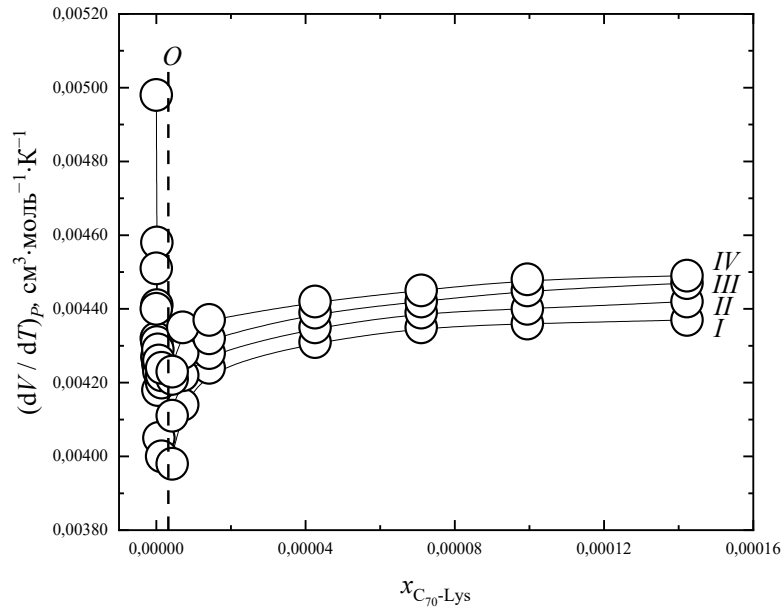


Рис. 26. Зависимость парциального молярного объёма воды (a) и C₇₀-Thr (б) от мольной доли аддукта C₇₀-Thr.

(a)



(б)

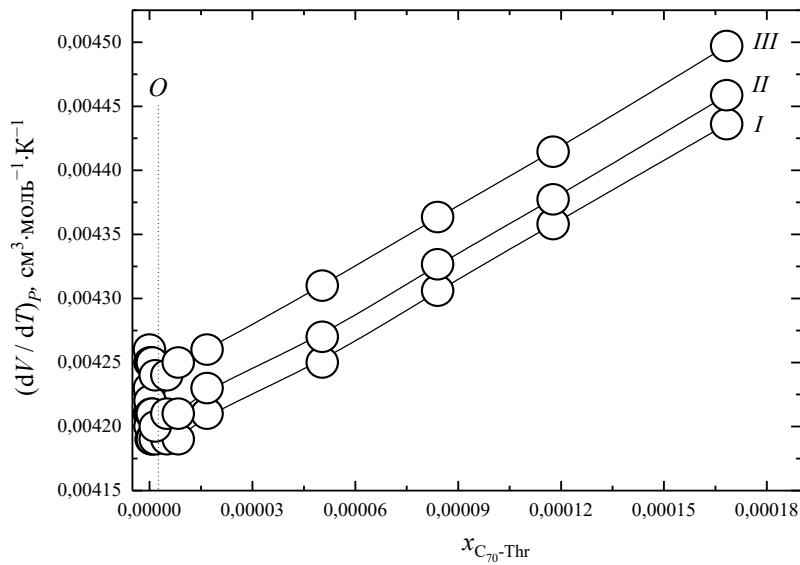


Рис. 27. Концентрационные зависимости производных $\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$ в интервале температур

293,15–333,15 К: (а) (I) $\left(\frac{\partial V_{293.15}}{\partial T}\right)_P$, (II) $\left(\frac{\partial V_{298.15}}{\partial T}\right)_P$, (III) $\left(\frac{\partial V_{313.15}}{\partial T}\right)_P$, (IV) $\left(\frac{\partial V_{333.15}}{\partial T}\right)_P$,

(б) I – $\left(\frac{\partial V_{295.65}}{\partial T}\right)_P$; II – $\left(\frac{\partial V_{305.65}}{\partial T}\right)_P$; III – $\left(\frac{\partial V_{323.15}}{\partial T}\right)_P$. O — точка экстремума.

Поскольку производные потенциала Гиббса высших порядков, которые являются первыми производными энтропии или объёма, значительно более чувствительны к изменению структуры раствора по сравнению с частными производными более низкого порядка, были определены смешанные производные потенциала Гиббса второго порядка. В соответствии с соотношениями Максвелла:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial T} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial T \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial T} \right)_{P,x} = - \left(\frac{\partial \bar{S}}{\partial P} \right)_{T,x} \quad (4),$$

где $\bar{G}, \bar{V}, \bar{S}$ — средний молярный потенциал Гиббса, объём и энтропия раствора, соответственно.

Хорошо видно, что функция $(\partial \bar{V} / \partial T)_P(x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}})$ проходит через минимум при концентрации аддуктов $x_{C_{70}\text{-Lys}} \approx 4 \cdot 10^{-6}$ и $x_{C_{70}\text{-Thr}} \approx 2 \cdot 10^{-6}$ при всех рассмотренных температурах (Рис. 27). При этих концентрациях в водных растворах $C_{70}\text{-Lys}$ и $C_{70}\text{-Thr}$ происходит разделение фаз и потеря устойчивости. Этот факт связан со сложным типом ассоциации $C_{70}\text{-Lys}$ и $C_{70}\text{-Thr}$ в водном растворе и образованием ассоциатов второго типа с линейными размерами в сотни нанометров [105]

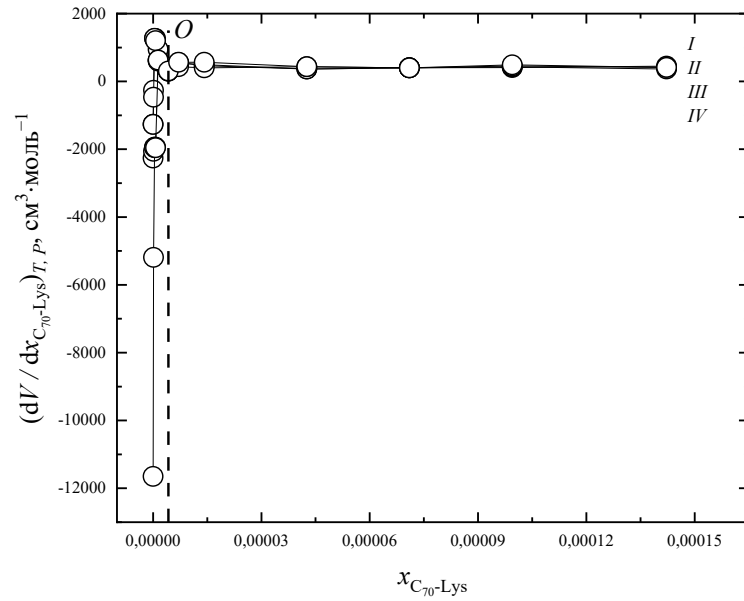
Аналогичные результаты были получены при использовании другой смешанной производной потенциала Гиббса:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial x} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x} \right)_{T,P} = \left(\frac{\partial \mu_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}{\partial P} \right)_T - \left(\frac{\partial \mu_{H_2O}}{\partial P} \right)_T = V_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}} - V_{H_2O} \quad (5),$$

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

Хорошо видно, что зависимость $(\partial \bar{V} / \partial x)_{P,T}(x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}})$ также проходит через минимум при концентрациях $x_{C_{70}\text{-Lys}} \approx 4 \cdot 10^{-6}$ и $x_{C_{70}\text{-Thr}} \approx 2 \cdot 10^{-6}$ (Рис. 28).

(a)



(б)

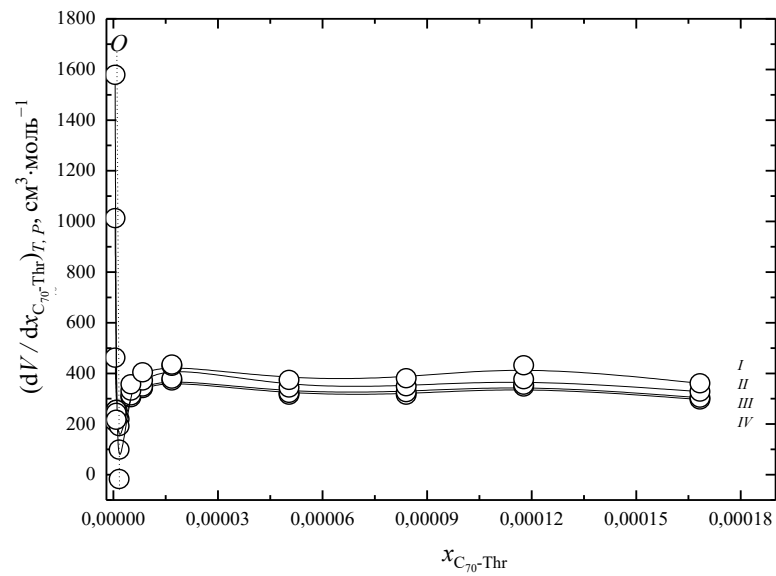


Рис. 28. Концентрационные зависимости аддуктов $\left(\frac{\partial V}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$ в интервале температур

293,15–333,15 К: (I) $\left(\frac{\partial V_{293.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$, (II) $\left(\frac{\partial V_{298.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$, (III) $\left(\frac{\partial V_{313.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$, (IV) $\left(\frac{\partial V_{333.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$.

O —точка экстремума.

3.2.2. Вязкости водных растворов

Концентрационные зависимости динамической ($\eta(C)$) и кинематической ($\eta_k(C)$) вязкости водных растворов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr при 293,15, 313,15 и 333,15 К представлены в Табл. 7, 8. Наблюдается увеличение динамической и кинематической вязкости при увеличении концентрации аддуктов в интервале температур 293,15–333,15 К.

Температурная зависимость динамической вязкости в бинарных системах C₇₀-Lys–H₂O и C₇₀-Thr–H₂O определялась на основе уравнения Френкеля — Андраде:

$$\eta = A_S e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (6),$$

где E_a — энергия активации вязкого течения, A_S — предэкспоненциальный множитель.

Для определения энергии активации вязкого течения, а также предэкспоненциального множителя применялась логарифмическая форма Ур. 6:

$$\ln \eta = \ln A_S + \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (7).$$

В результате были получены следующие значения энергии активации вязкого течения (E_a) и предэкспоненциального множителя (A_S) для аддукта C₇₀-Lys: $E_a \approx 15,8 \pm 0,4$ кДж·моль⁻¹, $A_S = 0,0046 \pm 0,0007$ мПа·с; и C₇₀-Thr: $E_a \approx 15,2 \pm 0,6$ кДж·моль⁻¹, $A_S = 0,0020 \pm 0,0001$ мПа·с. Таким образом, уравнение Френкеля — Андраде будет следующим для бинарной системы C₇₀-Lys–H₂O:

$$\eta = (0,0046 \pm 0,0007) e^{\frac{(1900 \pm 50)}{T}} \quad (8),$$

и для бинарной системы C₇₀-Thr–H₂O:

$$\eta = (0,0020 \pm 0,0001) e^{\frac{(1830 \pm 70)}{T}} \quad (9).$$

Температурная зависимость вязкости в бинарных системах C₇₀-Lys–H₂O и C₇₀-Thr–H₂O также была описана уравнением Вант-Гоффа:

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

или в численной форме для аддукта C₇₀-Lys:

$$\gamma_{\eta} = \frac{\eta_{T-10}}{\eta_T} = 1,22 \pm 0,02 \quad (11),$$

и аддукта C₇₀-Thr:

$$\gamma_n = \frac{\eta_{T-10}}{\eta_T} = 1,21 \pm 0,04 \quad (12),$$

где γ_η — коэффициент вязкости Вант-Гоффа. На Рис. 29, 30 показана сравнительно высокая стабильность коэффициента вязкости Вант-Гоффа для бинарных систем C_{70} -Lys- H_2O и C_{70} -Thr- H_2O .

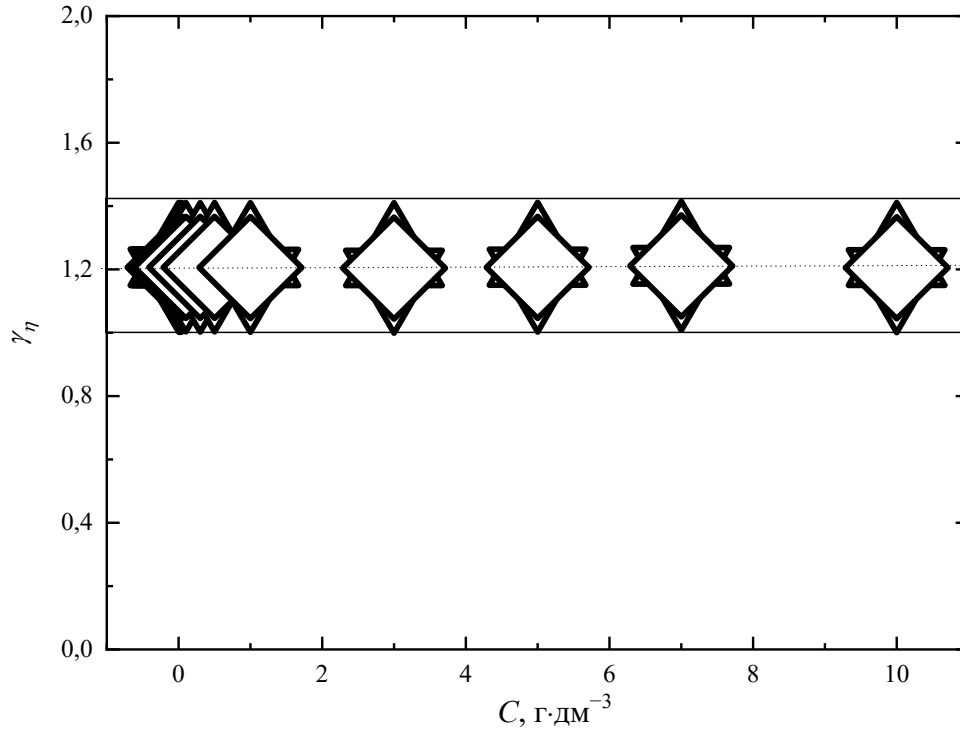


Рис. 29. Концентрационная зависимость коэффициента вязкости Вант-Гоффа (γ_η) для бинарной системы C_{70} -Lys- H_2O . (Δ) $(\frac{\eta_{333,15}}{\eta_{353,15}})^{\frac{1}{2}}$; (∇) $(\frac{\eta_{313,15}}{\eta_{333,15}})^{\frac{1}{2}}$; (\diamond) $(\frac{\eta_{313,15}}{\eta_{353,15}})^{\frac{1}{4}}$. C — объёмная концентрация водного раствора C_{70} -Lys.

Табл. 7. Температурные зависимости динамической (η) и кинематической (η_k) вязкости в бинарной системе C₇₀-Lys-H₂O. ρ — плотность раствора, C — объёмная концентрация.

$C, \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$	$\eta, \text{ мПа}\cdot\text{с}$			$\eta_k, \text{ мм}^2\cdot\text{с}^{-1}$		
	293,15 К	313,15 К	333,15 К	293,15 К	313,15 К	333,15 К
0,00	1,0008	0,6542	0,4721	1,0027	0,6584	0,4758
0,01	1,0013	0,6550	0,4740	1,0031	0,6596	0,4799
0,03	1,0032	0,6560	0,4741	1,0048	0,6600	0,4795
0,05	1,0016	0,6553	0,4730	1,0034	0,6596	0,4789
0,10	1,0036	0,6563	0,4737	1,0053	0,6605	0,4790
0,30	1,0044	0,6569	0,4744	1,0060	0,6611	0,4800
0,50	1,0065	0,6580	0,4750	1,0081	0,6621	0,4801
1,0	1,0089	0,6600	0,4770	1,0101	0,6639	0,4820
3,0	1,0262	0,6716	0,4882	1,0259	0,6749	0,4929
5,0	1,0330	0,6747	0,4873	1,0325	0,6776	0,4914
7,0	1,0669	0,6927	0,4959	1,0651	0,6948	0,4997
10,0	1,0736	0,7021	0,5088	1,0702	0,7031	0,5120

Табл. 8. Температурные зависимости динамической (η) и кинематической (η_k) вязкости в бинарной системе C₇₀-Thr-H₂O. ρ — плотность раствора, C — объёмная концентрация.

$C, \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$	$\eta, \text{ мПа}\cdot\text{с}$				$\eta_k, \text{ мм}^2\cdot\text{с}^{-1}$			
	293,15 К	298,15 К	313,15 К	333,15 К	293,15 К	298,15 К	313,15 К	333,15 К
0,00	1,0050	0,8937	0,6560	0,4688	1,0068	0,8963	0,6603	0,4741
0,01	1,0054	0,9087	0,6840	0,4872	1,0072	0,9114	0,6884	0,4926
0,03	1,0065	0,912	0,6845	0,488	1,0083	0,9147	0,6889	0,4934
0,05	1,0076	0,9135	0,6848	0,4886	1,0094	0,9162	0,6892	0,4941
0,1	1,0133	0,9149	0,6876	0,4903	1,0150	0,9175	0,6920	0,4957
0,3	1,0146	0,9161	0,6884	0,4907	1,0162	0,9186	0,6927	0,4961
0,5	1,0226	0,9231	0,6932	0,4941	1,0241	0,9255	0,6974	0,4994
1,0	1,0309	0,9298	0,6964	0,4962	1,0320	0,9319	0,7004	0,5014
3,0	1,0359	0,9334	0,7012	0,4977	1,0358	0,9344	0,7044	0,5024
5,0	1,0422	0,9407	0,7052	0,4982	1,0405	0,9403	0,7074	0,5021
7,0	1,0467	0,9432	0,7070	0,4999	1,0437	0,9416	0,7084	0,5033
10,0	1,0517	0,9475	0,7087	0,5018	1,0465	0,9439	0,7086	0,5042

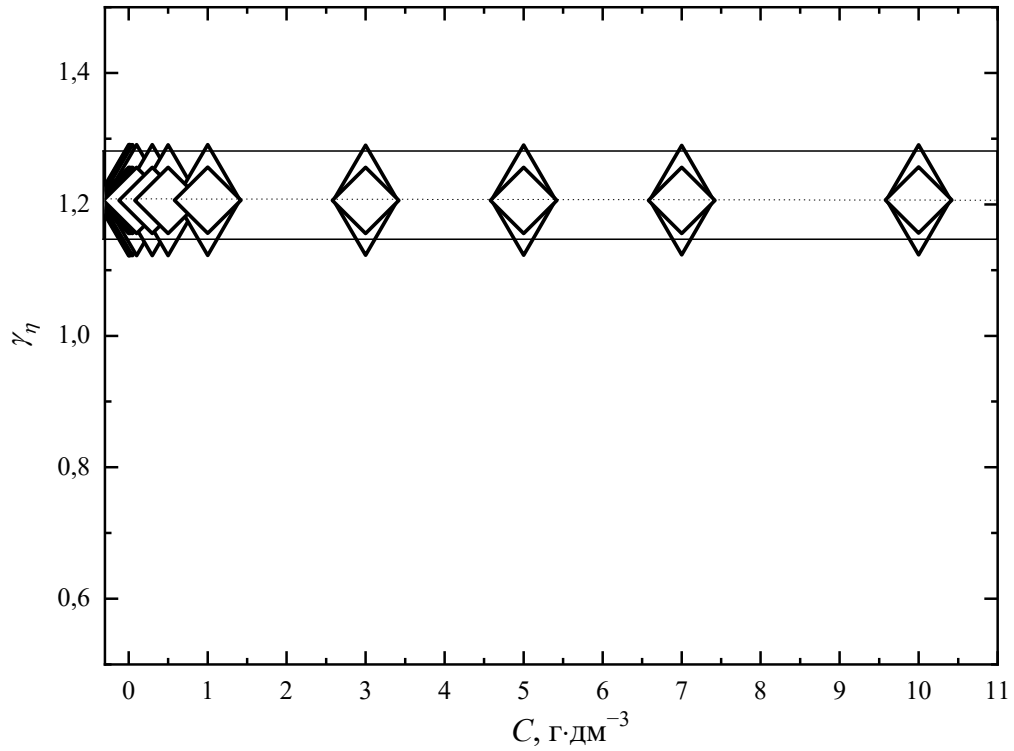


Рис. 30. Концентрационная зависимость коэффициента вязкости Вант-Гоффа (γ_η) для бинарной системы C_{70} -Thr- H_2O . $(\Delta) \left(\frac{\eta_{293.15}}{\eta_{313.15}} \right)^{\frac{1}{2}}$; $(\nabla) \left(\frac{\eta_{313.15}}{\eta_{333.15}} \right)^{\frac{1}{2}}$; $(\diamond) \left(\frac{\eta_{293.15}}{\eta_{333.15}} \right)^{\frac{1}{4}}$. C — объёмная концентрация водного раствора C_{70} -Thr.

3.2.3. Рефракции водных растворов

В Табл. 9, 10 представлена концентрационная зависимость показателей преломления водных растворов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr при 298,15 К.

Табл. 9. Концентрационная зависимость показателя преломления (n_D), удельной рефракции (r), молярной рефракции (R), водных растворов аддукта C₇₀-Lys, удельная ($r_{C_{70}\text{-Lys}}$) и молярная ($R_{C_{70}\text{-Lys}}$) рефракции аддукта C₇₀-Lys при 298,15 К. С — объёмная концентрация.

$C, \text{г}\cdot\text{дм}^{-3}$	n_D	$r, \text{см}^3\cdot\text{г}^{-1}$	$R, \text{см}^3\cdot\text{моль}^{-1}$	$r_{C_{70}\text{-Lys}}, \text{см}^3\cdot\text{г}^{-1}$	$R_{C_{70}\text{-Lys}}, \text{см}^3\cdot\text{моль}^{-1}$
0,0	1,332879	0,20624	3,71232	—	—
0,01	1,332882	0,20623	3,71218	—	—
0,03	1,332888	0,20624	3,71243	—	—
0,05	1,332892	0,20623	3,71232	—	—
0,10	1,332905	0,20624	3,71269	0,206	263
0,30	1,332951	0,20624	3,71342	0,206	263
0,50	1,332972	0,20624	3,71416	0,206	263
1,00	1,333113	0,20626	3,71635	0,226	289
3,00	1,333614	0,20631	3,72461	0,229	293
5,00	1,333826	0,20635	3,73271	0,228	292
7,00	1,334460	0,20641	3,74119	0,230	294
10,0	1,335121	0,20647	3,75339	0,229	293

Табл. 10. Концентрационная зависимость показателя преломления (n_D), удельной рефракции (r), молярной рефракции (R), водных растворов аддукта C_{70} -Thr, удельная ($r_{C_{70}\text{-Thr}}$) и молярная ($R_{C_{70}\text{-Thr}}$) рефракции аддукта C_{70} -Thr при 298,15 К. C — объёмная концентрация.

$C, \text{г} \cdot \text{дм}^{-3}$	n_D	$r, \text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$	$R, \text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$	$r_{C_{70}\text{-Thr}}, \text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$	$R_{C_{70}\text{-Thr}}, \text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$
0,0	1,333359	0,20650	3,71700	—	—
0,01	1,333365	0,20650	3,71704	—	—
0,03	1,333367	0,20650	3,71711	—	—
0,05	1,333374	0,20651	3,71736	—	—
0,10	1,333382	0,20650	3,71737	0,208	224
0,30	1,333433	0,20650	3,7181	0,206	222
0,50	1,333473	0,20650	3,71883	0,206	221
1,00	1,333583	0,20649	3,72049	0,196	211
3,00	1,333961	0,20645	3,72711	0,190	204
5,00	1,334444	0,20641	3,73373	0,189	202
7,00	1,334820	0,20637	3,74036	0,188	202
10,0	1,335480	0,20630	3,75013	0,187	201

По полученным экспериментальным данным рассчитаны концентрационные зависимости удельной и молярной рефракции водных растворов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr при 298,15 К с использованием уравнения Лоренца — Лоренца:

$$r = \left(\frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \right) \frac{1}{\rho} \quad (13),$$

$$R = \left(\frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \right) \frac{\bar{M}}{\rho} \quad (14),$$

где r , R — удельная ($\text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$) и молярная ($\text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$) рефракции, \bar{M} — средняя молекулярная масса раствора: $\bar{M} = x_{\text{H}_2\text{O}} \cdot M_{\text{H}_2\text{O}} + x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \cdot M_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}$ ($\text{г} \cdot \text{моль}^{-1}$).

Концентрационные зависимости молярной и удельной рефракции представлены в Табл. 9, 10. Согласно правилу аддитивности рефракции раствора (Ур. 15, 16) можно легко вычислить молярную (r) и удельную (R) рефракцию аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr, используя значения рефракции воды:

$$r = (r_{\text{H}_2\text{O}} \cdot w_{\text{H}_2\text{O}} + r_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \cdot w_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}) \cdot \frac{1}{100} \quad (15),$$

$$R = R_{\text{H}_2\text{O}} \cdot x_{\text{H}_2\text{O}} + R_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \cdot x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \quad (16),$$

где r_i , R_i — удельная и молярная рефракции i -го компонента, w_i , x_i — массовая и молярная доли i -го компонента.

Для аддукта C₇₀-Lys значение молярной ($R_{\text{C}_{70}\text{-Lys}}$) и ($r_{\text{C}_{70}\text{-Lys}}$) удельной рефракций составили $275 \pm 25 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$ и $0,218 \pm 0,020 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, для аддукта C₇₀-Thr значение молярной ($R_{\text{C}_{70}\text{-Thr}}$) и ($r_{\text{C}_{70}\text{-Thr}}$) удельной рефракций составили $212 \pm 12 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$ и $0,198 \pm 0,080 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. С учётом низкой точности значений рефракции при малых концентрациях ($C_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} < 0,05 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$) они не использовались для расчётов.

Кроме того, была рассчитана молярная рефракция аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr с использованием правила аддитивности Эйзенлора (с учётом атомных рефракций $R_{i(j)}$ i -го атома в j -й функциональной группе):

$$R^{\text{add}} \approx 88R_c + 42R_H + 6R_{N(-NH_2)} + 3R_{O(-OH)} + 3R_{O(=CO)} + 3R_{=} \approx 294 \pm 5 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \quad (17),$$

$$R^{\text{add}} \approx 78R_c + 16R_H + 2R_{N(-NH_2)} + 4R_{O(-OH)} + 2R_{O(=CO)} + 2R_{=} \approx 227 \pm 5 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \quad (18).$$

Расхождение в расчёте молярной рефракции связано с выбором спектральных линий ($H_\alpha[\lambda = 658,3 \text{ нм}]$ и $H_\gamma[\lambda = 436,1 \text{ нм}]$).

Удельные рефракции аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr рассчитывались по Ур. 19 и 20:

$$r^{\text{add}} = \frac{R^{\text{add}}}{M_{\text{C}_{70}\text{-Lys}}} \approx 0,230 \pm 0,004 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1} \quad (19),$$

$$r^{\text{add}} = \frac{R^{\text{add}}}{M_{\text{C}_{70}\text{-Thr}}} \approx 0,210 \pm 0,002 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1} \quad (20).$$

Значения удельной и молярной рефракций, рассчитанные по правилу аддитивности Эйзенлора, хорошо согласуются с данными, рассчитанными по показателям преломления растворов.

3.2.4. Электропроводности водных растворов

В качестве примера рассмотрим данные по электропроводности водных растворов аддукта C₇₀-Lys. Концентрационная зависимость удельной электропроводности водных растворов C₇₀-Lys при 298,15 К рассчитывалась из экспериментальных данных по удельному сопротивлению растворов (ρ) согласно Ур. 21:

$$\kappa = \frac{1}{\rho} \quad (21).$$

Из полученных данных (Табл. 11) следует, что концентрационная зависимость удельной электропроводности $\kappa(C_M)$ (C_M — молярная концентрация водного раствора C₇₀-Lys) возрастает с увеличением концентрации. Молярная электропроводность (λ) водных растворов C₇₀-Lys рассчитывалась по Ур. 22:

$$\lambda = \frac{1000\kappa}{C_M} \quad (22),$$

где C_M — молярность раствора, κ — удельная электропроводность раствора.

Экспериментальные данные по молярным электропроводностям водных растворов C₇₀-Lys в диапазоне концентраций (0 - 5 г·дм⁻³) представлены в Табл. 11. Определение молярной электропроводности в бесконечно разбавленных растворах (λ_0) проводилось экстраполяцией зависимости $\lambda(C_M^{1/2})$ на $C_M^{1/2} = 0$ согласно уравнению Онзагера:

$$\lambda = \lambda_0 - A \cdot C_M^{1/2} \quad (23),$$

где A — постоянная в условиях эксперимента.

Кажущаяся степень диссоциации (α) была рассчитана по Ур. 24:

$$\alpha = \frac{\lambda}{\lambda_0} \quad (24).$$

Расчётные значения кажущейся степени диссоциации представлены в Табл. 11 ($\lambda_0 \approx 0,9 \cdot 10^3 \text{ См} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$). Анализ Табл. 11 показывает, что во всём диапазоне

концентраций C₇₀-Lys является электролитом средней силы. Для диссоциации аддукта предполагается протонный механизм диссоциации согласно следующей схеме:



По закону разбавления Оствальда была рассчитана концентрационная зависимость константы диссоциации K_d от концентрации (без учёта коэффициентов активности ионов и недиссоциированных молекул: $\gamma_i = \gamma_{\pm} = 1$):

$$K_d = \frac{C_M \alpha^2}{1 - \alpha} \quad (26).$$

Термодинамическая константа диссоциации ($K_d^{\text{терм.}}$) рассчитывалась экстраполяцией зависимости $K_d(C_M)$ в область бесконечно разбавленного раствора:

$$K_d^{\text{терм.}} = \lim_{C_M \rightarrow 0} K_d \quad (27).$$

Учитывая, что водные растворы C₇₀-Lys образуют ассоциаты и аминокислотные фрагменты могут быть скрыты при образовании ассоциатов в растворе, значение константы диссоциации является условным. Для аддукта C₇₀-Lys значение показателя термодинамической константы диссоциации ($pK_d^{\text{терм.}}$) составляет 3,4. Для сравнения с аддуктом C₇₀-Lys, значение pK_a карбоксильной группы L-лизина равно 2,18. Таким образом, фуллереновый кор уменьшает диссоциацию карбоксильной группы и снижает кислотность карбоксильной группы в составе C₇₀-Lys.

Табл. 11. Экспериментальные данные по электропроводности водных растворов C_{70} -Lys при 298,15 К. C — объёмная концентрация, C_M — молярная концентрация, κ — удельная электропроводность, λ — молярная электропроводность, α — кажущаяся степень диссоциации, K_d — константа диссоциации

C , г·дм ⁻³	C_M , моль·дм ⁻³	κ , См·см ⁻¹	λ , См·см ² ·моль ⁻¹	α	pK_d
0,0000	0,0000	—	900,0	1,000	3,4
			(экстраполяция)	(экстраполяция)	(экстраполяция)
0,0781	$6,911 \cdot 10^{-5}$	$4,899 \cdot 10^{-5}$	708,8	0,787	3,7
0,1563	$1,383 \cdot 10^{-4}$	$8,301 \cdot 10^{-5}$	600,2	0,666	3,7
0,3125	$2,765 \cdot 10^{-4}$	$1,175 \cdot 10^{-4}$	425,0	0,472	3,9
0,6250	$5,531 \cdot 10^{-4}$	$2,128 \cdot 10^{-4}$	384,7	0,427	3,8
1,2500	0,00111	$3,673 \cdot 10^{-4}$	332,1	0,368	3,6
2,5000	0,00221	$6,419 \cdot 10^{-4}$	290,1	0,322	3,5
5,0000	0,004425	$8,942 \cdot 10^{-4}$	202,1	0,224	3,5

3.2.5. Поверхностные свойства водных растворов

Рассмотрим полученные результаты на примере аддукта C_{70} -Thr. На Рис. 31 представлен пример кинетической зависимости изменения поверхностного натяжения в водном растворе аддукта C_{70} -Thr. Установлено отсутствие поверхностной активности водных растворов C_{70} -Thr (в диапазоне концентраций до 1 г·л⁻¹) в течение 16 ч кинетических экспериментов. За это время поверхностное натяжение соответствовало поверхностному натяжению чистой воды (72,8 мН·м⁻¹) в пределах точности измерения ($\pm 0,5$ мН·м⁻¹). После этого наблюдалось незначительное снижение поверхностного натяжения водных растворов C_{70} -Thr до 72,2 мН·м⁻¹. В более концентрированных растворах наблюдалось более значительное снижение поверхностного натяжения.

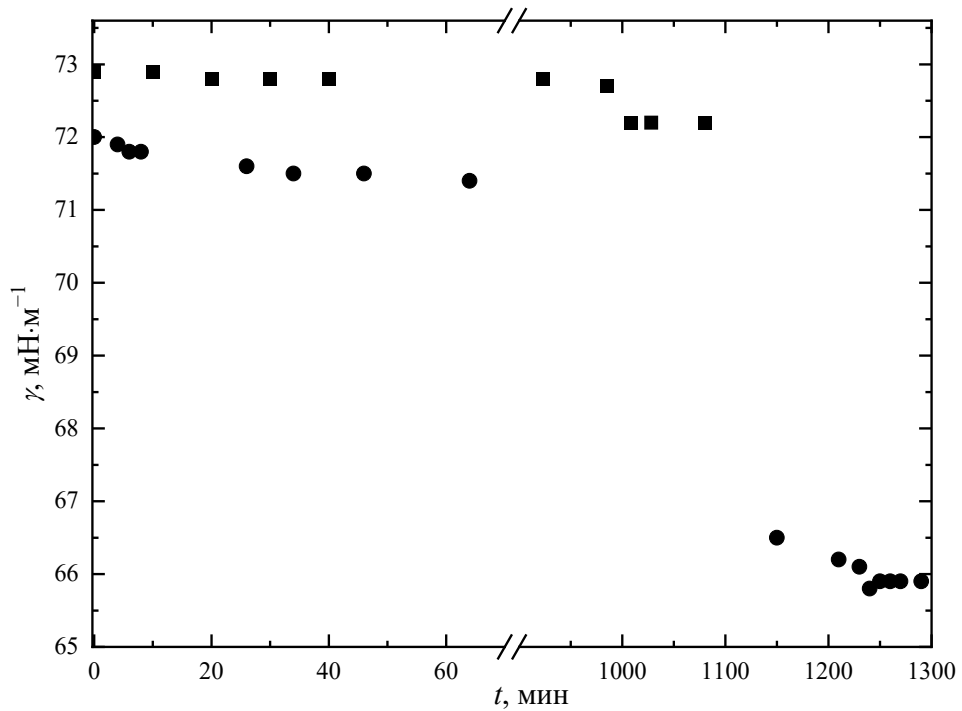


Рис. 31. Кинетическая зависимость изменения поверхностного натяжения в водном растворе C_{70} -Thr: (■) $0,1 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$, (○) $2 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$.

Концентрационная зависимость поверхностного натяжения водных растворов C_{70} -Thr показывает, что с увеличением концентрации C_{70} -Thr увеличивается поверхностная активность и одновременно уменьшаются значения поверхностного натяжения (см. Рис. 32). Длительный период индукции на кинетических зависимостях поверхностного натяжения указывает на то, что адсорбционный слой неоднороден и, вероятно, состоит из ассоциатов отдельных молекул аддукта C_{70} -Thr. В то же время, медленная скорость изменения поверхностного натяжения водных растворов C_{70} -Thr показывает, что кинетика адсорбции не контролируется диффузией из объёмной фазы к поверхности.

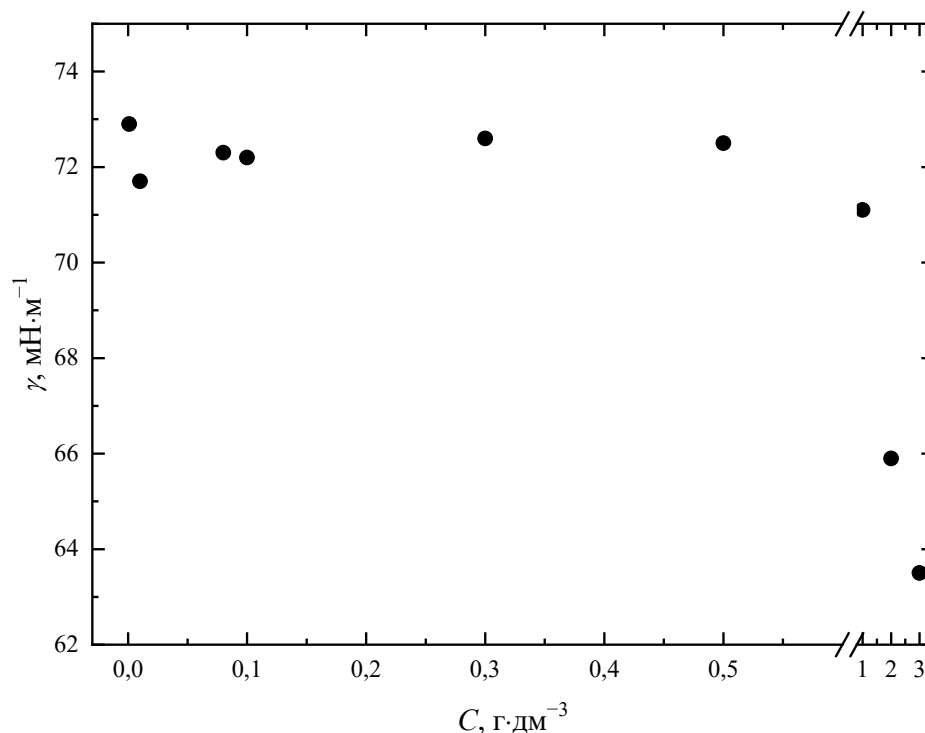
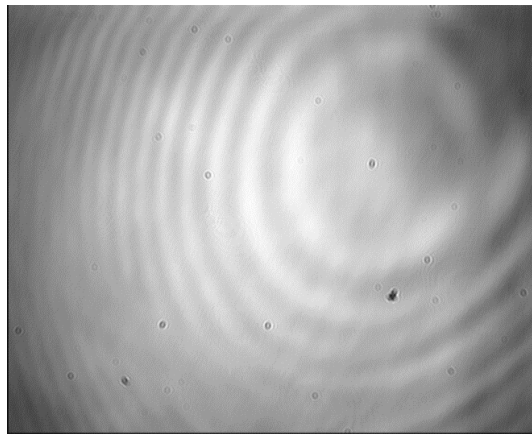


Рис. 32. Концентрационная зависимость поверхностного натяжения водных растворов C_{70} -Thr.

Изображения, полученные с помощью ВАМ (Рис. 33), демонстрируют образование плотной плёнки, состоящей из ассоциатов аддукта C_{70} -Thr. В свою очередь, изображение поверхностных плёнок водных растворов C_{70} -Thr, полученное с помощью АСМ, выявляет образование непрерывной адсорбционной плёнки, состоящей из областей с низкой плотностью и ассоциатов C_{70} -Thr, имеющих максимальный линейный размер 200 нм. В качестве примера на Рис. 34 представлено изображение плёнки, полученной из водного раствора C_{70} -Thr с концентрацией 0,1 г·л⁻¹, полученное с помощью АСМ. В последнем случае отчётливо видны ассоциаты C_{70} -Thr с линейными размерами 15–50 нм.

(a)



(б)

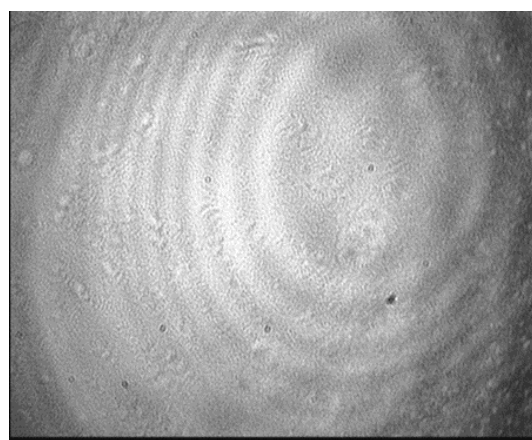


Рис. 33. Изображения ВАМ поверхности чистой воды (а) и поверхности водного раствора C_{70} -Thr ($C = 2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$) через 2 ч после начала эксперимента (б).

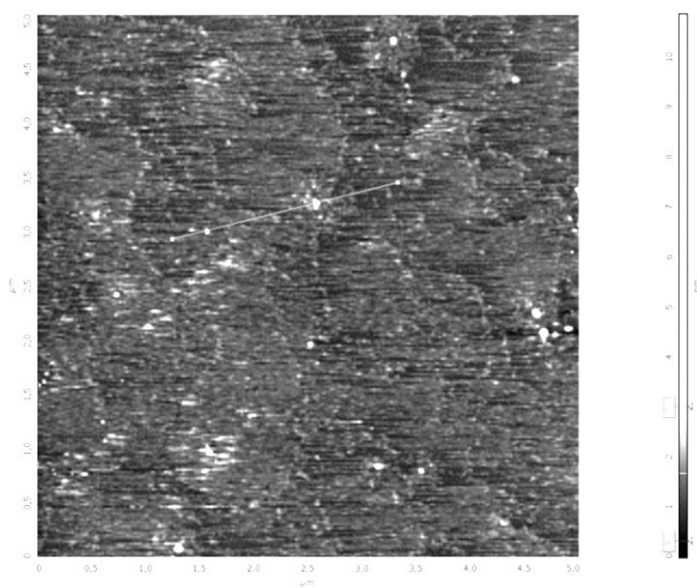


Рис. 34. Изображение АСМ поверхностных плёнок водных растворов C_{70} -Thr ($C = 0,1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$).

3.2.6. Избыточные термодинамические функции

Для расчёта избыточных термодинамических функций и границ устойчивости растворов водорастворимых аддуктов фуллеренов C₇₀-Lys, C₇₀-Thr по отношению к фазовому разделению был применён подход, основанный на использовании полуэмпирической модели VD-AS (Virial Decomposition Asymmetric Model) вириального разложения избыточной молярной энергии Гиббса раствора по мольным долям компонентов [162–164]:

$$\frac{G^{ex}}{RT} = (n_1 + n_2) \sum_{i=1} \sum_{j=1} x_1^i x_2^j \cdot \lambda_{ij} = \frac{\sum_{i=1} \sum_{j=1} n_1^i n_2^j \cdot \lambda_{ij}}{(n_1 + n_2)^{i+j-1}} \quad (28),$$

где G^{ex} — полная молярная избыточная энергия Гиббса раствора, $R = 8,31$ Дж·К⁻¹, T — температура, n_i и x_i — число молей и мольная доля i -го компонента (нижний индекс i относится к аддукту фуллерена, индекс 2 относится к воде), λ_{ij} — вириальный коэффициент в разложении $\frac{G^{ex}}{RT}$ по числам молей компонентов (верхние пределы суммирования в общем случае не лимитированы и могут быть произвольными), λ_{ij} отождествляется с приведённой (к RT) неспецифической энергией взаимодействия i частиц 1-го компонента и j частиц 2-го компонента.

Следует отметить, что при использовании только одного члена в подобном разложении реализуется хорошо известная модель строго регулярных растворов, при допущении температурной зависимости единственного вириального коэффициента — модель квазирегулярных растворов, при использовании третьих вириальных коэффициентов — модель субрегулярных растворов и модель EFLCP, наконец, при дополнительном использовании в разложении вклада электростатических неспецифических взаимодействий согласно теории Дебая-Хюккеля — модель Питцера в различных модификациях.

Экспериментальные значения понижения температуры замерзания льда для бинарных систем C₇₀-Lys–H₂O и C₇₀-Thr–H₂O представлены на Рис. 35, 36 и в Табл. 12, 13. Нелинейное поведение функции $\Delta T(x)$ указывает на неидеальность водных растворов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr. Кроме того, для бинарной системы C₇₀-Lys–H₂O и C₇₀-Thr–H₂O понижение температуры замерзания льда значительно превышает соответствующие значения, полученные для идеальных растворов.

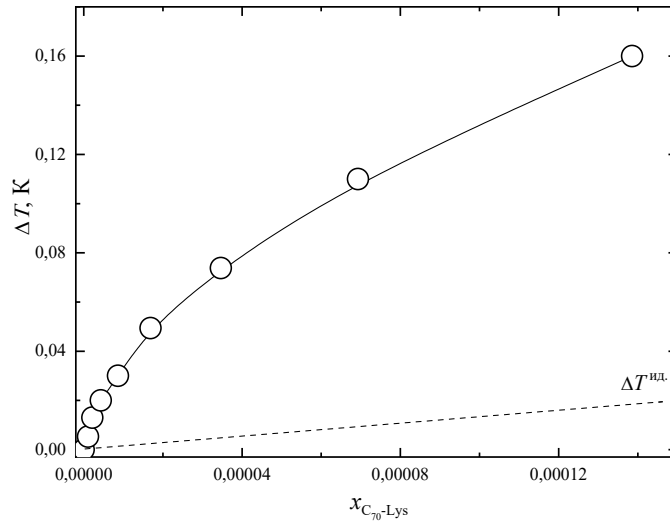


Рис. 35. Понижение температуры замерзания льда (ΔT) для бинарной системы C_{70} -Lys– H_2O . $x_{C_{70}\text{-Lys}}$ — мольная доля C_{70} -Lys в водном растворе. Пунктирная линия соответствует снижению температуры замерзания льда идеальных растворов неэлектролитов.

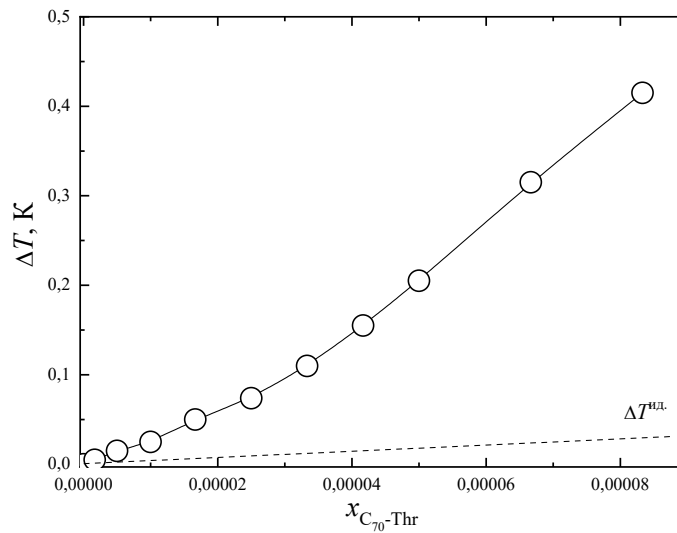


Рис. 36. Понижение температуры замерзания льда (ΔT) для бинарной системы C_{70} -Thr– H_2O . $x_{C_{70}\text{-Thr}}$ — мольная доля C_{70} -Thr в водном растворе. Пунктирная линия соответствует снижению температуры замерзания льда идеальных растворов неэлектролитов.

Табл. 12. Криоскопические данные и избыточные термодинамические функции бинарной системы C₇₀-Lys-H₂O. $x_{C_{70}\text{-Lys}}$ — мольная доля C₇₀-Lys в водном растворе, ΔT — понижение температуры замерзания льда, $\ln a_{H_2O}$, $\ln \gamma_{H_2O}$ — логарифмы активности и коэффициента активности воды, $\ln \gamma_{C_{70}\text{-Lys}}^{\text{несим.}}$ — логарифм коэффициента активности C₇₀-Lys в «несимметричной» шкале нормировки коэффициентов активности.

$x_{C_{70}\text{-Lys}}$	ΔT , К	$\ln a_{H_2O}$	$\ln \gamma_{H_2O}$	$\ln \gamma_{C_{70}\text{-Lys}}^{\text{несим.}}$
$1,083 \cdot 10^{-6}$	0,005	$-5,86 \cdot 10^{-5}$	$-5,75 \cdot 10^{-5}$	3,38
$2,166 \cdot 10^{-6}$	0,013	$-1,44 \cdot 10^{-4}$	$-1,42 \cdot 10^{-4}$	6,65
$4,332 \cdot 10^{-6}$	0,020	$-2,22 \cdot 10^{-4}$	$-2,18 \cdot 10^{-4}$	12,9
$8,66 \cdot 10^{-6}$	0,030	$-3,33 \cdot 10^{-4}$	$-3,25 \cdot 10^{-4}$	24,3
$1,73 \cdot 10^{-5}$	0,050	$-5,49 \cdot 10^{-4}$	$-5,32 \cdot 10^{-4}$	42,2
$3,46 \cdot 10^{-5}$	0,075	$-8,22 \cdot 10^{-4}$	$-7,87 \cdot 10^{-4}$	66,0
$6,92 \cdot 10^{-5}$	0,11	-0,00122	-0,00116	72,5
$1,38 \cdot 10^{-4}$	0,16	-0,00178	-0,00164	73,1

Табл. 13. Криоскопические данные и избыточные термодинамические функции бинарной системы C₇₀-Thr-H₂O. $x_{C_{70}\text{-Thr}}$ — мольная доля C₇₀-Thr в водном растворе, ΔT — понижение температуры замерзания льда, $\ln a_{H_2O}$, $\ln \gamma_{H_2O}$ — логарифмы активности и коэффициента активности воды, $\ln \gamma_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{несим.}}$ — логарифм коэффициента активности C₇₀-Thr в «несимметричной» шкале нормировки коэффициентов активности.

$x_{C_{70}\text{-Thr}}$	$\Delta T, \text{K}$	$\ln a_{H_2O}$	$\ln \gamma_{H_2O}$	$\ln \gamma_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{несим.}}$
$1,67 \cdot 10^{-6}$	0,005	$-5,56 \cdot 10^{-5}$	$-5,40 \cdot 10^{-5}$	5,64
$5,00 \cdot 10^{-6}$	0,015	$-1,67 \cdot 10^{-4}$	$-1,62 \cdot 10^{-4}$	16,2
$1,00 \cdot 10^{-5}$	0,025	$-2,78 \cdot 10^{-4}$	$-2,68 \cdot 10^{-4}$	30,1
$1,67 \cdot 10^{-5}$	0,050	$-5,56 \cdot 10^{-4}$	$-5,40 \cdot 10^{-4}$	45,4
$2,50 \cdot 10^{-5}$	0,074	$-8,22 \cdot 10^{-4}$	$-7,97 \cdot 10^{-4}$	59,5
$3,33 \cdot 10^{-5}$	0,110	-0,00122	-0,00119	68,5
$4,17 \cdot 10^{-5}$	0,155	-0,00173	-0,00168	72,9
$5,00 \cdot 10^{-5}$	0,205	-0,00228	-0,00223	73,1
$6,67 \cdot 10^{-5}$	0,315	-0,00351	-0,00345	62,8
$8,33 \cdot 10^{-5}$	0,415	-0,00463	-0,00455	41,1

Коэффициенты активности воды рассчитывались по Ур. 29:

$$\ln a_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{-\Delta H_{\text{H}_2\text{O}}^f \Delta T - \Delta C_p \Delta T^2}{R(T_0^f - \Delta T)T_0^f} \quad (29),$$

где $\Delta H_{\text{H}_2\text{O}}^f$ — энтальпия плавления льда ($5990 \text{ Дж}\cdot\text{моль}^{-1}$), ΔC_p — изменение изобарной теплоёмкости для процесса плавления льда ($-38,893 \text{ Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$), T_0^f — температура плавления чистого льда ($273,15 \text{ К}$), $\Delta T = T_0^f - T$, T — температура начала процесса кристаллизации в растворе, R — универсальная газовая постоянная.

На основании Ур. 30 рассчитаны коэффициенты активности воды:

$$\ln \gamma_{\text{H}_2\text{O}} = \ln a_{\text{H}_2\text{O}} - \ln x_{\text{H}_2\text{O}} = \ln a_{\text{H}_2\text{O}} - \ln(1 - x_1) \quad (30).$$

Термодинамическое описание бинарных систем $\text{C}_{70}\text{-Lys-H}_2\text{O}$ и $\text{C}_{70}\text{-Thr-H}_2\text{O}$ было выполнено с использованием полуэмпирической асимметричной модели вириального разложения (VD-AS). Эта модель ранее успешно использовалась для термодинамического описания водных растворов водорастворимых аддуктов лёгких фуллеренов, включая карбоксилированные аддукты $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ и $\text{C}_{70}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ [165], фуллеренолы $\text{C}_{60}(\text{OH})_{22-24}$ и $\text{C}_{70}(\text{OH})_{12}$ [166], аддукты фуллеренов с L-аминокислотами $\text{C}_{60}(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2)_2$, $\text{C}_{60}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3)_2$, $\text{C}_{70}(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2)_3$ [167]. Для водных растворов углеродных нанокластеров данная модель была впервые применена профессором кафедры физической химии СПбГТИ(ТУ) Н. А. Чарыковым [168].

На основе модели VD-AS были получены следующие уравнения для расчета избыточных термодинамических функций в «несимметричной» шкале нормировки:

$$\ln \gamma_1^{ass} \approx 2\Lambda_2 x_1 + 3\Lambda_3 x_1^2 + 4\Lambda_4 x_1^3 \quad (31.1),$$

$$\ln \gamma_2^{ass} \approx -\Lambda_2 x_1^2 - 2\Lambda_3 x_1^3 - 3\Lambda_4 x_1^4 \quad (31.2),$$

где

$$\Lambda_i(T) = \sum_{j=1}^i \lambda_{ij} \quad (32).$$

Границы устойчивости растворов аддуктов C_{70} по отношению к разделению фаз были рассчитаны по Ур. 33 с использованием Ур. 31.1 и 31.2:

$$g_{11}^{mix} = \frac{\partial^2 \left(\frac{G^{mix}}{RT} \right)}{\partial x_1^2} = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1 = 0 \quad (33)$$

По полученным данным $\ln \gamma_2(X_1)$ для бинарных систем $\text{C}_{70}\text{-Lys-H}_2\text{O}$ и $\text{C}_{70}\text{-Thr-H}_2\text{O}$ с использованием модели VD-AS по Ур. 33 были получены следующие значения

параметров $A_2 = 1,58 \cdot 10^6$, $A_3 = -1,40 \cdot 10^{10}$, $A_4 = 4,15 \cdot 10^{13}$ (C₇₀-Lys) и $A_2 = 1,73 \cdot 10^6$, $A_3 = -1,55 \cdot 10^{10}$, $A_4 = 3,27 \cdot 10^{13}$ (C₇₀-Thr). В целом, высокие числовые значения параметров не удивительны, потому что они представляют собой сумму, состоящую из тысяч слагаемых, соответствующих взаимодействию нанокластеров с большим количеством молекул воды. Рассчитанные концентрационные зависимости активности и коэффициентов активности C₇₀-Lys и C₇₀-Thr представлены в Табл. 12, 13 и на Рис. 37, 38.

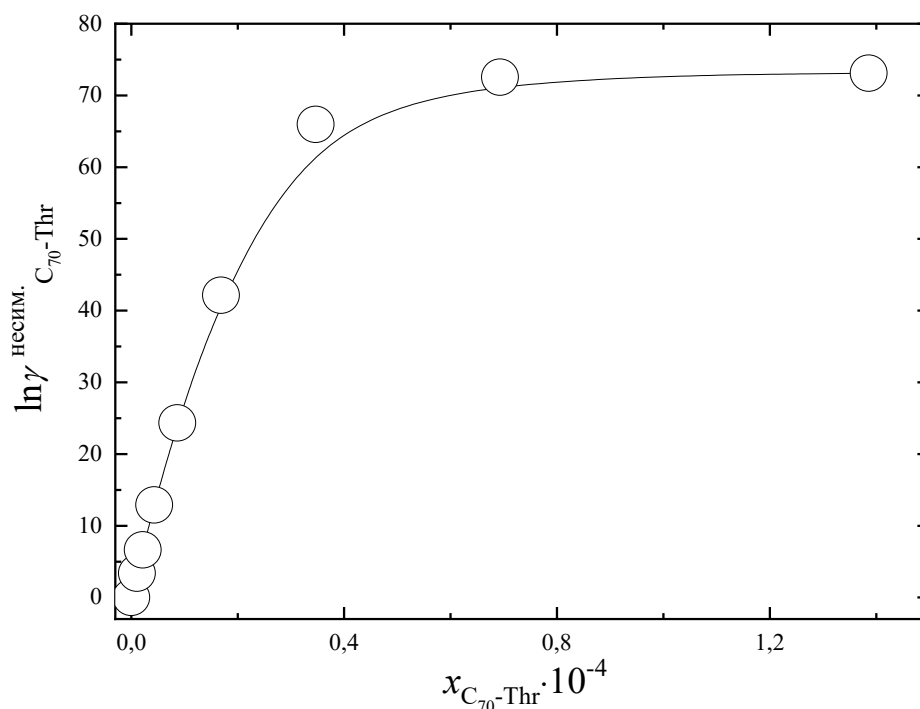


Рис. 37. Концентрационная зависимость логарифма коэффициента активности C₇₀-Lys ($\ln \gamma_{C_{70}\text{-Lys}}^{\text{несим.}}$) в водном растворе. $x_{C_{70}\text{-Lys}}$ — мольная доля C₇₀-Lys в водном растворе.

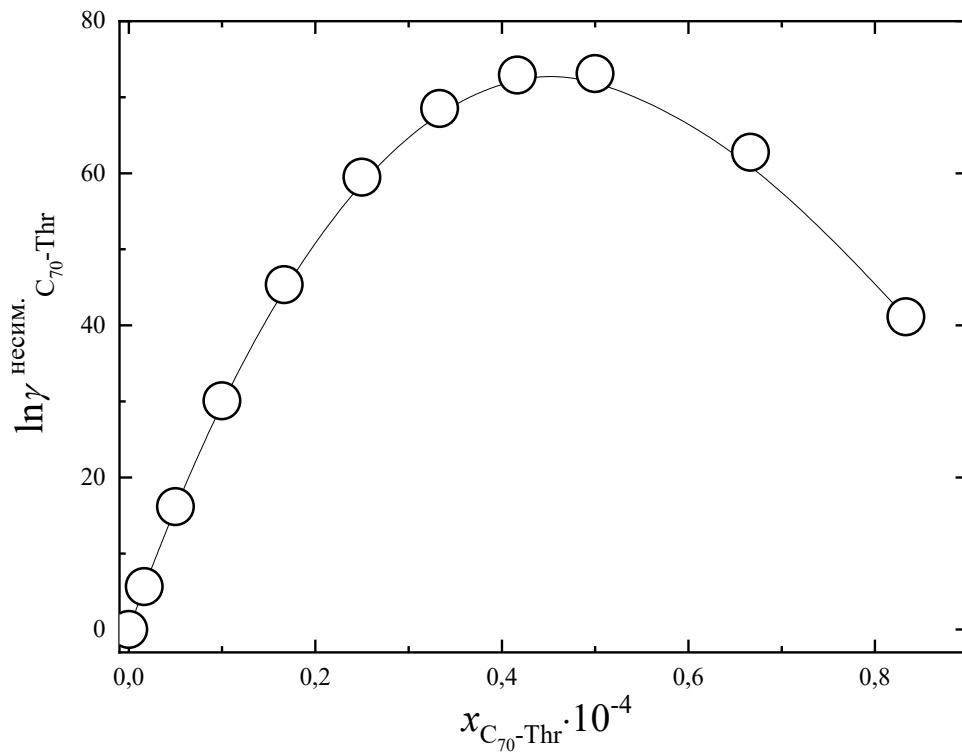


Рис. 38. Концентрационная зависимость логарифма коэффициента активности $C_{70}\text{-Thr}$ ($\ln \gamma_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{несим.}}$) в водном растворе. $x_{C_{70}\text{-Thr}}$ — мольная доля $C_{70}\text{-Thr}$ в водном растворе.

На Рис. 39 и 40 показано пересечение функции $F(x_1) = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1$ с осью абсцисс. Дополнительно можно сделать вывод, что в интервале концентраций до $x_1^{\text{неуст.}} = 6,0 \cdot 10^{-5}$ ($C_{70}\text{-Lys}$) и $x_1^{\text{неуст.}} = 4,7 \cdot 10^{-5}$ ($C_{70}\text{-Thr}$) наблюдается образование стабильных водных растворов фуллереновых аддуктов. Точка пересечения оси ординат с нулевым значением функции соответствует значению концентрации, при которой происходит потеря стабильности раствора. Диапазон концентраций $x_1 > x_1^{\text{неуст.}}$ соответствует расслоению растворов (растворы теряют устойчивость).

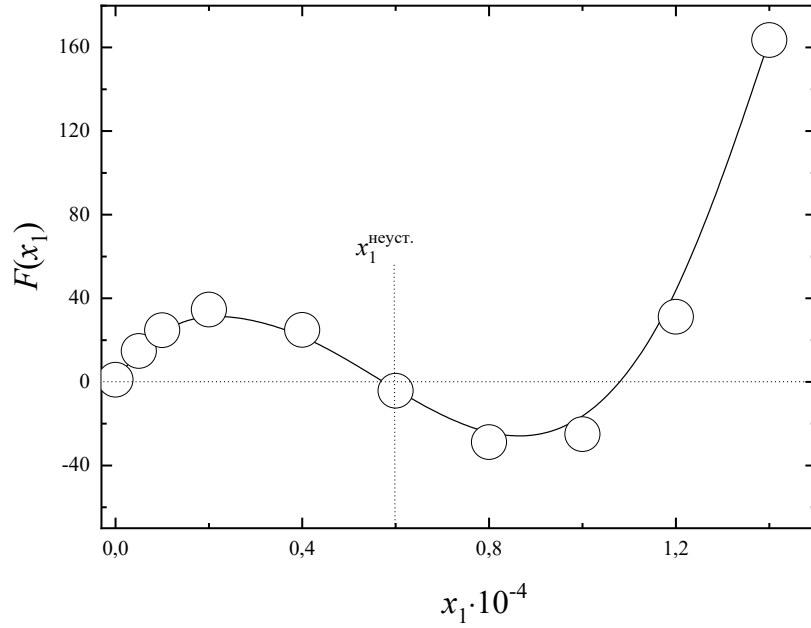


Рис. 39. Концентрационная зависимость $F(x_1) = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1$ для бинарной системы C_{70} -Lys- H_2O . x_1 — мольная доля C_{70} -Lys в водном растворе.

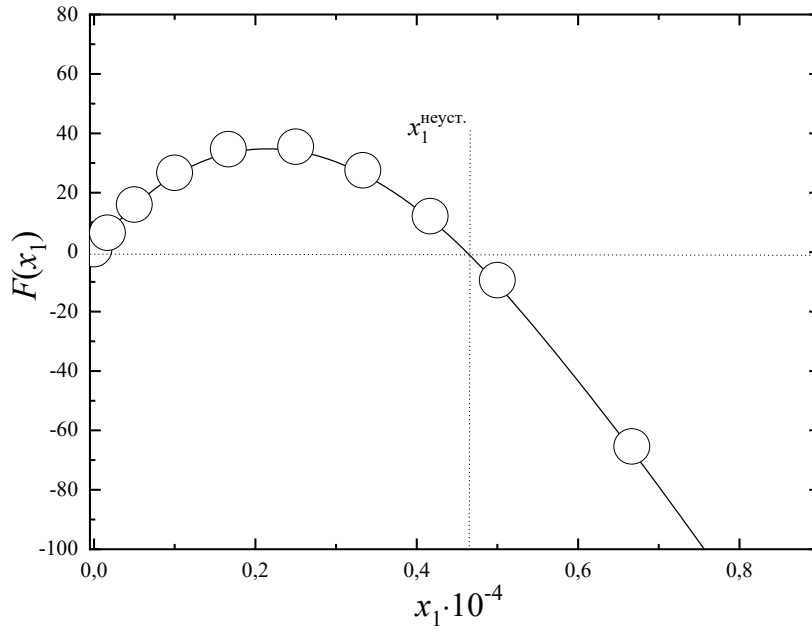


Рис. 40. Концентрационная зависимость функции $F(x_1) = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1$ для бинарной системы C_{70} -Thr- H_2O . x_1 — мольная доля C_{70} -Thr в водном растворе.

3.2.7. Распределение наночастиц по размеру и ζ -потенциалы

В Табл. 14, 15 и Рис. 41, 42 представлены экспериментальные данные по распределению ассоциатов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr по размерам в водных растворах при $T = 298,15$ К. Анализ полученных значений позволяет сделать следующие выводы: (1) мономерные молекулы C₇₀-Lys и C₇₀-Thr с линейными размерами 2 нм не были обнаружены во всём диапазоне концентраций; (2) в области концентраций менее 0,5 г·дм⁻³ наблюдалось образование ассоциатов первого порядка с линейными размерами 30–50 нм и второго порядка с размерами 100–300 нм; (3) при концентрациях свыше 0,5 г·дм⁻³ наблюдалось образование ассоциатов третьего порядка (700–900 нм) и четвёртого порядка (5–6 мкм). Образование ассоциатов третьего порядка соответствует потере устойчивости растворами фуллереновых аддуктов.

Согласно Ур. 34 было рассчитано количество ассоциатов i -го типа, упакованных в ассоциаты $(i + 1)$ -го типа $N_{i \rightarrow i+1}$:

$$N_{i \rightarrow i+1} = \left(\frac{d_{i+1}}{d_i} \right)^3 \cdot K_{\text{упак.}} \quad (34),$$

где $K_{\text{упак.}}$ — формальный коэффициент упаковки «малых сфер» в «большую сферу».

Из-за сравнительно большого размера и одинакового заряда частиц C₇₀-Lys и C₇₀-Thr в водных растворах, приводящего к отталкиванию, был выбран коэффициент упаковки, соответствующий кубической ячейке ($K_{\text{упак.}} \approx 0,52$). Для сравнения, значение $K_{\text{упак.}} = 0,74$ соответствует наиболее плотной упаковке сфер (гранцентрированная кубическая ячейка).

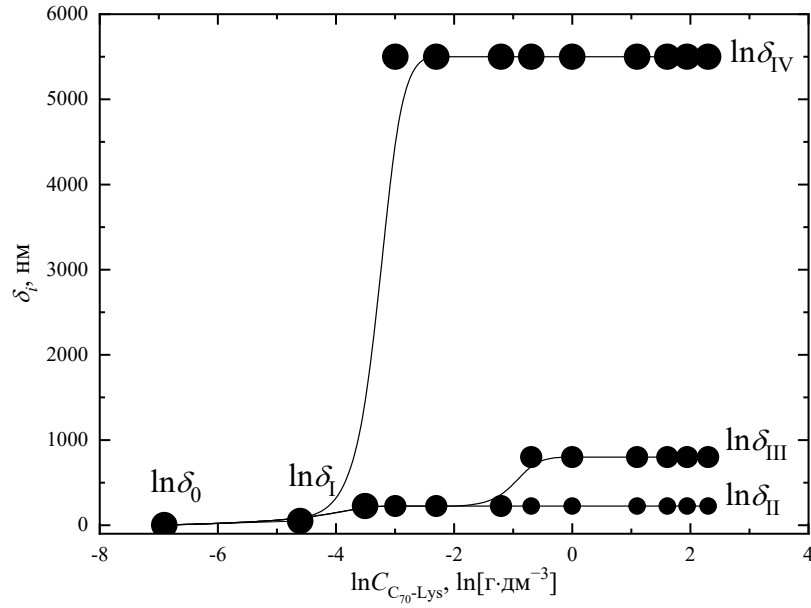


Рис. 41. Концентрационная зависимость линейных размеров ассоциатов C_{70} -Lys в водном растворе при 298,15 К. $C_{C_{70}\text{-Lys}}$ — объёмная концентрация C_{70} -Lys в водном растворе.

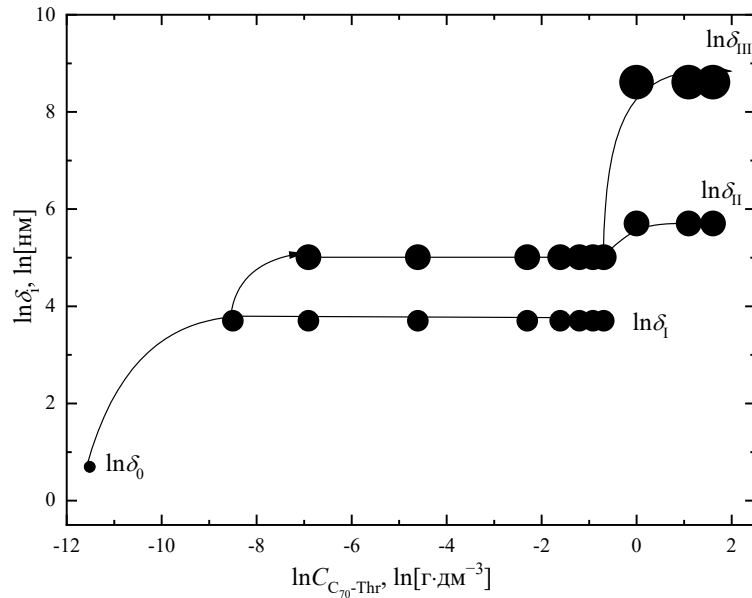


Рис. 42. Концентрационная зависимость линейных размеров ассоциатов C_{70} -Thr в водном растворе при 298,15 К. $C_{C_{70}\text{-Thr}}$ — объёмная концентрация C_{70} -Thr в водном растворе.

Табл. 14. Распределение ассоциатов C₇₀-Lys по размерам в водных растворах при 298,15 К. δ_i — средний диаметр ассоциатов i -го типа. $N_{i \rightarrow j}$ — среднее количество ассоциатов C₇₀-Lys i -го типа в ассоциатах j -го типа, ζ_i — дзета-потенциалы ассоциатов i -го типа.

C , г·дм ⁻³	δ_0 , нм	δ_I , нм	δ_{II} , нм	δ_{III} , нм	δ_{IV} , мкм	$N_{0 \rightarrow 1}$	$N_{0 \rightarrow 2}$	$N_{0 \rightarrow 3}$	$N_{0 \rightarrow 4}$	$N_{1 \rightarrow 2}$	$N_{2 \rightarrow 3}$	$N_{3 \rightarrow 4}$	ζ_{II} , мВ	ζ_{III} , мВ	ζ_{IV} , мВ
0	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,01	—	40–60	150–300	—	—	$8 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^5$	—	—	50	—	170	-20	—	—
0,03	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,05	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,1	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,3	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,5	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
1,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
3,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
5,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
7,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
10,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50

Табл. 15. Распределение ассоциатов C₇₀-Thr по размерам в водных растворах при 298,15 К. δ_i — средний диаметр ассоциатов i -го типа. $N_{i \rightarrow j}$ — среднее количество ассоциатов C₇₀-Thr i -го типа в ассоциатах j -го типа, ζ_i — дзета-потенциалы ассоциатов i -го типа.

C , г·дм ⁻³	δ_0 , нм	δ_I , нм	δ_{II} , нм	δ_{III} , мкм	$N_{0 \rightarrow 1} \cdot 10^{-3}$	$N_{0 \rightarrow 2} \cdot 10^{-4}$	$N_{0 \rightarrow 3} \cdot 10^{-9}$	$N_{1 \rightarrow 2} \cdot 10^{-1}$	$N_{2 \rightarrow 3} \cdot 10^{-3}$	ζ_I , мВ	ζ_{II} , мВ	ζ_{III} , мВ
0	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,001	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	—	—
0,01	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,1	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,2	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,3	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,4	—	30–50	100–200	5–6	2–8	3–30	2–3	3–1000	—	-20	-35	—
0,5	—	30–50	100–200	5–6	2–8	3–30	2–3	3–1000	—	-20	-35	—
1,0	—	—	200–400	5–6	—	30–200	2–3	—	1–10	-20	-35	-55
3,0	—	—	200–400	5–6	—	30–200	2–3	—	1–10	-20	-35	-55
5,0	—	—	200–400	5–6	—	30–200	2–3	—	1–10	-20	-35	-55

Кроме того, на основе экспериментальных значений электрофоретической подвижности была получена концентрационная зависимость ζ -потенциала с использованием уравнения Гельмгольца — Смолуховского, поскольку в случае водных растворов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr $ka \gg 1$ (a — радиус частицы и k — обратная величина дебаевской длины или обратная толщина двойного электрического слоя):

$$\zeta = \frac{u_e \eta}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (35),$$

где u_e — электрофоретическая подвижность, ε — относительная диэлектрическая проницаемость раствора электролита, ε_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума, η — динамическая вязкость жидкой среды.

Ионная сила водного раствора была определена по диссоциации фуллереновых аддуктов. Значения дебаевской длины были определены по следующему уравнению:

$$\delta = \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 D}{\kappa}} \quad (36),$$

где D — коэффициент диффузии протона, κ — удельная электрическая проводимость, ε — относительная диэлектрическая проницаемость раствора электролита, ε_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума. Согласно расчётам дебаевские длины имеют порядок единиц нанометров.

Анализ представленных данных (Рис. 43, 44) показывает, что во всем диапазоне концентраций растворы C₇₀-Lys и C₇₀-Thr обладают агрегативной устойчивостью. Кроме того, распределение ζ -потенциалов соответствует распределению наночастиц по размерам.

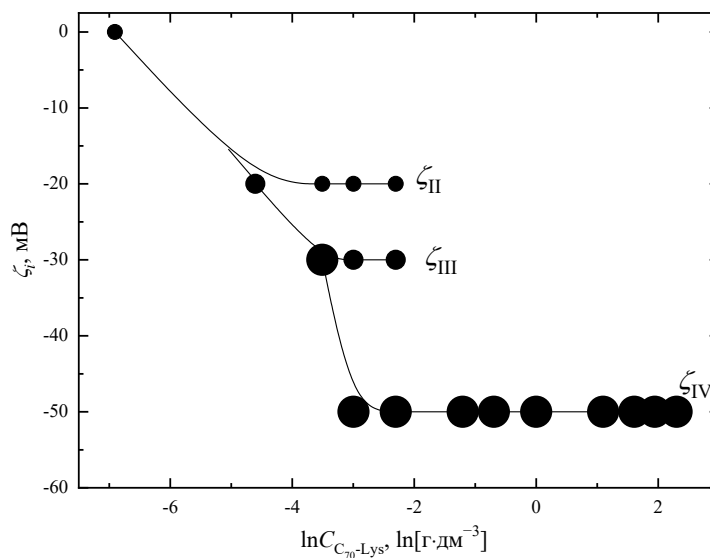


Рис. 43. Концентрационная зависимость ζ -потенциалов ассоциатов C_{70} -Lys в водном растворе при 298,15 К. $C_{C_{70}\text{-Lys}}$ — объёмная концентрация аддукта C_{70} -Lys в водном растворе.

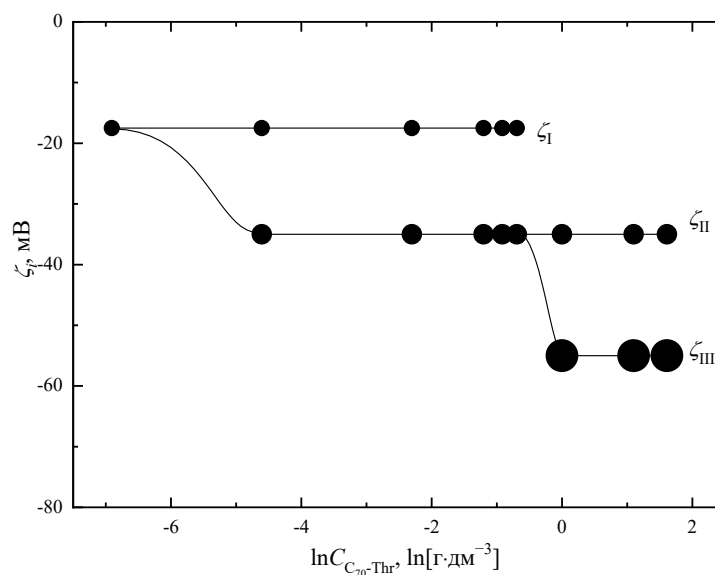


Рис. 44. Концентрационная зависимость ζ -потенциалов ассоциатов C_{70} -Thr в водном растворе при 298,15 К. $C_{C_{70}\text{-Thr}}$ — объёмная концентрация аддукта C_{70} -Thr в водном растворе.

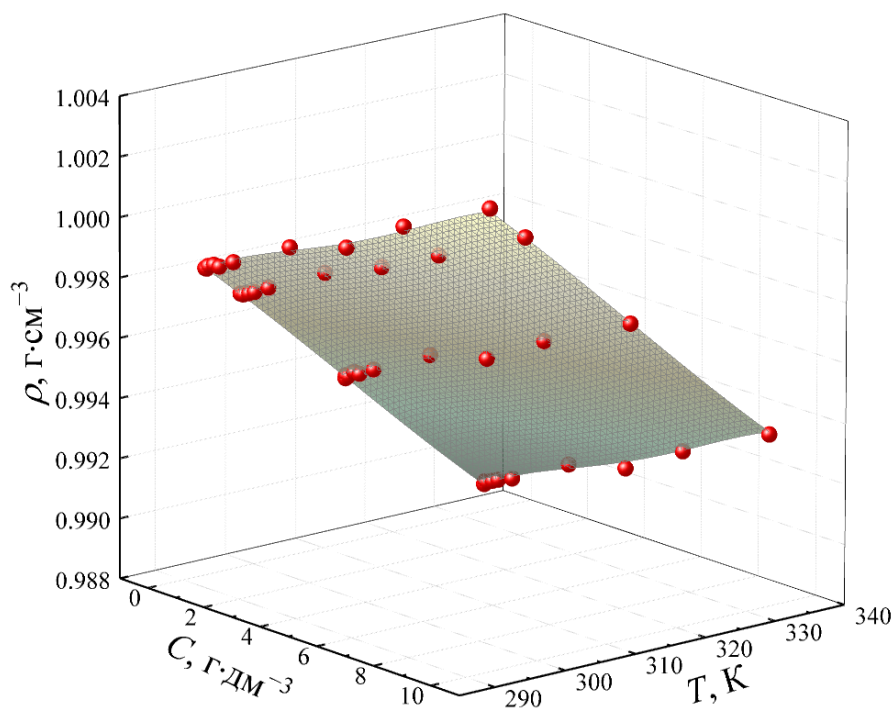
3.2.8. Корреляция экспериментальных данных плотности и вязкости

Температурные и концентрационные зависимости плотности и вязкости были описаны с использованием следующей полиномиальной функции четвёртого порядка, $M(T, x)$:

$$M = A + \sum_{i=1}^4 b_i \cdot T^i + \sum_{j=1}^4 b_j \cdot C^j \quad (37),$$

где M — свойство раствора (плотность, динамическая вязкость), C — объёмная концентрация $C_{70}\text{-Lys}$ и $C_{70}\text{-Thr}$, T — абсолютная температура, A , b_i ($i = 1-8$) — эмпирические параметры, рассчитанные с использованием метода наименьших квадратов в программе MATLAB. Полученные результаты представлены на Рис. 45, 46 и в Табл. 16.

(a)



(б)

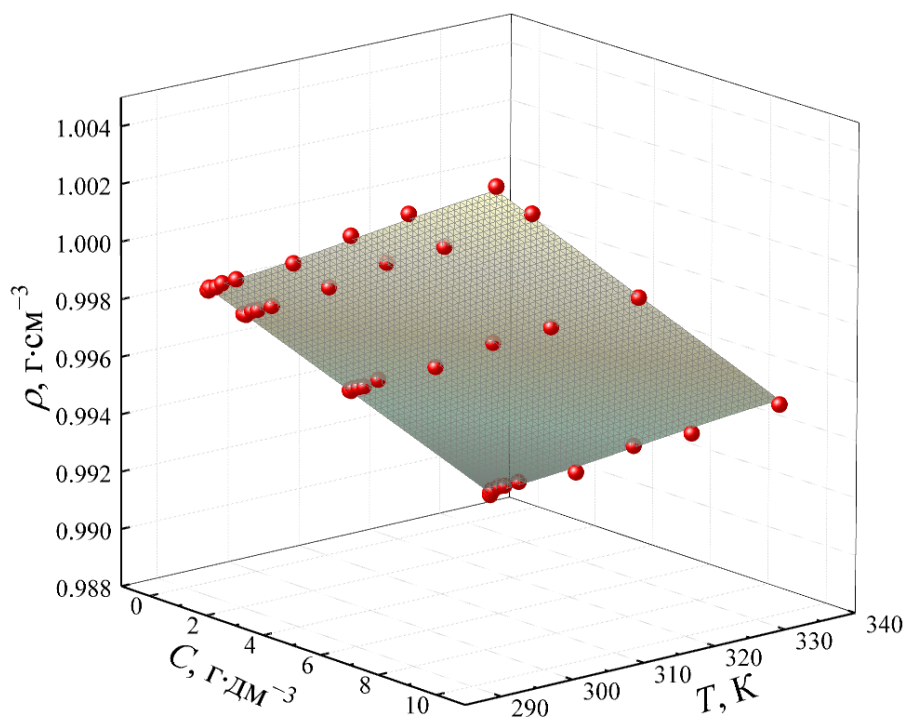
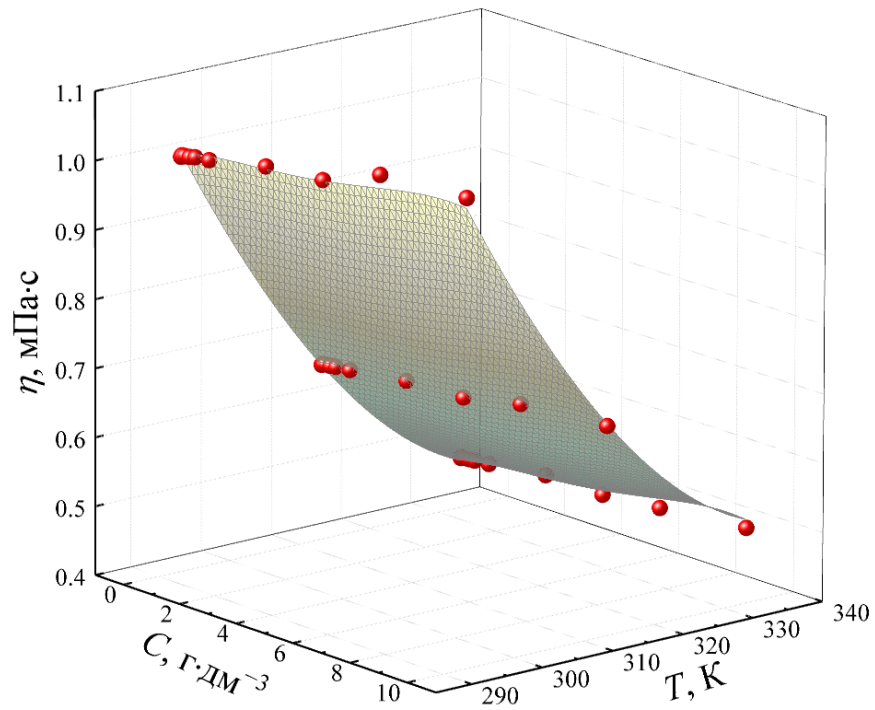


Рис. 45. Температурная (T) и концентрационная (C) зависимость плотности (ρ) водных растворов C_{70} -Lys (a) и C_{70} -Thr (б). Экспериментальные данные — красные сферы, расчётные данные — поверхности.

(a)



(б)

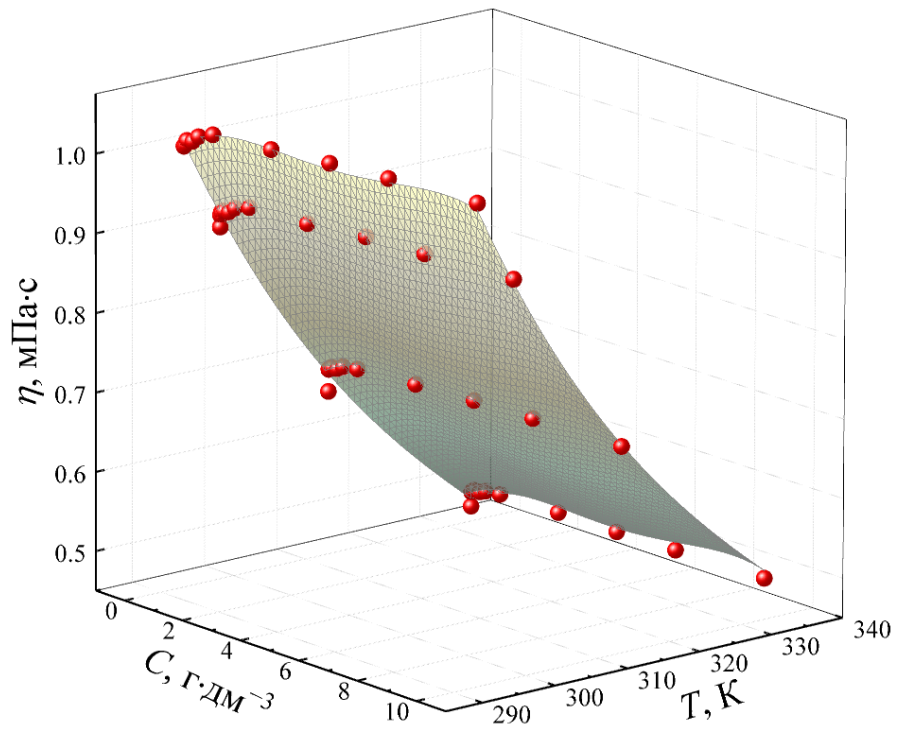


Рис. 46. Температурная (T) и концентрационная (C) зависимость вязкости (η) водных растворов C_{70} -Lys (a) и C_{70} -Thr (b). Экспериментальные данные — красные сферы, расчётные данные — поверхности.

Табл. 16. Корреляционные параметры A , b_i ($i = 1-8$) полиномиального уравнения (35), описывающего температурные и концентрационные зависимости плотностей (ρ) и динамических вязкостей (η) водных растворов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr. R^2 — коэффициент детерминации.

Свойств о раствора	A	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	b_6	b_7	b_8	R^2
C ₇₀ -Lys										
$\rho / \text{Г}\cdot\text{см}^{-3}$	0,761	$6,805 \cdot 10^{-4}$	$-1,007 \cdot 10^{-4}$	$1,518 \cdot 10^{-5}$	$-7,006 \cdot 10^{-7}$	0,00185	$-1,231 \cdot 10^{-6}$	$-1,607 \cdot 10^{-8}$	$2,774 \cdot 10^{-11}$	0,9994
		4	4		7		6	8		8
$\eta / \text{мПа}\cdot\text{с}$	9,253	0,0109	-0,0035	$6,434 \cdot 10^{-4}$	$-3,495 \cdot 10^{-5}$	-0,0109	$-7,976 \cdot 10^{-5}$	$-1,361 \cdot 10^{-7}$	$7,096 \cdot 10^{-10}$	0,9990
					5		5	7		2
C ₇₀ -Thr										
$\rho / \text{Г}\cdot\text{см}^{-3}$	1,052	$6,035 \cdot 10^{-4}$	$1,536 \cdot 10^{-5}$	$-1,101 \cdot 10^{-6}$	$1,151 \cdot 10^{-8}$	$-1,621 \cdot 10^{-5}$	$-1,187 \cdot 10^{-6}$	$2,843 \cdot 10^{-9}$	$-2,538 \cdot 10^{-1}$	0,9994
		4		6		5	6		2	8
$\eta / \text{мПа}\cdot\text{с}$	47,50	0,0283	-0,0103	0,00147	$-6,863 \cdot 10^{-5}$	-0,263	$-6,067 \cdot 10^{-5}$	$2,455 \cdot 10^{-6}$	$-3,533 \cdot 10^{-5}$	0,9988
	5				5		5			3

3.3. Биосовместимость аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr

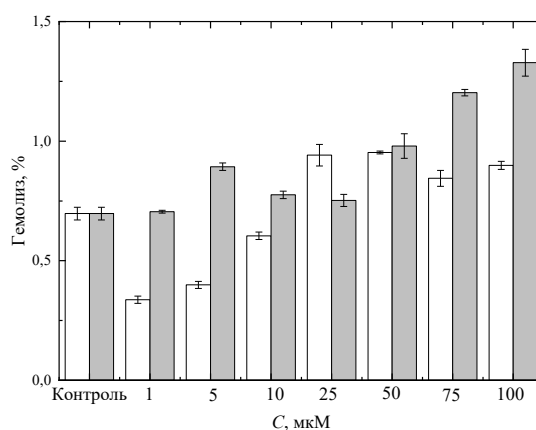
3.3.1. Гемосовместимость

3.3.1.1. Спонтанный гемолиз

Для оценки биосовместимости аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr изучали их влияние на спонтанный гемолиз. В случае веществ, совместимых с кровью, мембрана эритроцита остаётся неповреждённой и содержимое клетки не высвобождается. В этом случае токсичность C₇₀-Lys и C₇₀-Thr определяли путём оценки высвободившегося гемоглобина.

Результаты процента гемолиза эритроцитов, инкубированных с аддуктами C₇₀-Lys и C₇₀-Thr, представлены на Рис. 47. Величина гемолиза составляет менее 5 %, что свидетельствует о гемосовместимости полученных наноматериалов [169].

(а)



(б)

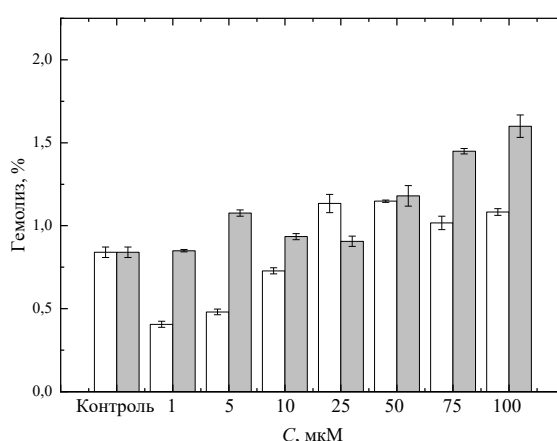


Рис. 47. Влияние аддуктов C₇₀-Lys (а) и C₇₀-Thr (б) на спонтанный гемолиз после инкубации в течение □ — 1 ч, ■ — 3 ч.

3.3.1.2. Агрегация тромбоцитов

Результаты измерения влияния аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr на агрегацию тромбоцитов человека в присутствии индукторов агрегации тромбоцитов представлены в Табл. 17. Аддукт C_{70} -Lys в диапазоне концентраций 10-100 мкМ продемонстрировал антиагрегантную активность в тестах АДФ-, коллаген- и адреналин-индуцированной агрегации. В то же время аддукт C_{70} -Thr обладает антиагрегантной активностью в тестах на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ и коллагеном в диапазоне концентраций 1-100 мкМ. Напротив, агрегация, вызванная адреналином, не имеет статистически значимых изменений в исследуемом диапазоне концентраций.

3.3.1.3. Плазменно-коагуляционный гемостаз

Полученные данные по изучению влияния аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr на показатели плазменно-коагуляционного гемостаза представлены в Табл. 18. Аддукты C_{70} -Lys и C_{70} -Thr демонстрируют наличие антикоагулянтных свойств, которые статистически значимо отличаются по сравнению с контролем, увеличивая АПТВ и ПВ при всех изученных концентрациях.

Табл. 17. Влияние C₇₀-Lys и C₇₀-Thr на АДФ, коллаген, адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме.

Аддукт	Индуктор	Контроль	Амплитуда, %				
			C (аддукта), мкМ				
			10	25	50	75	100
C ₇₀ -Lys	АДФ	70,2 ± 2,8	66,1 ± 1,5*	66,7 ± 1,3*	70,7 ± 1,4*	62,4 ± 1,8*	66,7 ± 1,0*
	Коллаген	87,0 ± 2,1	66,9 ± 2,1*	77,4 ± 2,5*	77,6 ± 4,2*	76,3 ± 1,8*	73,3 ± 2,4*
	Адреналин	79,8 ± 3,8	82,4 ± 3,9	78,0 ± 5,1	73,8 ± 0,9*	73,2 ± 1,7*	72,5 ± 1,4*
C ₇₀ -Thr	АДФ	65,0 ± 1,8	60,3 ± 1,1	55,8 ± 1,3*	53,4 ± 1,9*	47,7 ± 1,3*	45,9 ± 1,3*
	Коллаген	74,4 ± 1,7	70,3 ± 2,7	64,6 ± 1,7*	60,2 ± 1,1*	54,1 ± 1,3*	54,0 ± 1,8*
	Адреналин	71,8 ± 4,9	71,2 ± 4,4	68,8 ± 5,3	69,2 ± 4,5	69,4 ± 5,4	65,4 ± 5,1

* — статистически значимо по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Табл. 18. Влияние C₇₀-Lys и C₇₀-Thr на показатели плазменно-коагуляционного гемостаза.

Аддукт	Тест	Норма	Контроль	C (аддукта), мкМ					
				1	5	10	50	75	100
				Время свёртывания, с					
C ₇₀ -Lys	АПТВ, с	28–40	32,8 ± 1,0	36,8 ± 0,5*	39,5 ± 1,4*	40,3 ± 0,9*	42,5 ± 1,2*	46,8 ± 2,0*	44,9 ± 1,8*
	ПВ, с	13–18	17,3 ± 1,8	18,9 ± 1,7*	17,4 ± 2,1*	19,0 ± 2,3*	20,6 ± 0,7*	24,7 ± 1,8*	28,6 ± 1,7*
C ₇₀ -Thr	АПТВ, с	28–40	36,5 ± 0,9	45,6 ± 0,8*	46,0 ± 1,7*	47,3 ± 1,5*	48,3 ± 1,6*	52,6 ± 2,5*	57,8 ± 1,3*
	ПВ, с	13–18	13,6 ± 1,5	20,1 ± 1,4*	21,3 ± 2,0*	21,0 ± 2,1*	22,1 ± 1,2*	21,1 ± 1,5*	21,2 ± 0,6*

* — статистически значимо по отношению к контролю ($p < 0,05$)

3.3.1.4. Связывание с ЧСА

ЧСА имеет три основных сайта связывания лигандов: (1) сайт I, расположенный в субдомене ПА (сайт связывания варфарина); (2) сайт II, расположенный в субдомене ША (сайт связывания ибупрофена); (3) сайт III, расположенный в субдомене IV (сайт связывания дигитонина). Для идентификации сайтов связывания C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ЧСА были проведены эксперименты по конкурентному связыванию в присутствии маркеров сайтов связывания. Для определения констант связывания (K_b), а также стехиометрии реакции связывания (n) было использовано уравнение Скэтчарда:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg Q \quad (38),$$

где F_0 — интенсивность флуоресценции ЧСА в отсутствие C_{70} -Lys и C_{70} -Thr, F — интенсивность флуоресценции ЧСА в присутствии C_{70} -Lys и C_{70} -Thr, Q — молярная концентрация C_{70} -Lys и C_{70} -Thr.

На Рис. 48 представлены данные по связыванию ЧСА с C_{70} -Lys и C_{70} -Thr в координатах Хилла ($\lg \frac{F_0 - F}{F}$ от $\lg Q$). Видно, что в случае C_{70} -Lys и C_{70} -Thr полученная зависимость имеет точку перегиба, что соответствует наличию двух сайтов связывания. При этом в концентрационном диапазоне $C = 0,3 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ М происходит связывание с первым сайтом, а в концентрационном диапазоне $C = 6 \cdot 10^{-6} - 24 \cdot 10^{-6}$ М — со вторым.

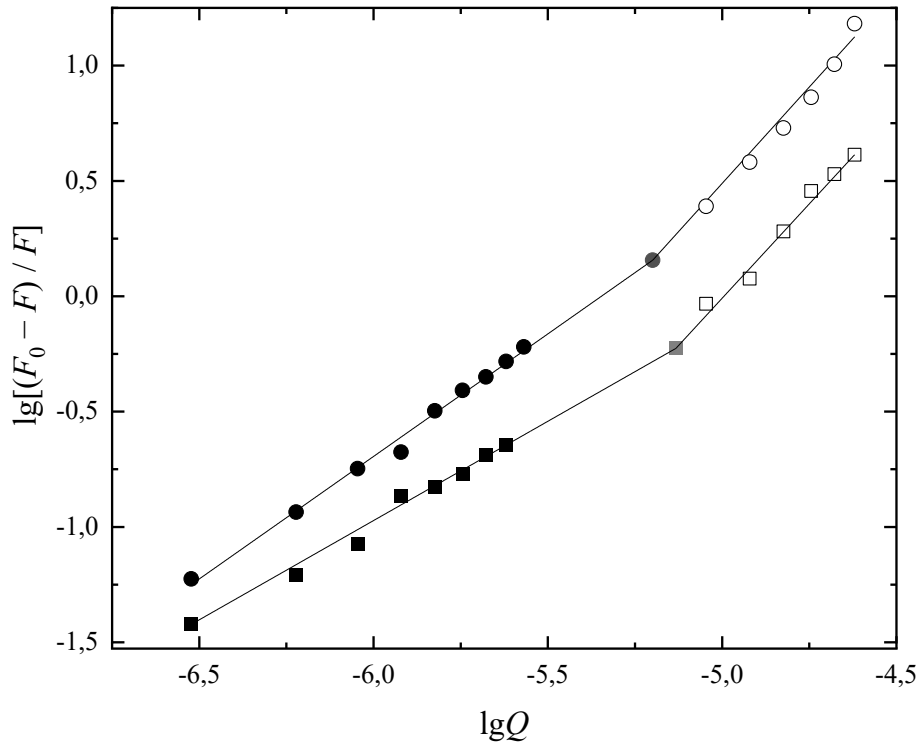


Рис. 48. Зависимость в координатах Хилла процесса связывания ЧСА с C_{70} -Thr (■) и C_{70} -Lys (●): ● — первый участок; ○ — второй участок; ● — точка перегиба.

Параметры связывания C_{70} -Lys и C_{70} -Thr (n и $\lg K_b$) со вторым сайтом ЧСА определялись как разность угловых коэффициентов прямых и величин отрезков, отсекаемых прямыми для двух концентрационных диапазонов: $C = 6 \cdot 10^{-6} - 24 \cdot 10^{-6}$ М и $C = 0,3 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ М. Из полученных данных (Табл. 19) видно, что: (1) в концентрационном диапазоне $C = 0,3 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ М для C_{70} -Thr наблюдается уменьшение $\lg K_b$ и n в присутствии варфарина, для C_{70} -Lys — в присутствии дигитонина; (2) в концентрационном диапазоне $C = 6 \cdot 10^{-6} - 24 \cdot 10^{-6}$ М наблюдается уменьшение $\lg K_b$ и n для C_{70} -Thr в присутствии дигитонина, для C_{70} -Lys — в присутствии ибупрофена. Исходя из величин констант связывания (Табл. 20) можно заключить, что C_{70} -Thr образует прочный комплекс с ЧСА в субдомене ПА и слабо взаимодействует с субдоменом ИВ, C_{70} -Lys образует прочный комплекс с ЧСА в субдомене ИВ и слабо взаимодействует с субдоменом ША.

Табл. 19. Значения логарифмов констант связывания ($\lg K_b$) и стехиометрия реакции связывания (n) C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ЧСА.

Маркер сайта	$C = 3 \cdot 10^{-7} - 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$				$C = 6 \cdot 10^{-6} - 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$			
	$\lg K_b, \lg M^{-1}$		n		$\lg K_b, \lg M^{-1}$		n	
	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr
Без маркеров	$4,26 \pm 0,03$	$5,52 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,06$	$1,93 \pm 0,05$	$0,36 \pm 0,12$	$0,35 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,02$
Варфарин	$4,24 \pm 0,20$	$2,78 \pm 0,07$	$0,89 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,18$	$0,34 \pm 0,13$	$0,37 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,05$
Ибупрофен	$4,85 \pm 0,35$	$5,67 \pm 0,11$	$0,97 \pm 0,01$	$1,14 \pm 0,08$	$1,16 \pm 0,11$	$0,31 \pm 0,07$	$0,22 \pm 0,02$	—
Дигитонин	$3,75 \pm 0,17$	$5,07 \pm 0,12$	$0,78 \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,03$	$2,11 \pm 0,13$	$0,26 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,05$	—

Табл. 20. Значения констант связывания (K_b) и числа сайтов связывания (n) C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ЧСА.

$T, \text{ K}$	$C = 3 \cdot 10^{-7} - 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$				$C = 6 \cdot 10^{-6} - 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$			
	$K_b \cdot 10^3, M^{-1}$		n		K_b, M^{-1}		n	
	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr	C_{70} -Lys	C_{70} -Thr
298,15	$18,20 \pm 0,09$	$331,13 \pm 0,33$	$0,84 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,06$	$85,88 \pm 20,1$	$6,76 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$
303,15	$194,98 \pm 3,82$	$14,45 \pm 0,79$	$0,99 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,13$	$67,63 \pm 13,3$	$385,92 \pm 0,15$	$0,17 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,06$
308,15	$1412,54 \pm 22,1$	$7,08 \pm 0,23$	$1,14 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,04$	$51,75 \pm 10,7$	$7815,38 \pm 0,9$	$0,33 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,03$
313,15	$5128,61 \pm 17,39$	$4,47 \pm 0,48$	$1,27 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,08$	$14,57 \pm 6,7$	$10053,1 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,08$

Изменения энтальпии и энтропии реакции связывания C₇₀-Lys и C₇₀-Thr с ЧСА рассчитывалось по уравнению Вант-Гоффа, пренебрегая влиянием температуры (Рис. 49):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (39),$$

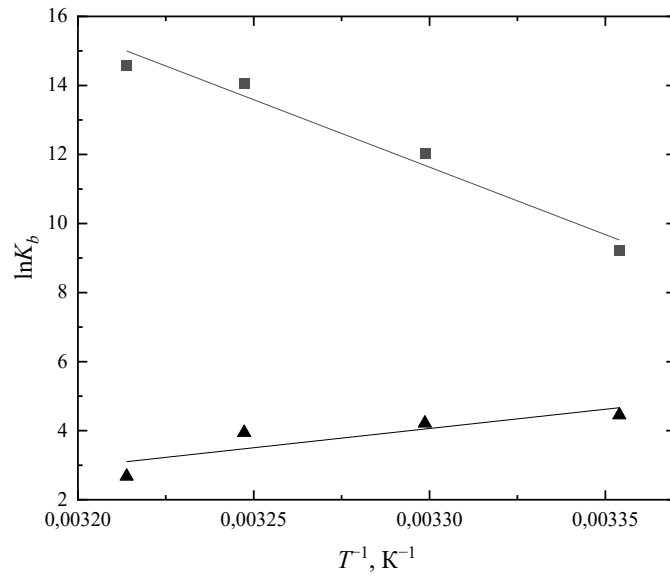
где ΔH и ΔS — изменение энтальпии и энтропии реакций связывания C₇₀-Lys и C₇₀-Thr с ЧСА, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура.

Изменения энергии Гиббса (ΔG) реакции связывания C₇₀-Thr и C₇₀-Lys с ЧСА в температурном диапазоне 303,15–318,15 К было рассчитано по формуле:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (40).$$

Отрицательные значения ΔG (Табл. 21) в интервале температур 303,15–318,15 К свидетельствуют, что связывание C₇₀-Thr и C₇₀-Lys с ЧСА является термодинамически выгодным процессом. В первом концентрационном диапазоне для C₇₀-Thr и во втором концентрационном диапазоне для C₇₀-Lys ΔH и ΔS имеют отрицательные значения, что является характерным для образования водородных связей, следовательно, связывание C₇₀-Thr в субдомене IIА и C₇₀-Lys в субдомене IIIА с ЧСА происходит за счёт аминокислотных остатков. В первом концентрационном диапазоне для C₇₀-Lys и во втором концентрационном диапазоне для C₇₀-Thr ΔH и ΔS имеют положительные значения, что является характерным для гидрофобных взаимодействий, следовательно, связывание C₇₀-Thr и C₇₀-Lys субдомене IV с ЧСА происходит за счёт фуллеренового кора.

(a)



(б)

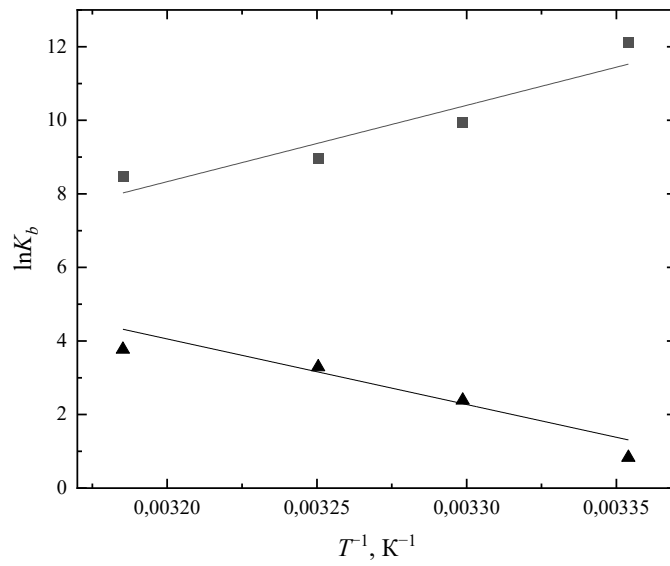


Рис. 49. Зависимость $\ln K_b$ C_{70} -Lys (a) и C_{70} -Thr (б) от обратной температуры (T^{-1}): ■ — первый участок; ▲ — второй участок.

Табл. 21. Термодинамические параметры связывания C₇₀-Lys и C₇₀-Thr с ЧСА. ΔH — изменение энтальпии, ΔS — изменение энтропии, ΔG — изменение энергии Гиббса.

Аддукт	T, К	C = 3·10 ⁻⁷ –1,5·10 ⁻⁶ М			C = 6·10 ⁻⁶ –2,4·10 ⁻⁵ М		
		ΔH , кДж·моль ⁻¹	ΔS , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	ΔG , кДж·моль ⁻¹	ΔH , кДж·моль ⁻¹	ΔS , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	ΔG , кДж·моль ⁻¹
C ₇₀ -Lys	298,15			-23,6 ± 8,1			-11,6 ± 3,7
	303,15	324 ± 48	1168 ± 156	-29,4 ± 5,2	-92,7 ± 21	-272 ± 15	-10,2 ± 4,7
	308,15			-35,3 ± 6,1			-8,8 ± 5,7
	313,15			-41,1 ± 5,0			-7,5 ± 2,7
C ₇₀ -Thr	298,15			-28,8 ± 11,7			-3,2 ± 0,7
	303,15	-172 ± 54	-482 ± 17	-26,4 ± 8,2	148 ± 35	507 ± 11	-5,8 ± 0,5
	308,15			-24,0 ± 10,1			-8,3 ± 0,3
	313,15			-21,6 ± 11,9			-10,9 ± 2,7

3.3.1.3. Эстеразная активность

Для определения константы скорости гидролиза НФА было использовано уравнение реакции первого порядка:

$$\ln\left(1 - \frac{A_t - A_0}{1.86}\right) = -kt \quad (41),$$

где 1,86 — оптическая плотность раствора *n*-нитрофенола с концентрацией 100 мкМ; A_t — оптическая плотность реакционной смеси в момент времени t ; A_0 — оптическая плотность реакционной смеси в начальный момент времени; k — константа скорости реакции, мин^{-1} ; t — время с начала реакции, мин.

Для определения константы скорости (k) построены зависимости $\ln\left(1 - \frac{A_t - A_0}{1.86}\right)$ от t . В качестве примера на Рис. 50 приведены данные для реакции гидролиза НФА альбумином в отсутствие и в присутствии 24 мкМ C_{70} -Lys и 24 мкМ C_{70} -Thr.

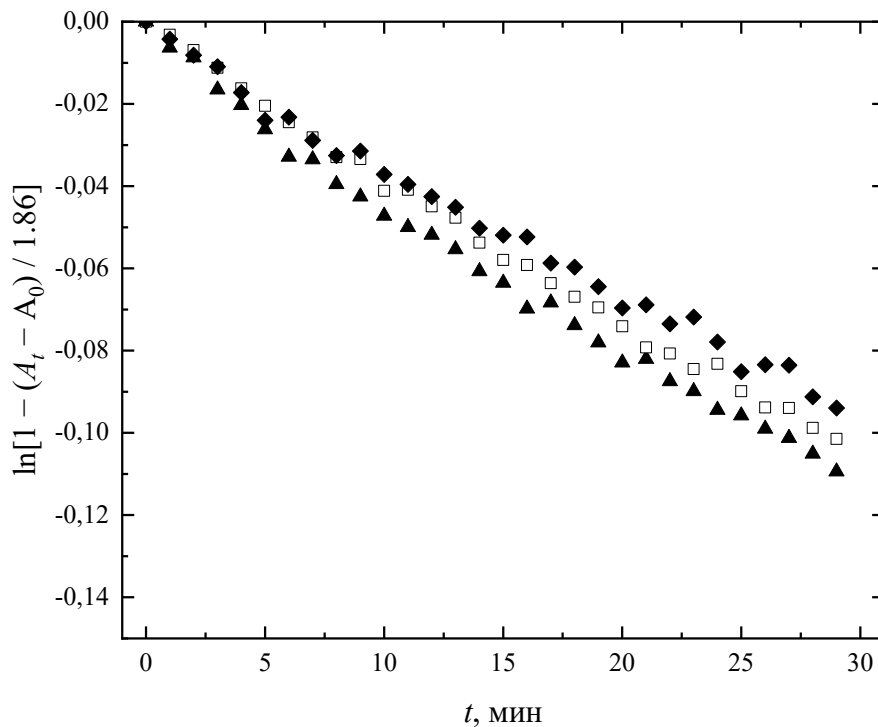


Рис. 50. Кинетические зависимости $\ln\left(1 - \frac{A_t - A_0}{1.86}\right)$ реакции гидролиза НФА альбумином в отсутствие (▲) и в присутствии 24 мкМ C_{70} -Lys (□) и 24 мкМ C_{70} -Thr (◆).

Затем из графиков были получены значения констант скорости реакции (Рис. 51). Из Рис. 51 видно, что C_{70} -Lys и C_{70} -Thr в исследованном концентрационном диапазоне незначительно уменьшают эстеразную активность ЧСА.

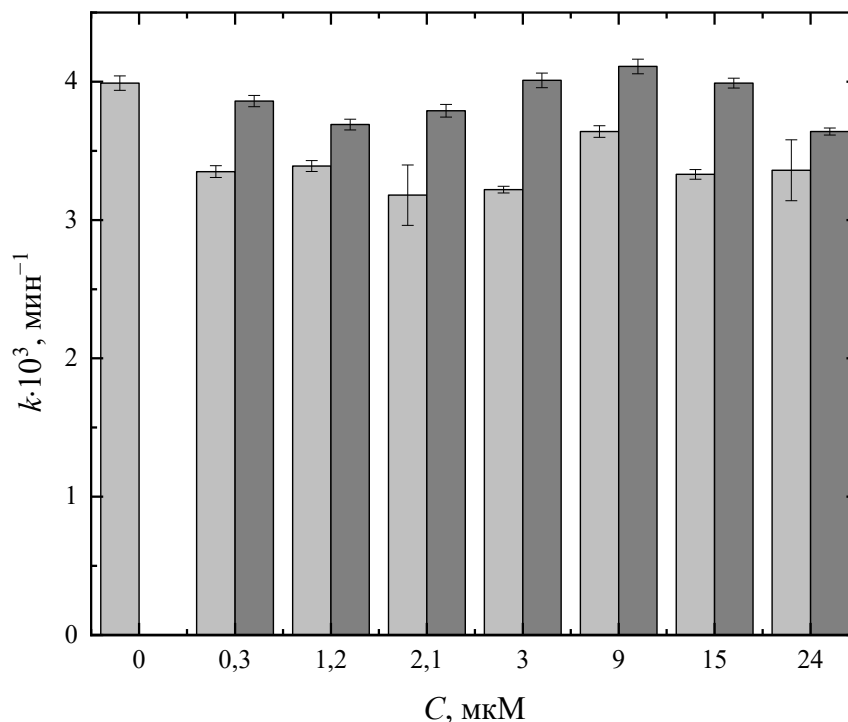


Рис. 51. Значения констант скорости реакции гидролиза НФА ЧСА в отсутствие и в присутствии C_{70} -Lys (светло-серый) и C_{70} -Thr (тёмно-серый).

3.3.2. Антирадикальная активность

Механизм реакции ДФПГ с аминокислотными аддуктами фуллерена C_{70} включает в себя две стадии: быстрая стадия — передача водорода от аминокислотного остатка радикалу ДФПГ; медленная стадия — нуклеофильная атака радикала на $C=C$ связь фуллеренового кора. Предполагаемый механизм реакции на примере аддукта C_{70} -Thr представлен на Рис. 52.

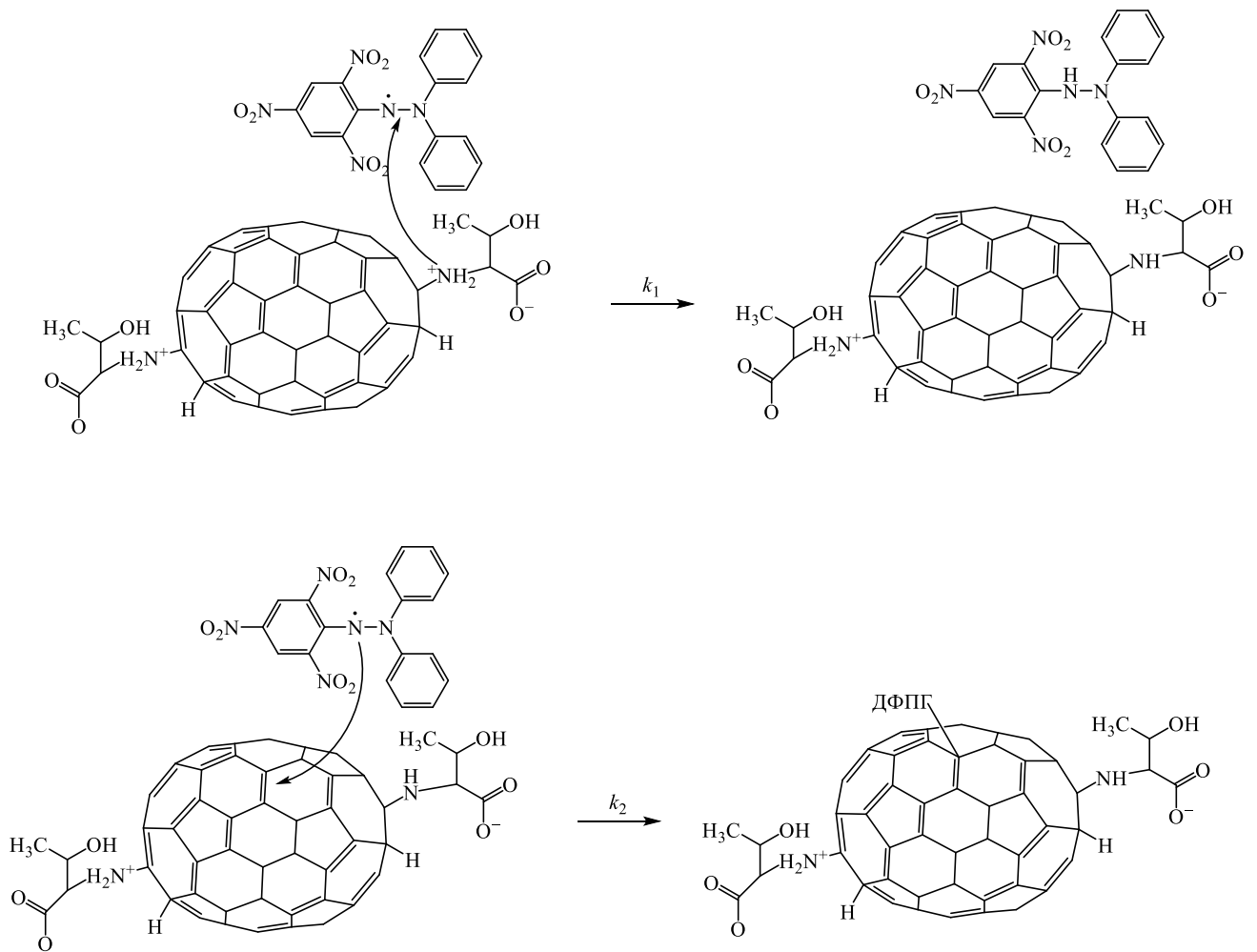


Рис. 52. Предполагаемый механизм взаимодействия аддукта C_{70} -Thr с ДФПГ.

Для количественной оценки скорости реакции между аддуктом фуллерепа и ДФПГ была использована двухстадийная кинетическая модель псевдопервого порядка, представленная уравнением:

$$\ln \frac{(A_{\infty} - A_t)}{(A_{\infty} - A_0)} = -kt \quad (42),$$

где A_{∞} , A_t , A_0 — оптические плотности раствора спустя «бесконечность» (шесть дней после начала эксперимента), в момент времени t и в начальный момент времени, соответственно. Зависимость $\ln \frac{(A_{\infty} - A_t)}{(A_{\infty} - A_0)}$ от времени представлена на Рис. 53.

Из тангенсов угла наклона двух участков кинетических кривых были рассчитаны кажущиеся константы скорости (Табл. 22). Видно, что аддукт C_{70} -Lys обладает большей антирадикальной активностью, чем C_{70} -Thr. Анализ литературы [170,171] показал, что значения констант скоростей первой и второй стадии сопоставимы с другими аддуктами фуллеренов.

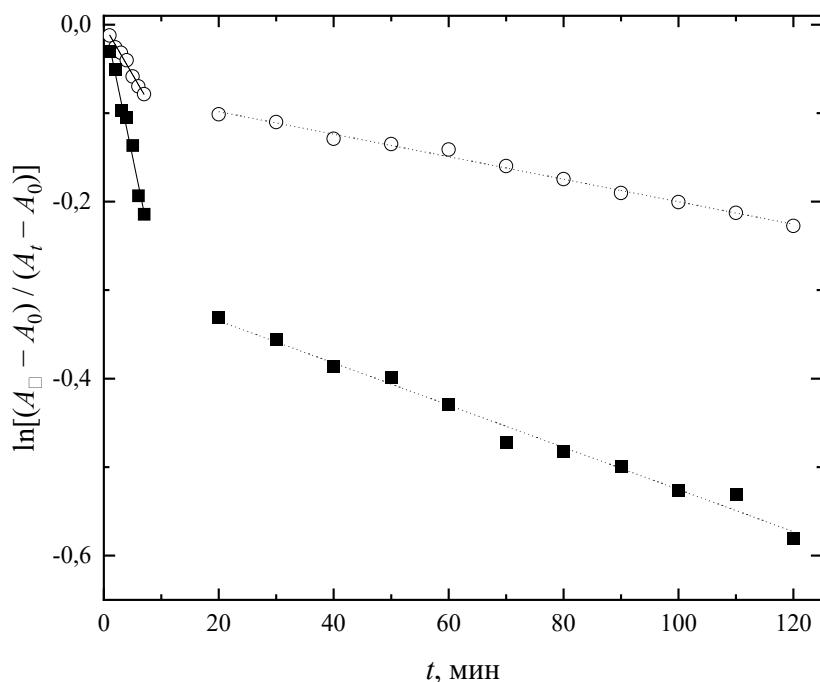


Рис. 53. Кинетическая зависимость восстановления ДФПГ аддуктами C₇₀-Lys (■) и C₇₀-Thr (○) при температуре 298,15 К.

Табл. 22. Значения констант скорости восстановления ДФПГ аддуктами C₇₀-Lys и C₇₀-Thr в сравнении с литературными данными.

Вещество	$k_1, \text{мин}^{-1}$	$k_2, \text{мин}^{-1}$
C ₇₀ -Lys	$0,0313 \pm 0,0021$	$0,00238 \pm 0,00009$
C ₇₀ -Thr	$0,0112 \pm 0,0006$	$0,00127 \pm 0,00004$
C ₆₀ -Gly [171]	0,0352	0,00112
C ₆₀ -Нур [171]	0,0835	0,00131
C ₆₀ -Met [171]	0,0301	0,00112
C ₆₀ -Cys [171]	0,0931	0,00105
C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃ [171]	0,0311	0,00100
C ₆₀ (OH) ₃₀ [170]	0,0063	0,0014
C ₆₀ (C = 100 мкМ) [170]	-	0,0007

3.3.3. Проллиферация и цитотоксичность

3.3.3.1. Проллиферация

Анализ полученных данных показал, что в изученном диапазоне концентраций ($C = 0,1-100$ мкМ) аддукт C_{70} -Lys вызывает бóльшее уменьшение пролиферации клеток линии НЕК293 по сравнению с C_{70} -Thr (Рис. 54).

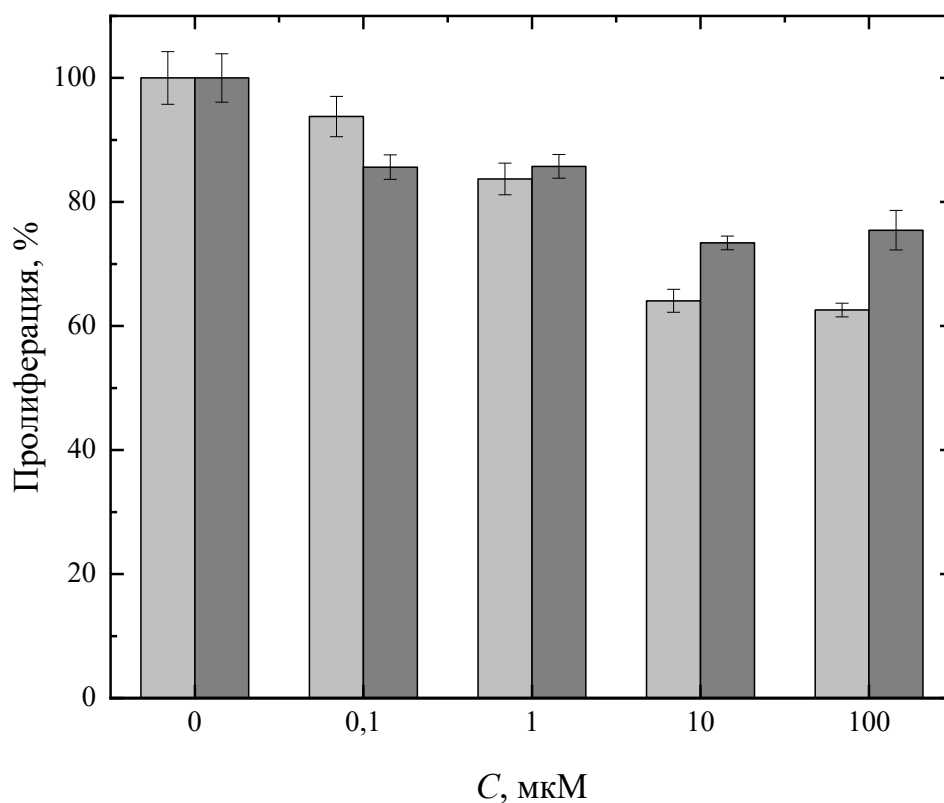


Рис. 54. Зависимость клеточной пролиферации от концентрации C_{70} -Lys (светло-серый) и C_{70} -Thr (тёмно-серый).

3.3.3.2. Цитотоксичность

Цитотоксическое действие аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr ($C = 0,1-100$ мкМ) на клетки линии НЕК293 измерялось с использованием МТТ-реагента, который используется для оценки метаболической активности клеток. НАДФ-Н-зависимые оксидоредуктазные ферменты, вступающие в реакции с МТТ-реагентом, отражают количество жизнеспособных клеток при действии цитотоксического агента (Рис. 55). В сочетании с данными по пролиферации (Рис. 54) можно сделать вывод, что C_{70} -Thr является менее токсичным аддуктом по сравнению с C_{70} -Lys в отношении линии клеток НЕК293.

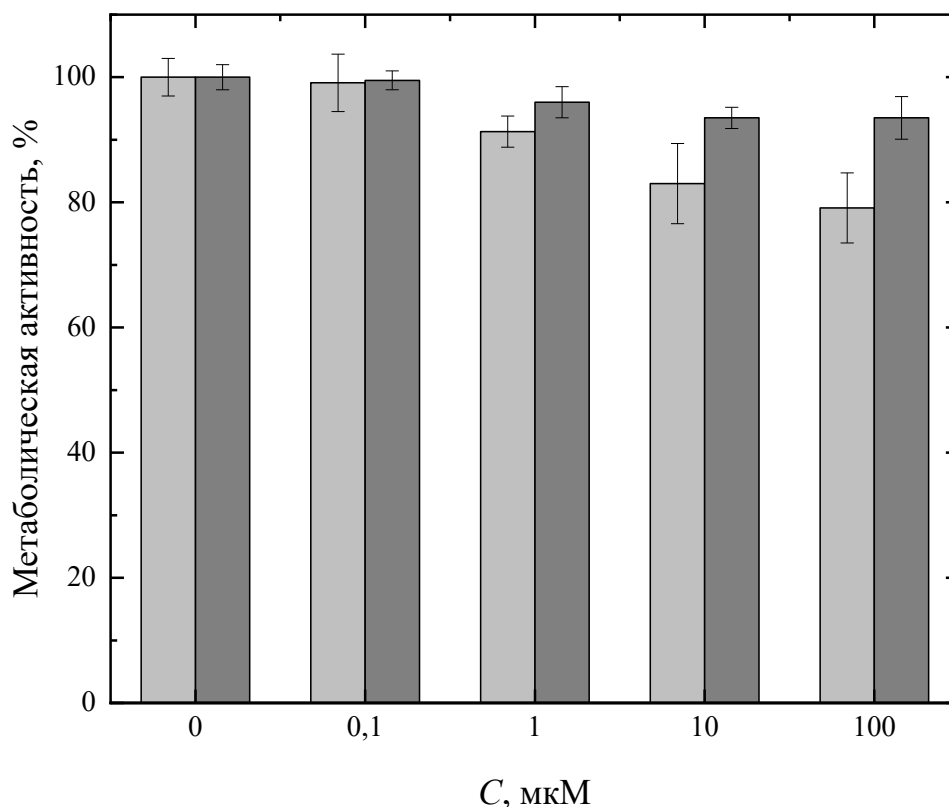


Рис. 55. Зависимость метаболической активности клеток линии HEK293 от концентрации C_{70} -Lys (светло-серый) и C_{70} -Thr (тёмно-серый).

3.3.4. Взаимодействие на ДНК

3.3.4.1. Связывание с ДНК

Спектры поглощения ДНК в присутствии C_{70} -Lys и C_{70} -Thr приведены на Рис. 56. Для изучения связывания C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ДНК был использован метод электронной спектроскопии поглощения. Из Рис. 56 видно, что наблюдается сильный гиперхромный эффект при добавлении C_{70} -Lys и C_{70} -Thr к ДНК (Рис. 57), при этом не происходит заметного изменения полосы поглощения ДНК. Гиперхромизм объясняется наличием нековалентных взаимодействий C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ДНК: внешний контакт за счет образования водородных связей и связывание на поверхности бороздок за пределами спирали ДНК. Отсутствие батохромного или гипсохромного сдвигов свидетельствует о том, что имеет место бороздочное связывание аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ДНК.

Константа связывания (K_b) была рассчитана по уравнению Вульфа — Шиммера:

$$\frac{[\text{ДНК}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{ДНК}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (43),$$

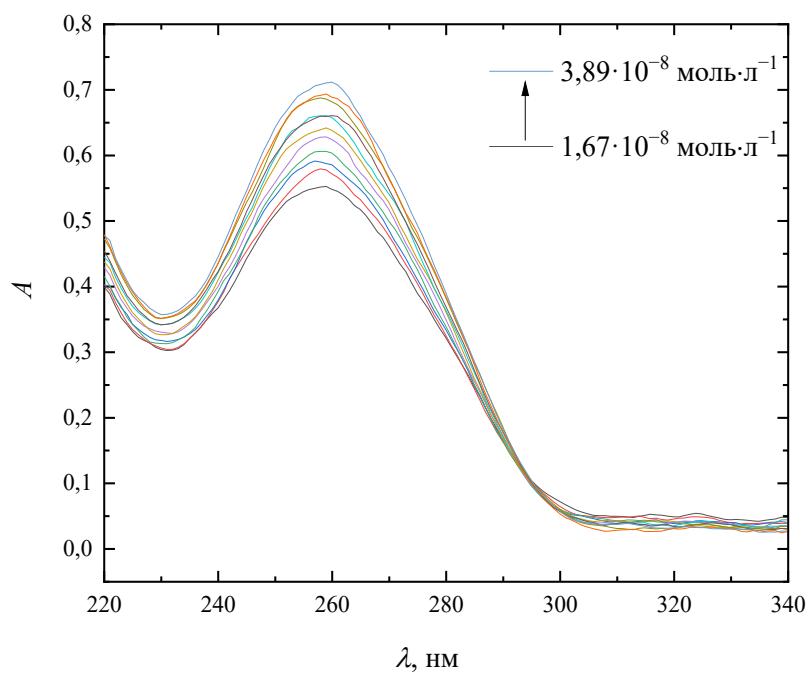
где $[ДНК]$ — концентрация ДНК, ε_a , ε_f , ε_b — кажущийся коэффициент экстинкции, коэффициент экстинкции для аддуктов и коэффициент экстинкции для аддуктов в связанной форме, соответственно. Значение ε_f для C_{70} -Lys составляет $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, для C_{70} -Thr — $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Константа связывания (K_b) была получена из зависимости $[ДНК] / (\varepsilon_a - \varepsilon_f) - [ДНК]$ (Рис. 58). Далее были рассчитаны значения изменений энергии Гиббса взаимодействия C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ДНК, используя Ур. 44:

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (44).$$

Значение констант связывания и изменения энергии Гиббса взаимодействия C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ДНК представлены в Табл. 23.

(a)



(б)

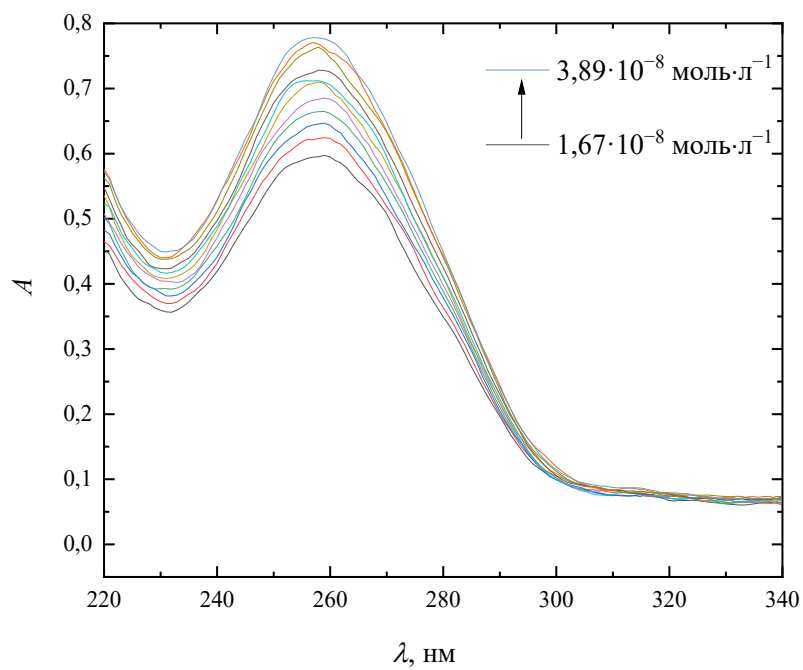


Рис. 56. Спектры поглощения ДНК ($C = 1,67 \cdot 10^{-8}$ – $3,89 \cdot 10^{-8}$ М) в присутствии C_{70} -Lys (a) и C_{70} -Thr (б) ($C = 4 \cdot 10^{-8}$ М).

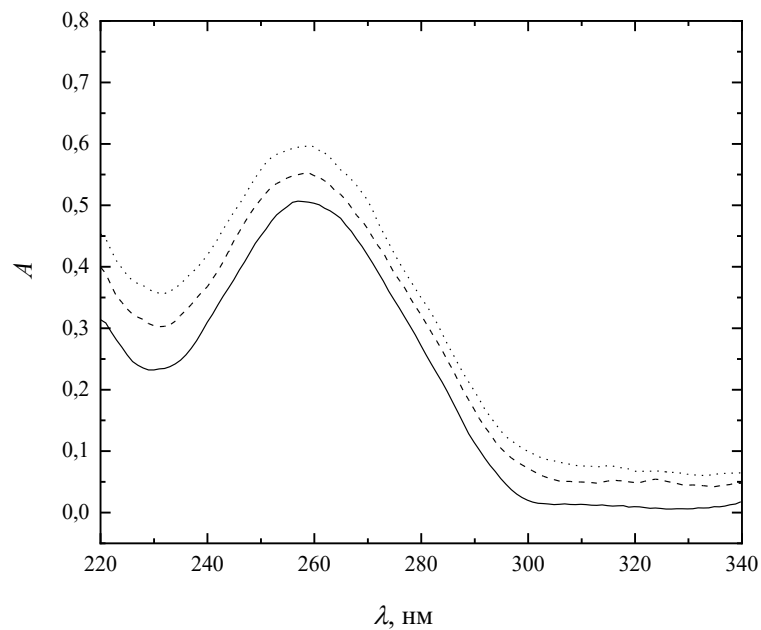


Рис. 57. Спектры поглощения растворов: $1,67 \cdot 10^{-8}$ М ДНК (—); $1,67 \cdot 10^{-8}$ М ДНК в присутствии $4 \cdot 10^{-8}$ М C_{70} -Lys (---); $1,67 \cdot 10^{-8}$ М ДНК в присутствии $4 \cdot 10^{-8}$ М C_{70} -Thr (····).

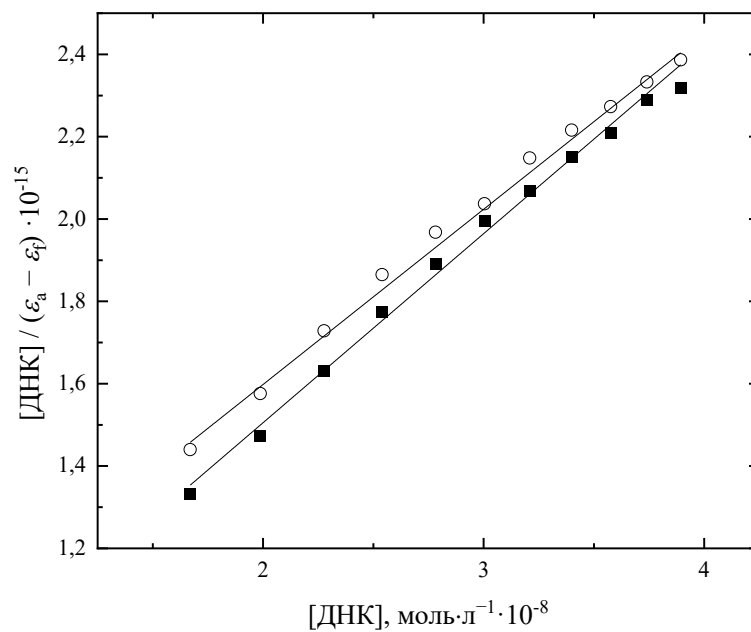


Рис. 58. Зависимость $[DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ от $[DNA]$ взаимодействия C_{70} -Lys (■) и C_{70} -Thr (○) с ДНК.

Табл. 23. Значения констант связывания (K_b) и изменения энергии Гиббса взаимодействия C_{70} -Lys и C_{70} -Thr с ДНК.

Вещество	$K_b \cdot 10^7$, л·моль ⁻¹	ΔG , кДж·моль ⁻¹
C_{70} -Lys	$7,83 \pm 0,74$	$-45,1 \pm 4,0$
C_{70} -Thr	$5,70 \pm 0,49$	$-44,3 \pm 3,8$

3.3.4.2. Генотоксичность

Средние значения процентного содержания ДНК в хвосте кометы, длины хвоста и момента хвоста кометы, наблюдаемые в МКПК человека в присутствии H_2O_2 (100 мкМ, положительный контроль) и аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr, представлены в Табл. 24. Количество повреждений ДНК в МКПК человека в присутствии H_2O_2 достоверно выше, чем в контрольных клетках (отрицательный контроль). Аддукты C_{70} -Lys и C_{70} -Thr при самой высокой изученной концентрации (100 мкМ) показали достаточно высокое в % ДНК хвоста, длине хвоста и моменте хвоста ДНК-комет по сравнению с контролем. Результаты показывают, что C_{70} -Lys и C_{70} -Thr дозозависимо повреждают ДНК МКПК человека. В качестве примера на Рис. 59 представлены фотографии ДНК-комет в присутствии H_2O_2 (положительный контроль), PBS (отрицательный контроль) и C_{70} -Thr.

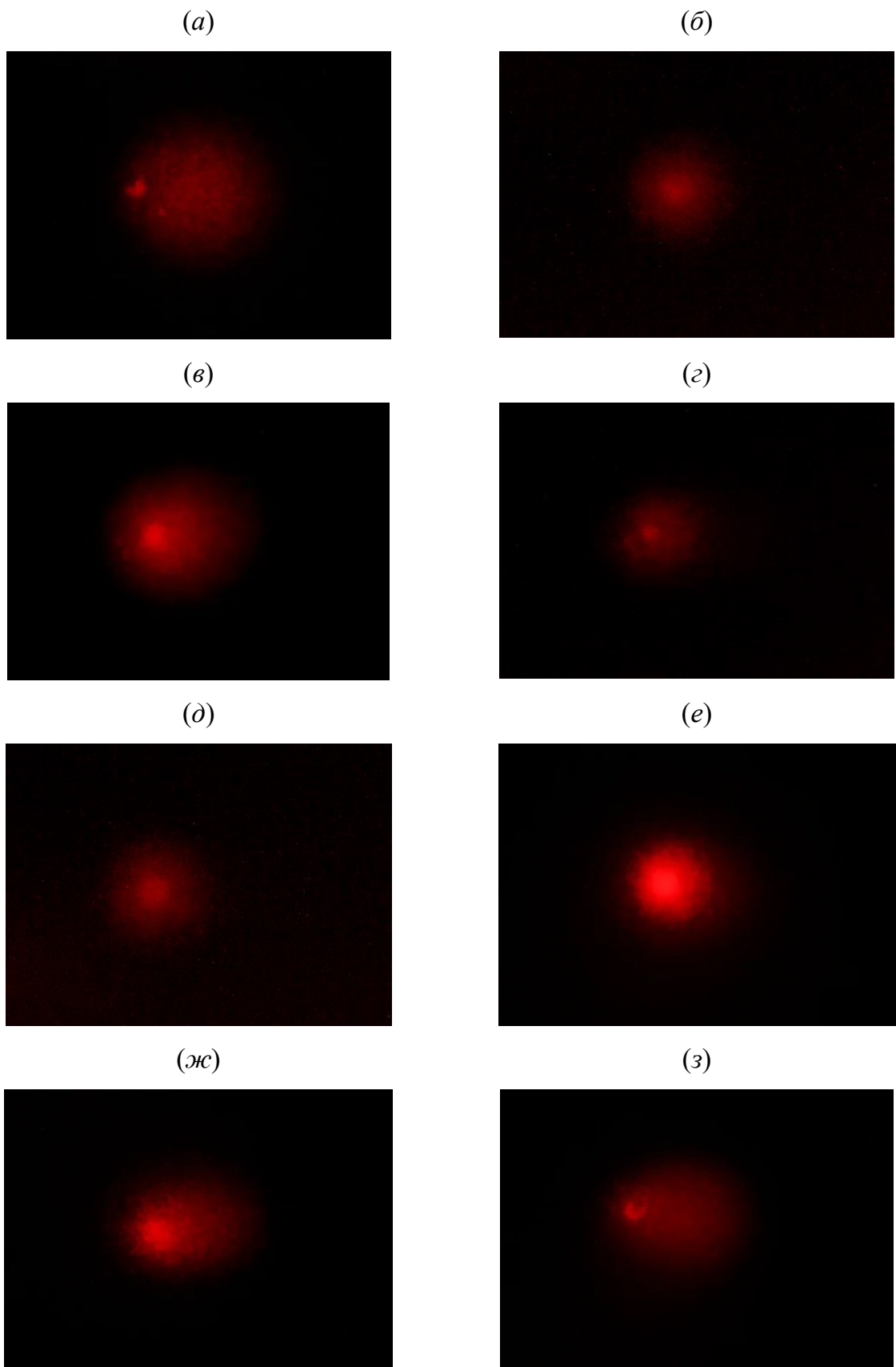


Рис. 59. ДНК-кометы после электрофореза клеток в микрогеле. (а) — положительный контроль (H_2O_2), (б) — отрицательный контроль (PBS), (в–з) — $\text{C}_{70}\text{-Thr}$ ($C = 1\text{--}100$ мкМ).

Табл. 24. Влияние аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr на % хвостовой ДНК, длину хвоста и момент хвоста.

Изучаемая характеристика	Отрицательный контроль (PBS)	Положительный контроль (H ₂ O ₂ , 100 мкМ)	Концентрация, мкМ				
			1,0	5,0	10,0	25,0	100,0
C ₇₀ -Lys							
Хвост ДНК, %	25,46 ± 2,74	155,87 ± 5,22	23,44 ± 2,37	29,56 ± 3,11	47,93 ± 4,23	60,74 ± 5,26	83,77 ± 13,56
Длина хвоста, мкм	90,41 ± 14,11	189,56 ± 23,73	94,59 ± 11,28	101,13 ± 17,66	134,19 ± 19,01	157,7 ± 24,34	177,2 ± 25,6
Момент хвоста	23,02 ± 0,39	295,47 ± 1,24	22,17 ± 0,27	29,89 ± 0,55	64,32 ± 0,80	95,79 ± 1,28	148,44 ± 3,47
C ₇₀ -Thr							
Хвост ДНК, %	14,39 ± 2,74	75,64 ± 5,22	10,34 ± 2,24	17,73 ± 2,85	15,64 ± 2,86	24,23 ± 4,40	42,87 ± 11,92
Длина хвоста, мкм	70,29 ± 13,20	117,31 ± 36,94	71,57 ± 10,33	80,87 ± 15,24	95,51 ± 4,08	105,7 ± 16,12	157,9 ± 21,0
Момент хвоста	10,11 ± 0,36	88,73 ± 1,93	7,40 ± 0,23	14,34 ± 0,43	14,94 ± 0,12	25,61 ± 0,71	67,67 ± 2,50

Основные результаты и выводы

1. Разработаны масштабируемые одностадийные методики получения водорастворимых аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином, приводящие к образованию конечного продукта с выходом более 85 %. Полученные соединения были идентифицированы с использованием комплекса физико-химических методов анализа: ^{13}C ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопия, термогравиметрический анализ, элементный анализ и ВЭЖХ.
2. Проведено физико-химическое исследование аддуктов фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином: изучены плотности, вязкости, показатели преломления, электропроводности, поверхностные свойства, избыточные термодинамические функции, распределение наночастиц по размеру и ζ -потенциалы. Обнаружено, что аддукты фуллерена C_{70} с L-лизином и L-треонином имеют большие отрицательные значения парциальных молярных объёмов в водных растворах, что свидетельствует о сильном структурировании растворов. Установлено, что водные растворы производных фуллеренов ассоциированы. Размер ассоциатов варьируется от 30 нм до 6 мкм в зависимости от концентрации. Установлено выполнение правила аддитивности удельных и молярных рефракций водных растворов веществ. Значения констант диссоциации демонстрируют, что изученные аддукты являются слабыми электролитами.
3. С помощью модели VD-AS была определена концентрация аддуктов, соответствующая потере устойчивости по отношению фазовому разделению водными растворами C_{70} -Lys и C_{70} -Thr ($x_{C_{70}\text{-Lys}}^{\text{неуст.}} = 6,0 \cdot 10^{-5}$ и $x_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{неуст.}} = 4,7 \cdot 10^{-5}$).
4. Проведено изучение взаимодействия аддуктов фуллерена C_{70} со стабильным радикалом ДФПГ. Полученные константы скорости реакции показали, что изучаемые аддукты обладают антирадикальной активностью, которая сопоставима с такими водорастворимыми аддуктами фуллерена C_{60} , как фуллеренолы, карбоксилированные фуллерены и производные C_{60} с L-аминокислотами.
5. Изучена биосовместимость аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr, а именно: гемосовместимость (спонтанный гемолиз, агрегация тромбоцитов, плазменно-коагуляционный гемостаз, связывание с человеческим сывороточным альбумином и его эстеразная активность), влияние на клеточные линии (цитотоксичность, пролиферация), а также влияние на ДНК (связывание с ДНК и генотоксичность). Показано, что синтезированные аддукты обладают антиагрегантной и антикоагулянтной активностью; эксперименты по

связыванию аддуктов C_{70} с человеческим сывороточным альбумином свидетельствуют о том, что значения констант аффинности оптимальны для выполнения альбумином транспортной функции в кровотоке: C_{70} -Thr образует прочный комплекс в субдомене ПА и слабо связывается с субдоменом IB; C_{70} -Lys образует прочный комплекс с субдоменом IB и слабо связывается с субдоменом IIIA. Продемонстрирована, умеренная цито- и генотоксичность аддуктов C_{70} -Lys и C_{70} -Thr.

Благодарности

Выражаю благодарность научным руководителям профессору Семёнову Константину Николаевичу и профессору Шаройко Владимиру Владимировичу за научное руководство, обсуждение и редактирование научных статей и тезисов конференций, а также заведующему кафедрой химии твёрдого тела Института химии СПбГУ, профессору Мурину Игорю Васильевичу и коллективу кафедры за организацию научной работы и обсуждение полученных результатов диссертационной работы.

Идентификация и физико-химическое изучение аддуктов C₇₀-Lys и C₇₀-Thr 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 наноэлектроники» Научного парка СПбГУ. Изучение биосовместимости синтезированных соединений проводилось на кафедре общей и биоорганической химии и в лаборатории биомедицинского материаловедения ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Список цитированной литературы

- [1] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, N.E. Podolsky, 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>.
- [2] E.I. Pochkaeva, N.E. Podolsky, 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, *Progress in Solid State Chemistry.* 57 (2020) 100255. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2019.100255>.
- [3] A. V. Elets'kii, B.M. Smirnov, Fullerenes and carbon structures, *Physics-Uspekhi.* 38 (1995) 935–964. <https://doi.org/10.1070/PU1995V038N09ABEH000103>.
- [4] Латыпов З.З., Галль Л.Н., ФУЛЛЕРЕНЫ И УГЛЕРОДНЫЕ НАНОКЛАСТЕРЫ, *Научное Приборостроение.* 15 (2005) 82–87.
- [5] 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, *Progress in Solid State Chemistry.* 44 (2016) 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.04.002>.
- [6] 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, *Progress in Solid State Chemistry.* 47–48 (2017) 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2017.09.001>.
- [7] V.N. Bezmel'nitsyn, A. V. Elets'kii, M. V. Okun', Fullerenes in solutions, *Physics-Uspekhi.* 41 (1998) 1091–1114. <https://doi.org/10.1070/PU1998V041N11ABEH000502>.
- [8] D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama, F. Shahidi, *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*, *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences.* (2013). <https://doi.org/10.1002/9781118451915>.
- [9] K. Matsubayashi, K. Kokubo, H. Tategaki, S. Kawahama, T. Oshima, One-step Synthesis of Water-soluble Fullerenols Bearing Nitrogen-containing Substituents, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 17 (2009) 440–456. <https://doi.org/10.1080/01490450903039263>.

- [10] X.L. Yang, C.H. Fan, H.S. Zhu, Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C60]fullerene derivatives and its mechanism, *Toxicology in Vitro*. 16 (2002) 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00102-3).
- [11] 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 Khimioter*. 49 (2004) 13–20.
- [12] 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>.
- [13] R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, J.A. Castoro, C. Wilkins, S.H. Friedman, D.L. DeCamp, G.L. Kenyon, Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes, *J Am Chem Soc*. 115 (1993) 6510–6512. <https://doi.org/10.1021/ja00068a006>.
- [14] 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>.
- [15] 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, *The Journal of Medicinal Chemistry*. 42 (1999) 4614–4620. <https://doi.org/10.1021/jm990144s>.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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>.
- [19] B. Vilenı, 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>.

- [20] I.M. Andreev, V.S. Romanova, A.O. Petrukhina, S.M. Andreev, Amino-acid derivatives of fullerene C_{60} behave as lipophilic ions penetrating through biomembranes, *Physics of the Solid State*. 44 (2002) 683–685. <https://doi.org/10.1134/1.1470559>.
- [21] L.B. Piotrovskii, Fullerenes in the drug design, *Nanotechnol Russ.* 4 (2009) 541–555. <https://doi.org/10.1134/S1995078009090018>.
- [22] R.A. Kotelnikova, A.I. Kotelnikov, G.N. Bogdanov, V.S. Romanova, E.F. Kuleshova, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin, Membranotropic properties of the water soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene C_{60} , *FEBS Lett.* 389 (1996) 111–114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00537-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00537-6).
- [23] K. Hedberg, L. Hedberg, D.S. Bethune, C.A. Brown, H.C. Dorn, R.D. Johnson, M. De Vries, Bond lengths in free molecules of buckminsterfullerene, C_{60} , from gas-phase electron diffraction, *Science* (1979). 254 (1991) 410–412. <https://doi.org/10.1126/science.254.5030.410>.
- [24] J.M. Hawkins, A. Meyer, T.A. Lewis, S. Loren, F.J. Hollander, Crystal structure of osmylated C_{60} : Confirmation of the soccer ball framework, *Science* (1979). 252 (1991) 312–313. <https://doi.org/10.1126/science.252.5003.312>.
- [25] J.M. Schulman, R.L. Disch, M.A. Miller, R.C. Peck, Symmetrical clusters of carbon atoms: The C_{24} and C_{60} molecules, *Chem Phys Lett.* 141 (1987) 45–48. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(87\)80089-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(87)80089-1).
- [26] K. Raghavachari, C.M. Rohlfing, Imperfect fullerene structures: Isomers of C_{60} , *J Phys Chem.* 96 (1992) 2463–2466. <https://doi.org/10.1021/j100185a014>.
- [27] P.A. Troshin, R.N. Lyubovskaya, Organic chemistry of fullerenes: the major reactions, types of fullerene derivatives and prospects for practical use, *Russian Chemical Reviews.* 77 (2008) 323–369. <https://doi.org/10.1070/RC2008v077n04ABEH003770>.
- [28] 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).
- [29] D.R. McKenzie, C.A. Davis, D.J.H. Cockayne, D.A. Muller, A.M. Vassallo, The structure of the C_{70} molecule, *Nature* 1992 355:6361. 355 (1992) 622–624. <https://doi.org/10.1038/355622a0>.

- [30] H. Li, H. Zhang, The isolated-pentagon rule and nice substructures in fullerenes, *Ars Mathematica Contemporanea*. 15 (2018) 487–497. <https://doi.org/10.26493/1855-3974.1359.b33>.
- [31] P.W. Fowler, Carbon cylinders: A class of closed-shell clusters, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 86 (1990) 2073. <https://doi.org/10.1039/ft9908602073>.
- [32] T.G. Schmalz, W.A. Seitz, D.J. Klein, G.E. Hite, Elemental carbon cages, *J Am Chem Soc*. 110 (1988) 1113–1127. <https://doi.org/10.1021/ja00212a020>.
- [33] A. Hirsch, Q. Li, F. Wudl, Globe-trotting hydrogens on the surface of the fullerene compound $C_{60}H_6(N(CH_2CH_2)_2O)_6$, *Angewandte Chemie International Edition in English*. 30 (1991) 1309–1310. <https://doi.org/10.1002/anie.199113091>.
- [34] Z. Hu, C. Zhang, Y. Huang, S. Sun, W. Guan, Y. Yao, Photodynamic anticancer activities of water-soluble C_{60} 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>.
- [35] V.S. Romanova, V.A. Tsyryapkin, Yu.I. Lyakhovetskii, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin, ChemInform Abstract: Addition of Amino Acids and Dipeptides (I) to Fullerene C_{60} Giving Rise to Monoadducts., *ChemInform*. 26 (2010) no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.199506117>.
- [36] Z. Li, L.-L. Pan, F.-L. Zhang, Z. Wang, Y.-Y. Shen, Z.-Z. Zhang, Preparation and Characterization of Fullerene (C_{60}) Amino Acid Nanoparticles for Liver Cancer Cell Treatment, *J Nanosci Nanotechnol*. 14 (2014) 4513–4518. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8242>.
- [37] Z. Hu, S. Liu, Y. Wei, E. Tong, F. Cao, W. Guan, Synthesis of glutathione C_{60} derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells, *Neurosci Lett*. 429 (2007) 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.09.063>.
- [38] Z. Hu, W. Guan, W. Wang, L. Huang, X. Tang, H. Xu, Z. Zhu, X. Xie, H. Xing, Synthesis of amphiphilic amino acid C_{60} derivatives and their protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells, *Carbon N Y*. 46 (2008) 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.10.041>.
- [39] Z. Hu, W. Guan, W. Wang, L. Huang, H. Xing, Z. Zhu, Synthesis of β -alanine C_{60} derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat

- pheochromocytoma cells, *Cell Biol Int.* 31 (2007) 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.01.013>.
- [40] Z. Hu, Y. Huang, W. Guan, J. Zhang, F. Wang, L. Zhao, The protective activities of water-soluble C₆₀ derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells, *Biomaterials.* 31 (2010) 8872–8881. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.025>.
- [41] M.E. Vol'pin, Z.N. Parnes, V.S. Romanova, Amino acid and peptide derivatives of fullerene, *Russian Chemical Bulletin.* 47 (1998) 1021–1025. <https://doi.org/10.1007/BF02498177>.
- [42] R.A. Kotelnikova, G.N. Bogdanov, E.C. Frog, A.I. Kotelnikov, V.N. Shtolko, V.S. Romanova, S.M. Andreev, A.A. Kushch, N.E. Fedorova, A.A. Medzhidova, G.G. Miller, Nanobionics of Pharmacologically Active Derivatives of Fullerene C₆₀, *Journal of Nanoparticle Research.* 5 (2003) 561–566. <https://doi.org/10.1023/B:NANO.0000006070.61144.93>.
- [43] R.A. Kotel'nikova, I.I. Faingol'd, D.A. Poletaeva, D. V. Mishchenko, V.S. Romanova, V.N. Shtol'ko, G.N. Bogdanov, A.Yu. Rybkin, E.S. Frog, A. V. Smolina, A.A. Kushch, N.E. Fedorova, A.I. Kotel'nikov, Antioxidant properties of water-soluble amino acid derivatives of fullerenes and their role in the inhibition of herpes virus infection, *Russian Chemical Bulletin.* 60 (2011) 1172–1176. <https://doi.org/10.1007/s11172-011-0184-x>.
- [44] E.M. Belavtseva, E. V. Kichenko, V.S. Romanova, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin, Investigation of structures of micelles of a fullerene derivative of alanine in aqueous solutions by tunneling scanning microscopy, *Russian Chemical Bulletin.* 45 (1996) 831–833. <https://doi.org/10.1007/BF01431307/METRICS>.
- [45] 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>.
- [46] Sh.Kh. Khalikov, D. Sharipova, S.Z. Zafarov, M. Umarkhon, S. V. Alieva, Synthesis and characterization of fullero-C₆₀ α -amino acids with antiviral properties, *Chem Nat Compd.* 53 (2017) 121–127. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-1924-4>.
- [47] L.D. Rasnetsov, Hydrated n-fullerene-amino acid derivatives, method for preparing them and based pharmaceutical compositions, RU2458046C1, 2012.

- [48] A.B. Kornev, E.A. Khakina, S.I. Troyanov, A.A. Kushch, A. Peregudov, A. Vasilchenko, D.G. Deryabin, V.M. Martynenko, P.A. Troshin, Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60]fullerene using chlorofullerene $C_{60}Cl_6$ as a precursor, *Chemical Communications*. 48 (2012) 5461–5463. <https://doi.org/10.1039/C2CC00071G>.
- [49] 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>.
- [50] M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato, Addition of azomethine ylides to C_{60} : Synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines, *J Am Chem Soc*. 115 (1993) 9798–9799. <https://doi.org/10.1021/ja00074a056>.
- [51] L.A. Watanabe, M.P.I. Bhuiyan, B. Jose, T. Kato, N. Nishino, Synthesis of novel fullerene amino acids and their multifullerene peptides, *Tetrahedron Lett*. 45 (2004) 7137–7140. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2004.07.088>.
- [52] J. Zhang, L. Yuan, Y.D. Zhang, Synthesis of fullerene-acid conjugates, *Adv Mat Res*. 463–464 (2012) 538–542. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.463-464.538>.
- [53] P. Minois, J. Bayardon, R. Meunier-Prest, S. Jugé, [60]Fullerene l-amino acids and peptides: Synthesis under phase-transfer catalysis using a phosphine-borane linker. Electrochemical behavior, *J Org Chem*. 82 (2017) 11358–11369. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01737>.
- [54] B. V. Lebedev, K.B. Zhogova, T.A. Bykova, B.S. Keverin, V.L. Karnatsevick, M.A. Lopatin, Thermodynamics of C_{60} fullerene in the 0-340 K range, *Russian Chemical Bulletin*. 45 (1996) 2113–2117. <https://doi.org/10.1007/BF01430721/METRICS>.
- [55] 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, *Europhysics Letters (EPL)*. 24 (1993) 551–556. <https://doi.org/10.1209/0295-5075/24/7/008>.
- [56] 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} , *Fullerene Science and Technology*. 1 (1993) 101–109. <https://doi.org/10.1080/15363839308015519>.
- [57] 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} ,

- Physica 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).
- [58] 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>.
- [59] 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).
- [60] V. V. Diky, G.Y. Kabo, Thermodynamic properties of C₆₀ and C₇₀ fullerenes, *Usp Khim.* 69 (2000) 107–117. <https://doi.org/10.1070/RC2000V069N02ABEH000535/XML>.
- [61] K.B. Zhogova, B. V. Lebedev, Thermodynamics of C₇₀ fullerene in the 0–390 K temperature range, *Russian Chemical Bulletin.* 47 (1998) 625–628. <https://doi.org/10.1007/BF02495966/METRICS>.
- [62] H.P. Diogo, M.E. Minas Da Piedade, A.D. Darwish, T.J.S. Dennis, Enthalpy of formation of C₇₀, *Journal of Physics and Chemistry of 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).
- [63] 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>.
- [64] 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>.
- [65] 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>.
- [66] 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/METRICS>.

- [67] G. Gigli, G. Balducci, V.Yu. 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>.
- [68] 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>.
- [69] M. V. Korobov, L.N. Sidorov, Thermodynamic properties of fullerenes, *J Chem Thermodyn.* 26 (1994) 61–73. <https://doi.org/10.1006/JCHT.1994.1021>.
- [70] V.P. Kolesov, S.M. Pimenova, V.K. Pavlovich, N.B. Tamm, A.A. Kurskaya, Enthalpies of combustion and formation of fullerene C_{60} , *J Chem Thermodyn.* 28 (1996) 1121–1125. <https://doi.org/10.1006/JCHT.1996.0098>.
- [71] S.M. Pimenova, S. V. Melkhanova, V.P. Kolesov, Thermochemical determination of the enthalpies of combustion and formation of fullerene C_{70} , *J Chem Thermodyn.* 35 (2003) 189–193. [https://doi.org/10.1016/S0021-9614\(02\)00350-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9614(02)00350-6).
- [72] A. Rojas-Aguilar, Enthalpies of combustion and formation of fullerene C_{70} by isoperibolic combustion calorimetry, *J Chem Thermodyn.* 36 (2004) 519–523. <https://doi.org/10.1016/J.JCT.2004.03.008>.
- [73] 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) 105898. <https://doi.org/10.1016/J.JCT.2019.105898>.
- [74] 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/SUPPL_FILE/JE8B01075_SI_001.PDF.
- [75] 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>.

- [76] M.I. Lelet, K.N. Semenov, E. V. Andrusenko, N.A. Charykov, I. V. Murin, Thermodynamic and thermal properties of the C₆₀-L-lysine derivative, *J Chem Thermodyn.* 115 (2017) 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.07.017>.
- [77] 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 C₆₀-L-Arg derivative, *J Chem Thermodyn.* 127 (2018) 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.07.007>.
- [78] N. Ahmadian, M.D. Ganji, G. Valizadeh, Theoretical Investigation of the Interaction Between Al-Decorated C₆₀; Fullerene and Glycine Amino Acid: Density Functional Calculations, *J Comput Theor Nanosci.* 9 (2012) 884–888. <https://doi.org/10.1166/jctn.2012.2111>.
- [79] N.A. Andreeva, V. V. Chaban, Electronic and thermodynamic properties of the amino- and carboxamido-functionalized C₆₀-based fullerenes: Towards non-volatile carbon dioxide scavengers, *J Chem Thermodyn.* 116 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.08.019>.
- [80] V.A. Basiuk, E. González-Luciano, Noncovalent interactions of amino acids with fullerene C₆₀: A dispersion-corrected DFT study, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 24 (2016) 371–379. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2016.1163687>.
- [81] T.Yu. Dolinina, V.B. Luzhkov, Quantum chemical calculations of the molecular structures of hybrid amino acid derivatives of fullerene C₆₀, *Russian Chemical Bulletin.* 61 (2012) 1631–1634. <https://doi.org/10.1007/s11172-012-0218-z>.
- [82] M.D. Ganji, H. Yazdani, Interaction between B-Doped C₆₀ Fullerene and Glycine Amino Acid from First-Principles Simulation, *Chinese Physics Letters.* 27 (2010) 043102. <https://doi.org/10.1088/0256-307X/27/4/043102>.
- [83] A.F. Jalbout, Ameliorating the formation of fullerene complexes with amino acids: a theoretical study, *Int J Mod Phys B.* 25 (2011) 4667–4678. <https://doi.org/10.1142/S0217979211039975>.
- [84] B. Lal, Computational study of enantioselective interaction between C₆₀ fullerene and its derivatives with L-histidine, *J Mol Model.* 13 (2007) 531–536. <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0179-6>.
- [85] V.B. Luzhkov, V.S. Romanova, A.I. Kotelnikov, Quantum chemical calculations of the dissociation constants pK_a for L-Ala-C₆₀H (an amino acid derivative of fullerene) in

- water, Russian Chemical Bulletin. 63 (2014) 567–571. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0474-1>.
- [86] Vladimir A. Basiuk, M. Bassioux, Interaction of Short Homopeptides of Glycine and L-Alanine with Fullerene C_{60} , J Comput Theor Nanosci. 8 (2011) 243–252. <https://doi.org/10.1166/jctn.2011.1685>.
- [87] F. Naderi, S. Rostamian, B. Naderi, A study on the electronic and structural properties of fullerene C_{36} and its interaction with amino acid, International Journal of Physical Sciences. 7 (2012) 2006–2009. <https://doi.org/10.5897/IJPS11.1349>.
- [88] C. MacIel, E.E. Fileti, R. Rivelino, Assessing the solvation mechanism of $C_{60}(OH)_{24}$ in aqueous solution, Chem Phys Lett. 507 (2011) 244–247. <https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2011.03.080>.
- [89] A. Dawid, K. Górny, Z. Gburski, The influence of distribution of hydroxyl groups on vibrational spectra of fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$ isomers: DFT study, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 136 (2015) 1993–1997. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2014.08.023>.
- [90] Z. Wang, S. Wang, Z. Lu, X. Gao, Syntheses, Structures and Antioxidant Activities of Fullerenols: Knowledge Learned at the Atomistic Level, J Clust Sci. 26 (2015) 375–388. <https://doi.org/10.1007/S10876-015-0855-0/FIGURES/6>.
- [91] X.J. Li, X.H. Yang, L.M. Song, H.J. Ren, T.Z. Tao, A DFT study on structure, stability, and optical property of fullerenols, Struct Chem. 24 (2013) 1185–1192. <https://doi.org/10.1007/S11224-012-0137-5/FIGURES/5>.
- [92] A. Pitek, A. Dawid, Z. Gburski, The properties of small fulleranol cluster $(C_{60}(OH)_{24})_7$: Computer simulation, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 79 (2011) 819–823. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2010.08.059>.
- [93] B.C. Wang, H.W. Wang, H.C. Tso, T.L. Chen, Y.M. Chou, Theoretical studies of $C_{70}(OH)_n$ ($n=14, 16, 18$ and 20) fullerenols, Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 581 (2002) 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(01\)00756-4](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(01)00756-4).
- [94] H. He, L. Zheng, P. Jin, M. Yang, The structural stability of polyhydroxylated $C_{60}(OH)_{24}$: Density functional theory characterizations, Comput Theor Chem. 974 (2011) 16–20. <https://doi.org/10.1016/J.COMPTC.2011.07.005>.
- [95] A. Dawid, K. Górny, Z. Gburski, Water Solvent Effect on Infrared and Raman Spectra of $C_{60}(OH)_{24}$ Fulleranol Isomers: DFT Study, Journal of Physical Chemistry C. 121 (2017) 2303–2315.

https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.6B06484/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JP-2016-06484U_0021.GIF.

- [96] G.I. Timofeeva, V.S. Romanova, L.A. Lopanova, Molecular characteristics of water-soluble fullerene derivatives of amino acids and peptides, *Russian Chemical Bulletin*. 45 (1996) 834–837. <https://doi.org/10.1007/BF01431308>.
- [97] K.N. Semenov, N.M. Ivanova, N.A. Charykov, V.A. Keskinov, S.S. Kalacheva, N.N. Duryagina, P. V. Garamova, N.A. Kulenova, A. Nabieva, Volume properties and refraction of aqueous solutions of bisadducts of light fullerene C₆₀ and essential amino acids lysine, threonine, and oxyproline (C₆₀(C₆H₁₃N₂O₂)₂, C₆₀(C₄H₈NO₃)₂, and C₆₀(C₅H₉NO₂)₂) at 25°C, *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 91 (2017) 315–322. <https://doi.org/10.1134/S0036024417020261/METRICS>.
- [98] 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>.
- [99] B.A. Noskov, K.A. Timoshen, A. V. Akentiev, N.A. Charykov, G. Loglio, R. Miller, K.N. Semenov, Dynamic surface properties of C₆₀-arginine and C₆₀-L-lysine aqueous solutions, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 529 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.05.055>.
- [100] 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>.
- [101] G.I. Timofeeva, A.A. Tepanov, V.A. Lopanov, V.S. Romanova, A study of the behavior of disubstituted methyl esters of peptide derivatives of fullerene C₆₀ in aqueous solutions, *Russian Chemical Bulletin*. 61 (2012) 1635–1637. <https://doi.org/10.1007/s11172-012-0219-y>.
- [102] G.I. Timofeeva, V.S. Romanova, Dependence of the degree of association of mono- and disubstituted biologically active derivatives of fullerene C₆₀ in aqueous solutions on the concentration and nature of substituents, *Russian Chemical Bulletin*. 56 (2007) 2389–2393. <https://doi.org/10.1007/s11172-007-0380-x>.

- [103] G.I. Timofeeva, E.F. Kuleshova, V.S. Romanova, Dependence of the degree of association of water-soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene[60] on pH and the ionic strength of a solution, *Russian Chemical Bulletin*. 46 (1997) 472–475. <https://doi.org/10.1007/BF02495397>.
- [104] A.N. Danilenko, V.S. Romanova, E.F. Kuleshova, Z.N. Parnes, E.E. Braudo, Heat capacities of aqueous solutions of amino acid and dipeptide derivatives of fullerene, *Russian Chemical Bulletin*. 47 (1998) 2134–2136. <https://doi.org/10.1007/BF02494267>.
- [105] 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>.
- [106] 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>.
- [107] M.Yu. Matuzenko, A.A. Shestopalova, K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.A. Keskinov, Cryometry and excess functions of the adduct of light fullerene C₆₀ and arginine – C₆₀(C₆H₁₂NaN₄O₂)₈H₈ aqueous solutions, *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. (2015) 715–725. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2015-6-5-715-725>.
- [108] K.N. Semenov, N.A. Charykov, Solubility Diagram of a Fullerenol-d-NaCl-H₂O System at 25°C, *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 86 (2012) 1636–1638. <https://doi.org/10.1134/S0036024412100226/METRICS>.
- [109] 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>.
- [110] F. Moussa, P. Chretie, 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, *Fullerene Science and Technology*. 3 (1995) 333–342. <https://doi.org/10.1080/153638X9508543788>.
- [111] 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., *Fullerene Science and Technology*. 4 (1996) 21–29. <https://doi.org/10.1080/10641229608001534>.
- [112] 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 Intra-gastrical Administrations to Rats, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 23 (2015) 658–668. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2014.949695>.
- [113] 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>.
- [114] 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, *Toxicological Sciences*. 91 (2006) 173–183. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj127>.
- [115] 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, *Toxicology in Vitro*. 25 (2011) 2105–2112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.013>.
- [116] 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>.
- [117] 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>.
- [118] 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 A Polym Chem*. 50 (2012) 119–126. <https://doi.org/10.1002/pola.24995>.
- [119] 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>.

- [120] J.D. Fortner, D.-I. Kim, A.M. Boyd, J.C. Falkner, S. Moran, V.L. Colvin, J.B. Hughes, J.-H. Kim, Reaction of Water-Stable C₆₀ Aggregates with Ozone, *Environ Sci Technol.* 41 (2007) 7497–7502. <https://doi.org/10.1021/es0708058>.
- [121] 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>.
- [122] 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>.
- [123] 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>.
- [124] D.A. Navarro, R.S. Kookana, M.J. McLaughlin, J.K. Kirby, Fate of radiolabeled C₆₀ fullerenes in aged soils, *Environmental Pollution.* 221 (2017) 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.077>.
- [125] K. Bhattacharya, S.P. Mukherjee, A. Gallud, S.C. Burkert, S. Bistarelli, S. Bellucci, M. Bottini, A. Star, B. Fadeel, Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation, *Nanomedicine.* 12 (2016) 333–351. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2015.11.011>.
- [126] 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>.
- [127] 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>.
- [128] 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, *Chemical Engineering Journal.* 334 (2018) 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.062>.
- [129] Y. Yamakoshi, S. Sueyoshi, N. Miyata, Biological activity of photoexcited fullerene, *Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* (1999) 50–60.
- [130] Y. Ma, Y. Li, M. Guan, C₈₄-carboxyfullerenes as efficient photosensitizers against cancer cells, *Nanomedicine.* 14 (2018) 1818. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.216>.

- [131] 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>.
- [132] 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>.
- [133] 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>.
- [134] 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>.
- [135] 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.* 186 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.027>.
- [136] 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>.
- [137] В.А. Волков, М.В. Воронков, Н.Н. Сажина, Д.В. Курилов, Д.В. Вохмянина, О.В. Ямскава, Ю.Ц. Мартиросян, Д.Л. Атрошенко, Л.Ю. Мартиросян, В.С. Романова, Механизм антиоксидантного действия и взаимосвязь строения и активности N-монозамещенных аминокислотных производных фуллерена C₆₀, *Кинетика и Катализ.* 62 (2021) 343–353. <https://doi.org/10.31857/S0453881121030096>.
- [138] 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 fullereneol, $C_{60}(OH)_{24}$, Nitric Oxide. 11 (2004) 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.08.003>.
- [139] 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 fullereneol 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>.
- [140] R. Injac, M. Perse, M. Boskovic, V. Djordjevic-Milic, A. Djordjevic, A. Hvala, A. Cerar, B. Strukelj, Cardioprotective Effects of Fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ 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>.
- [141] V. Djordjević-Milić, A. Djordjević, S. Dobrić, R. Injac, D. Vučković, K. Stankov, V. Dragojević-Simić, Lj. Suvajdžić, Influence of Fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$; on Doxorubicin Induced Cardiotoxicity in Rats, Materials Science Forum. 518 (2006) 525–530. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.518.525>.
- [142] R. Injac, N. Radic, B. Govedarica, M. Perse, A. Cerar, A. Djordjevic, B. Strukelj, Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ through inhibition of oxidative stress, Pharmacological Reports. 61 (2009) 335–342. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70041-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70041-6).
- [143] R. Injac, M. Perse, N. Obermajer, V. Djordjevic-Milic, M. Prijatelj, A. Djordjevic, A. Cerar, B. Strukelj, Potential hepatoprotective effects of fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas, Biomaterials. 29 (2008) 3451–3460. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.048>.
- [144] R.R. Panchuk, S. V. Prylutska, V. V. Chumak, N.R. Skorokhyd, L. V. Lehka, M.P. Evstigneev, Y.I. Prylutsky, W. Berger, P. Heffeter, P. Scharff, U. Ritter, R.S. Stoika, Application of C_{60} fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment in vitro and in vivo, J Biomed Nanotechnol. 11 (2015) 1139–1152. <https://doi.org/10.1166/JBN.2015.2058>.
- [145] L.-H. Lu, Y.-T. Lee, H.-W. Chen, L.Y. Chiang, H.-C. Huang, The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fullereneol, polyhydroxylated C_{60} , on vascular smooth muscle cells, Br J Pharmacol. 123 (1998) 1097–1102. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701722>.

- [146] M.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) 438–445. <https://doi.org/10.1111/J.2042-7158.1997.TB06821.X>.
- [147] 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 Surf B Biointerfaces.* 58 (2007) 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.005>.
- [148] J. Grebowski, P. Kazmierska, G. Litwinienko, A. Lankoff, M. Wolszczak, A. Krokosz, Fulleranol C₆₀(OH)₃₆ protects human erythrocyte membrane against high-energy electrons, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1860 (2018) 1528–1536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.005>.
- [149] 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.* 102 (2011) 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.09.006>.
- [150] 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>.
- [151] 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>.
- [152] 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 Surf B Biointerfaces.* 157 (2017) 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.065>.
- [153] V. V. Sharoyko, E.B. Serebriakov, S. V. Ageev, A. V. Petrov, A.A. Meshcheriakov, N.A. Charykov, I. V. Murin, D.N. Maistrenko, O.E. Molchanov, K.N. Semenov, Biocompatibility and biological activity of C₇₀ fullerene adduct with L-threonine

- ($C_{70}(C_4H_9NO_3)_2$), *Biochem Biophys Res Commun.* 636 (2022) 50–56.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.10.054>.
- [154] 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 $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, *Toxicology in Vitro.* 62 (2020) 104683.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104683>.
- [155] P.L. Olive, J.P. Banáth, R.E. Durand, Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay, *Radiat Res.* 122 (1990) 86–94. <https://doi.org/10.2307/3577587>.
- [156] G.G. Panova, E.B. Serebryakov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, O.S. Shemchuk, E. V. Andrusenko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, A.M. Shpanev, L.L. Dulneva, N.E. Podolsky, V. V. Sharoyko, Bioactivity study of the C_{60} -L-threonine derivative for potential application in agriculture, *J Nanomater.* 2019 (2019).
<https://doi.org/10.1155/2019/2306518>.
- [157] Y.I. Frenkel, *Kinetic Theory of Liquids*, Oxford University Press, Oxford, 1946.
- [158] O.S. Manyakina, K.N. Semenov, N.A. Charykov, N.M. Ivanova, V.A. Keskinov, V. V. Sharoyko, D.G. Letenko, V.A. Nikitin, V. V. Klepikov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the water-soluble C_{70} -tris-malonic solutions, *J Mol Liq.* 211 (2015) 487–493.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.06.071>.
- [159] K.N. Semenov, N.A. Charykov, I. V. Murin, Y. V. Pukharenko, Physico-chemical properties of the C_{60} -tris-malonic derivative water solutions, *J Mol Liq.* 201 (2015) 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.11.019>.
- [160] K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Keskinov, Fullerenol synthesis and identification. Properties of the fullerenol water solutions, *J Chem Eng Data.* 56 (2011) 230–239.
<https://doi.org/10.1021/je100755v>.
- [161] 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>.
- [162] 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>.
- [163] 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>.
- [164] 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>.
- [165] M.Yu. Matuzenko, A.A. Shestopalova, K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.A. Keskinov, Cryometry and excess functions of the adduct of light fullerene C₆₀ and arginine — C₆₀(C₆H₁₂NaN₄O₂)₈H₈ aqueous solutions, *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics.* (2015) 715–725. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2015-6-5-715-725>.
- [166] 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>.
- [167] N.M. Safyannikov, N.A. Charykov, P. V Garamova, K.N. Semenov, V.A. Keskinov, A. V Kurilenko, I.A. Cherepcova, D.P. Tyurin, V. V Klepikov, M.Y. Matuzenko, N.A. Kulenova, A.A. Zolotarev, Cryometry data in the binary systems bis-adduct of C₆₀ and indispensable aminoacids-lysine, threonine, oxyproline, *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics.* 9 (2018) 46–48. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2018-9-1-46-48>.
- [168] N.A. Charykov, K.N. Semenov, A. V. Kurilenko, V.A. Keskinov, D.G. Letenko, N.A. Kulenova, A.A. Zolotarev, V. V. Klepikov, Modeling of systems with aqueous solutions of UO₂²⁺ salts. Asymmetric model of excess thermodynamic functions, based on virial expansion of the Gibbs free energy of the solution, *VD-AS, Radiochemistry.* 59 (2017) 134–142. <https://doi.org/10.1134/S1066362217020059>.
- [169] P.L. Olive, J.P. Banáth, R.E. Durand, J.P. Banath, Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay, *Radiat Res.* 122 (1990) 86. <https://doi.org/10.2307/3577587>.

- [170] 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>.
- [171] А.А. Мещеряков, Функционализация фуллерена C₆₀ для получения материалов биомедицинского назначения, Диссертация представлена на соискание учёной степени кандидата химических наук, Санкт-Петербургский государственный университет, 2023.

Saint Petersburg State University

Manuscript copyright

Serebriakov Evgenii Borisovich

**Physicochemical study of
C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine**

Scientific specialisation 1.4.4. Physical chemistry
PhD thesis 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

2023

Content

List of abbreviations	141
Introduction.....	143
Chapter 1. Literature Review	147
1.1. General information about fullerenes.....	147
1.2. Fullerenes adducts with amino acids preparation	148
1. 3. Thermodynamic properties of fullerenes and fullerene adducts.....	153
1.4. Physicochemical properties of fullerene adducts.....	158
1.6. Biological activity of fullerenes and their adducts.....	165
1.6.1 Toxicity of fullerenes and their adducts	165
1.6.2. Fullerenes biodegradation.....	167
1.6.3. Photosensitivity and pro-oxidant properties	167
1.6.4. Antioxidant and cytoprotective properties.....	169
1.6.5. Radioprotective properties.....	171
1.6.6. Interaction with proteins	171
Chapter 2. Experimental part	173
2.1. Synthesis and identification of C ₇₀ -Lys and C ₇₀ -Thr adducts.....	173
2.2. Physicochemical study of solutions containing adducts C ₇₀ -Lys and C ₇₀ -Thr	174
2.3. Study of biocompatibility of adducts C ₇₀ -Lys and C ₇₀ -Thr	175
2.3.1. Haemocompatibility.....	175
2.3.2. Antiradical activity	177
2.3.3. Cytotoxicity and proliferation.....	177
2.3.4. Interaction with DNA	178
Chapter 3. Results and discussion.....	179
3.1. Synthesis and identification of adducts C ₇₀ -Lys and C ₇₀ -Thr.....	179
3.1.1. ¹³ C NMR spectroscopy	179
3.1.2. FT-IR spectroscopy.....	179

3.1.3. Thermogravimetric analysis	182
3.1.4. Spectroscopy in the UV and visible region	183
3.1.5. elemental analysis	184
3.1.6. HPLC	184
3.2. Physicochemical Properties of Aqueous Solutions of C ₇₀ -Lys and C ₇₀ -Thr Adducts ..	186
3.2.1. Densities of aqueous solutions.....	186
3.2.2. Viscosities of aqueous solutions	194
3.2.3. Refractions of aqueous solutions	198
3.2.4. Electrical conductivity of aqueous solutions	202
3.2.5. Surface properties of aqueous solutions	204
3.2.6. Excess thermodynamic functions	208
3.2.7. Nanoparticles size distribution and ζ -potentials	216
3.2.8. Correlation between density and viscosity experimental data.....	222
3.3. Biocompatibility of C ₇₀ -Lys and C ₇₀ -Thr adducts	226
3.3.1. Haemocompatibility.....	226
3.3.2. Antiradical activity	237
3.3.3. Proliferation and cytotoxicity	240
3.3.4. Interaction on DNA	241
Main results and conclusions	248
Acknowledgments.....	249
List of cited literature.....	250

List of abbreviations

AFM — atomic force microscopy;

Ala — alanine;

APTT — activated partial thromboplastin time;

Arg — arginine;

Asp — asparagine;

BAM — Brewster Angle Microscopy;

BSA — bovine serum albumin;

CP/MAS — cross-polarization/magic angle spinning;

Cys — cysteine;

DE — direct excitation;

DPPH — 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl;

EG — ethylene glycol;

Glu — glutamic acid;

Gly — glycine;

HEK293 — human embryonic kidney cells;

HeLa — human cervical carcinoma cell line;

HIV — human immunodeficiency virus;

HPLC — high performance liquid chromatography;

HSA — human serum albumin;

Hyp — hydroxyproline;

Lm8 — mouse osteosarcoma cell line;

Lys — lysine;

Met — methionine;

MTT — 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide;

NFA — p-nitrophenylacetate;

PBMCs — human peripheral blood mononuclear cells;

PBS — phosphate buffered saline;

PDT — photodynamic therapy;

PT — prothrombin time;

ROS — reactive oxygen species;

Thr — threonine;

UV — ultraviolet;

VD-AS — an asymmetric virial decomposition model.

Introduction

At present, one of the most dynamically developing areas of modern science is the chemistry of nanostructures - particularly, fullerenes and their derivatives. This is due to the fact that compounds of the fullerene series (the only soluble form of carbon) exhibit unique physicochemical and biological properties that determine the prospects for their use in various fields of science and technology (materials science, mechanics, engineering, construction, electronics, optics, medicine, pharmacology, agriculture, food and cosmetic industries, etc.) [1–4]. It should be noted that one of the most promising areas for the use of fullerenes is biomedicine. It has been shown that light fullerenes C_{60} and C_{70} exhibit high antioxidant activity, have a radioprotective effect, penetrate cell membranes, modulate transmembrane ion transport, etc. [5,6]. Fullerenes can be the basis for the creation of new high-tech medical materials and drugs, but their application is limited due to incompatibility with water and aqueous solutions. As is known, fullerenes are soluble in nonpolar organic solvents, while they are practically insoluble in water ($<10^{-11} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) [7,8].

Synthetic approaches, that make it possible to obtain water-soluble fullerene adducts, the most promising of which are polyhydroxylated fullerenes, carboxylated fullerenes, fullerene adducts with amino acids and peptides, that have been developed in recent years, is a great achievement in the fullerenes chemistry [1,2,5,6,9]. The promise of these compounds is associated with a wide range of their biological activity. An analysis of the publications shows that water-soluble fullerene adducts exhibit antitumor [10], antiviral [11–13], antibacterial [14], antioxidant [15], and neuroprotective [16,17] properties, photodynamic [18,19] and membranotropic [20–22] activity.

Thus, the development of new scalable, express methods for the synthesis of water-soluble fullerene derivatives, the study of their physicochemical properties (density, viscosity, electrical conductivity, particle size distribution, ζ -potential, phase equilibria, etc.), as well as the study of biocompatibility (haemocompatibility, DNA binding, antioxidant activity, cytotoxicity) are of great relevance.

Objective

The aim of the work is to develop methods for the synthesis, to study the physicochemical properties of water-soluble adducts of fullerene C_{70} with L-lysine and L-threonine, which have the potential to be used in nanobiomedicine.

Achieving this goal includes solving the following tasks:

Tasks

1. Development of one-step procedures for the synthesis of C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine.
2. Identification of the synthesized C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine using a complex of modern physicochemical methods: ¹³C NMR, FTIR, UV spectroscopy, thermogravimetric analysis, elemental analysis, HPLC.
3. Study of the physicochemical properties of aqueous solutions of the synthesized C₇₀ fullerene adducts: temperature and concentration dependences of density, viscosity, refraction, electrical conductivity, surface properties, excess thermodynamic functions, nanoparticle size distribution, and ζ-potentials.
4. Study of the biocompatibility of the synthesized water-soluble C₇₀ fullerene adducts, including the study of haemocompatibility (spontaneous haemolysis, platelet aggregation, plasma coagulation haemostasis, binding to human serum albumin and its esterase activity), the effect on cell lines (cytotoxicity, cell proliferation), as well as interaction with DNA (binding to DNA and genotoxicity).

Scientific novelty of the results

1. For the first time, single-stage procedures for obtaining water-soluble adducts of fullerene C₇₀ with L-lysine and L-threonine have been developed, which make it possible to obtain the final product with a yield of more than 85%.
2. An experimental data array on the study of the physicochemical properties of C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine solutions was obtained, as the basis for their further application in biology and medicine.
3. For the first time, the semi-empirical model VD-AS (Virial Decomposition Asymmetric Model), based on the virial expansion of the Gibbs molar energy in mole fractions of components in solution, and the boundaries of stability relative to phase separation of C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine were determined aqueous solutions.
4. Based on experimental data on haemocompatibility, effects on cell lines, and effects on DNA, it was shown that the studied adducts are biocompatible and non-toxic.

Reliability and approbation of research results

The results of the PhD work were published in five scientific articles in peer-reviewed journals of the first and second quartiles and reported at four international and all-Russian scientific conferences.

Publication list

1. 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> (Q1, IF 6.633).
2. 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> (Q1, IF 6.633).
3. 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> (Q1, IF 6.633).
4. G.G. Panova, E.B. Serebryakov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, O.S. Shemchuk, E. V. Andrusenko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, A.M. Shpanev, L.L. Dulneva, N.E. Podolsky, V. V. Sharoyko. Bioactivity study of the C₆₀-L-threonine derivative for potential application in agriculture. *J Nanomater.* (2019) ID 2306518. <https://doi.org/10.1155/2019/2306518> (Q2, IF 3.791).
5. V. V. Sharoyko, E.B. Serebriakov, S. V. Ageev, A. V. Petrov, A.A. Meshcheriakov, N.A. Charykov, I. V. Murin, D.N. Maistrenko, O.E. Molchanov, K.N. Semenov. Biocompatibility and biological activity of C₇₀ fullerene adduct with L-threonine (C₇₀(C₄H₉NO₃)₂). *Biochem Biophys Res Commun.* 636 (2022) 50–56. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.10.054> (Q1, IF 3.322).

List of conferences

1. E. B. Serebryakov, N. E. Podolsky, K. N. Semenov, N. A. Charykov. Cryometric study of the C₇₀-Lys–H₂O binary system. All-Russian A. A. Yakovkin competition-conference, St. Petersburg, 2018.
2. E. B. Serebryakov, E. V. Andrusenko, K. N. Semenov, N. A. Charykov. Physico-chemical properties of aqueous solutions C₇₀-L-lysine. All-Russian conference "Chemistry of solid state and functional materials", St. Petersburg, 2018.

3. E. B. Serebryakov, S. V. Ageev. Physicochemical and biological properties of light fullerene derivatives with L-lysine and L-threonine. IX International Youth Medical Congress "St. Petersburg Scientific Readings - 2022", St. Petersburg, 2022.
4. E. B. Serebryakov. Study of the effect of adducts of light fullerenes with essential amino acids C₇₀-Lys and C₇₀-Thr on plasma coagulation haemostasis. XXIX All-Russian Conference of Young Scientists with International Participation "Current Problems of Biomedicine - 2023", St. Petersburg, 2023.

The work was supported financially by the Ministry of Health of the Russian Federation (government assignment on the topic "Development of a radioprotector based on water-soluble forms of nanocarbon modified with L-amino acids", registration No. 123020800170-8).

Provisions for defense

1. One-step procedure for the synthesis of water-soluble C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine, which makes it possible to obtain the final product with a yield of more than 85%.
2. Data on the identification of synthesized C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine by the complex of physicochemical methods.
3. Data on the study of the physicochemical properties of solutions in binary systems C₇₀-L-lysine - H₂O and C₇₀-L-threonine - H₂O.
4. Results of *in vitro* biocompatibility studies of the synthesized C₇₀ fullerene adducts.

Thesis structure

The dissertation consists of introduction, three chapters, conclusion; the first chapter presents a review of the literature, the second chapter describes the methods of experimental studies, the third chapter discusses the results obtained on the synthesis, identification, physicochemical properties and biocompatibility of C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine. The dissertation is presented on 130 pages of typewritten text, contains 59 figures, 24 tables and 171 references.

The author's personal contribution consisted in the synthesis and identification of C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine, the study of the physicochemical properties and biocompatibility of the obtained compounds, the preparation of scientific publications, and the presentation of the obtained data at scientific conferences.

Chapter 1. Literature Review

1.1. General information about fullerenes

Let us consider the structural characteristics of two typical representatives of the fullerene series: C_{60} and C_{70} . There are two types of bonds in the I_h - C_{60} cluster: r_1 (only five-membered rings) and r_2 (common for five- and six-membered rings). Calculation methods lead to the conclusion about the difference between the bond lengths r_1 and r_2 , which corresponds to the experimental data, according to which $r_1 = 1,401 \text{ \AA}$; $r_2 = 1,45 \text{ \AA}$. It follows from the results of theoretical studies that among the C_{60} polyhedral isomers, the icosahedral structure is the most stable. The stability of I_h - C_{60} is associated with the presence of 12 equivalent corannull structural fragments. Each corannull fragment contains a five-membered cycle surrounded by five hexagons, which ensures the isolation of five-membered cycles. Qualitative considerations about the energy unfavorability of structures containing adjacent five-membered cycles are confirmed by the calculations [26].

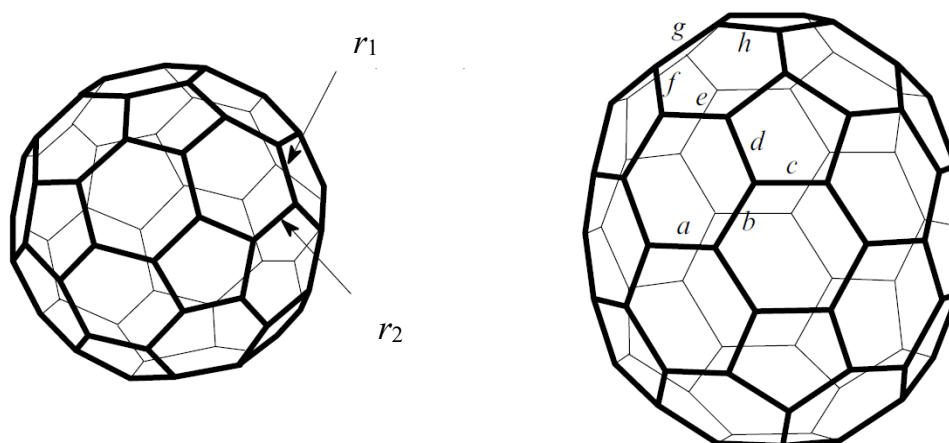


Fig. 1. Structure of the C_{60} (left) and C_{70} (right) fullerene molecules [27].

According to the literature data [28], the diameter of the carbon core is $7,1 \text{ \AA}$, bond lengths: C=C $1,391 \text{ \AA}$, C-C $1,455 \text{ \AA}$, distance between C_{60} molecules in the crystal: $3,1 \text{ \AA}$, density: $1,65 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Spectral characteristics: electron affinity is $2,6\text{--}2,8 \text{ eV}$, ionization potential is $7,6 \text{ eV}$, band gap is $1,9 \text{ eV}$, oscillation frequencies: $528, 577, 1183, 1429 \text{ cm}^{-1}$, refraction index: $2,2$ (630 nm) [28].

The structure of the C_{70} cluster was determined by electron diffraction [29]. It is determined that it has an ellipsoidal shape, described by the D_{5h} symmetry group. There are 8 groups of different C-C bonds in the molecule, the lengths of which vary from $1,37 \text{ \AA}$ to $1,47 \text{ \AA}$ (Fig. 1, Tab. 1). The shortest bonds connect the vertices of two different pentagons, the longest ones are located in 5-membered cycles. The "height" of the molecule is $7,8 \text{ \AA}$. The equatorial

part of C_{70} has a diameter of 6,94 Å. The D_{5h} - C_{70} cluster can be obtained from the two halves of the C_{60} cluster by inserting five pairs of carbon atoms in the equatorial plane, while it contains only isolated five-membered rings. C_{70} fullerene, like other fullerenes, obeys the rule of isolated pentagons, i.e. all five-membered rings in these compounds are surrounded by six-membered rings [30].

Tab. 1. Characteristics of C–C bonds in the C_{70} molecule (Fig. 1) [29].

No.	Designation in Fig.1	Number of bonds in a molecule	Link group	Bond length, nm
1	<i>a</i>	5	hexagon - hexagon	$0,141 \pm 0,002$
2	<i>b</i>	20	hexagon - pentagon	$0,139 \pm 0,001$
3	<i>c</i>	10	inside the pentagon	$0,147 \pm 0,002$
4	<i>d</i>	20	inside the pentagon	$0,146 \pm 0,002$
5	<i>e</i>	10	pentagon - pentagon	$0,137 \pm 0,002$
6	<i>f</i>	20	inside the pentagon	$0,147 \pm 0,002$
7	<i>g</i>	10	pentagon - pentagon	$0,137 \pm 0,002$
8	<i>h</i>	10	inside the pentagon	$0,146 \pm 0,001$

The structures of higher fullerenes ($n \geq 84$) were determined in [31]. Fullerenes with even more atoms, including extended fulleroid carbon structures, are discussed in [32]. The results of quantum-chemical calculations of large clusters indicate the stability of fullerenes with icosahedral symmetry, such as C_{540} . However, the formation of giant fullerenes of the spheroidal type is unlikely, since they must contain a fairly significant part of the “empty space” inside themselves. It is difficult to imagine that during the synthesis of giant clusters, impurity atoms or smaller clusters consisting of carbon atoms will not enter their internal cavity. Some of the giant fullerenes may be cylindrical or form more complex network structures. Such carbon clusters (tubulenes, barrelenes, capsulenes, etc.) are considered in [32].

1.2. Fullerenes adducts with amino acids preparation

Due to the tension in the structure of fullerenes, they are characterized by relatively easy addition reactions: nucleophilic addition, radical addition, cycloaddition, electrophilic addition, electron transfer reactions, etc. A generalized scheme illustrating the functionalization reactions of fullerene C_{60} is shown in Fig. 2.

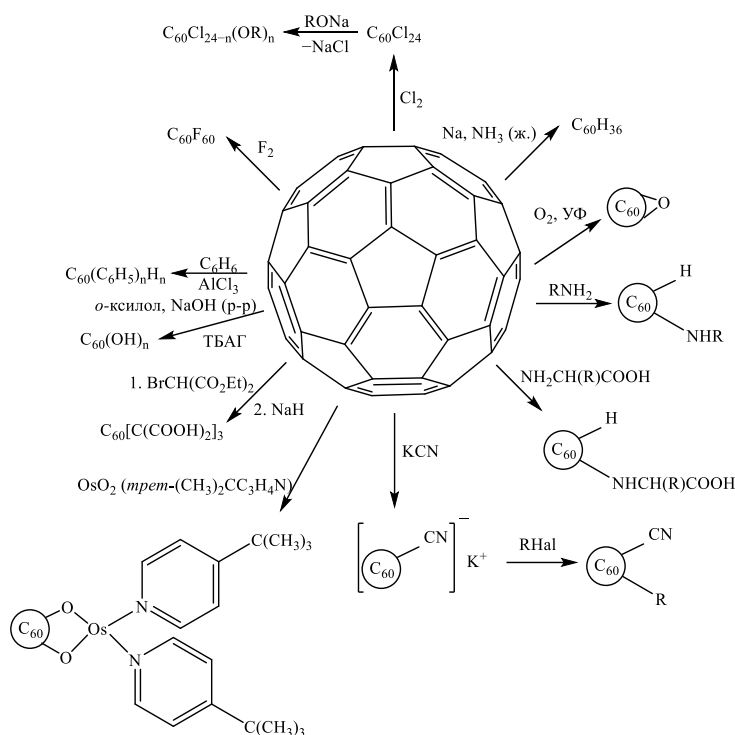


Fig. 2. Chemical properties of C_{60} fullerene [68,69].

The most promising for further practical application of water-soluble light fullerenes adducts with amino acids, peptides, as well as fullerenols and carboxylated fullerenes, 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 Professor I. V. Murin's scientific group. The main approaches to the synthesis of these compounds are summarized in several reviews [1,2,5,6].

Let us consider the main methods for obtaining adducts of fullerenes with amino acids. The first studies of the reactivity of C_{60} and C_{70} light fullerenes showed that fullerenes easily react with primary and secondary amines through the nucleophilic addition reaction [27,33].

In the [34–45], one-step synthesis procedures for the C_{60} adducts with the following amino acids and peptides were proposed: glycine, *p*-aminobenzoic acid, ω -aminocaproic acid, γ -aminobutyric acid, L-proline, L-alanine, methyl-L-alaninate, DL-serine, D-arginine, L-arginine, β -alanine, valine, cystine, phenylalanine, folacin, carnosine and glutathione by the mechanism of nucleophilic addition in an alkaline environment. All compounds obtained were characterized using physicochemical methods (IR spectroscopy, mass spectrometry, ^1H NMR, ^{13}C NMR spectroscopy, elemental analysis, dynamic light scattering and transmission electron microscopy). The general synthesis scheme is shown in Fig. 3.

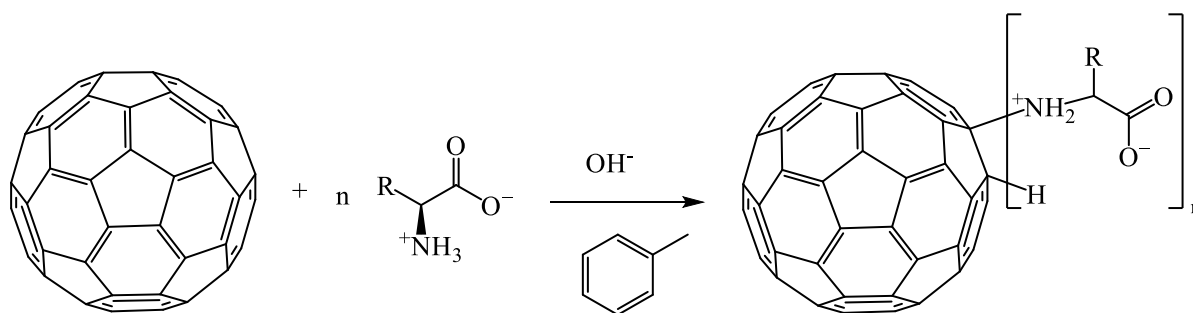


Fig. 3 General scheme for the synthesis of fullerene C_{60} adducts with amino acids [34–45].

Through a one-stage process of interaction of fullerene and amino acids in an alkaline medium, C_{60} fullerene with glycine and L-lysine sodium salts were obtained: $C_{60}(\text{Gly-ONa})_6 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $C_{60}(\text{Lys-ONa})_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, as well as adducts of mixed composition: $C_{60}[(\text{Gly-ONa})_3(\text{Lys-ONa})_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}]$ and $C_{60}[(\text{Gly-ONa})_3(\text{Asp-ONa})_2\text{Arg-ONa}] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. The structures of the obtained compounds were characterized by IR spectroscopy, mass spectrometry, ^1H , ^{13}C NMR spectroscopy [46].

The method for obtaining crystalline hydrates of C_{60} adducts with amino acids with the chemical formula $C_{60}(\text{H})_3\{\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}\}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, where $n = 5-7$; $x = 8-10$ in a solution of *o*-dichlorobenzene and polyethylene glycol from fullerene and potassium salts of the corresponding amino acids was patented. The adducts were identified by IR spectroscopy, elemental and thermogravimetric analysis [47].

In [48], methodology synthesis of water-soluble fullerene adducts from $C_{60}\text{Cl}_6$ has been described - during the synthesis, five chlorine atoms are replaced by amino groups, one chlorine atom remains in the adduct or is replaced by hydrogen (Fig. 4). The same authors in [49] describes the synthesis of water-soluble pentaadducts of C_{60} fullerene with phenylalanine, serine, β -alanine and γ -phenylbutyric acid, during which five chlorine atoms were replaced by amino acids, one chlorine atom by hydrogen. The resulting adducts have five highly polar groups introduced into one of the hemispheres of the fullerene core. Meanwhile, the second hemisphere remains unchanged and highly hydrophobic. Such a molecular structure (Fig. 5) distinguishes these compounds from the vast majority of other water-soluble fullerene adducts. The resulting adducts were characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy.

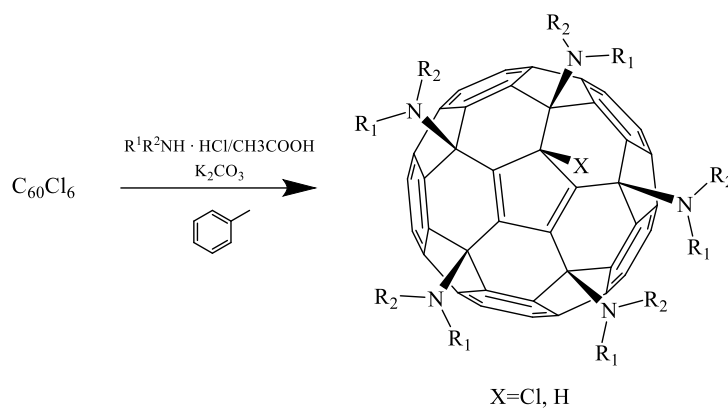


Fig. 4. Synthesis of adducts from $C_{60}Cl_6$ scheme [48].

As a result of 1,3-dipolar cycloaddition of azomethine ylides to C_{60} (Prato reaction), fulleroproline adducts were obtained. The reaction scheme is shown in Fig. 6. The obtained adducts were identified using 1H , ^{13}C NMR spectroscopy, as well as optical spectroscopy [50]. In this work, ways of using the [51] Prato reaction for the synthesis of adducts of fullerenes with amino acids containing from four to five methylene bridges were proposed. The resulting adducts were characterized by 1H , ^{13}C NMR spectroscopy and mass spectrometry.

The paper [52] describes the synthesis of C_{60} adducts with aspartic and glutamic acids. The authors carried out the condensation of *N*-substituted fulleropyrrolidine with L-aspartic and L-glutamic acids containing protected α -amino- and α -carboxyl groups. Their structures were characterized by mass spectrometry, UV, IR, and 1H NMR spectroscopy.

In [53], a new approach to the synthesis of fullerenes functionalized with amino acids and peptides by hydrophosphination using secondary phosphineborane as a crosslinking agent was proposed. The resulting products were identified using 1H , ^{13}C and ^{31}P NMR spectroscopy.

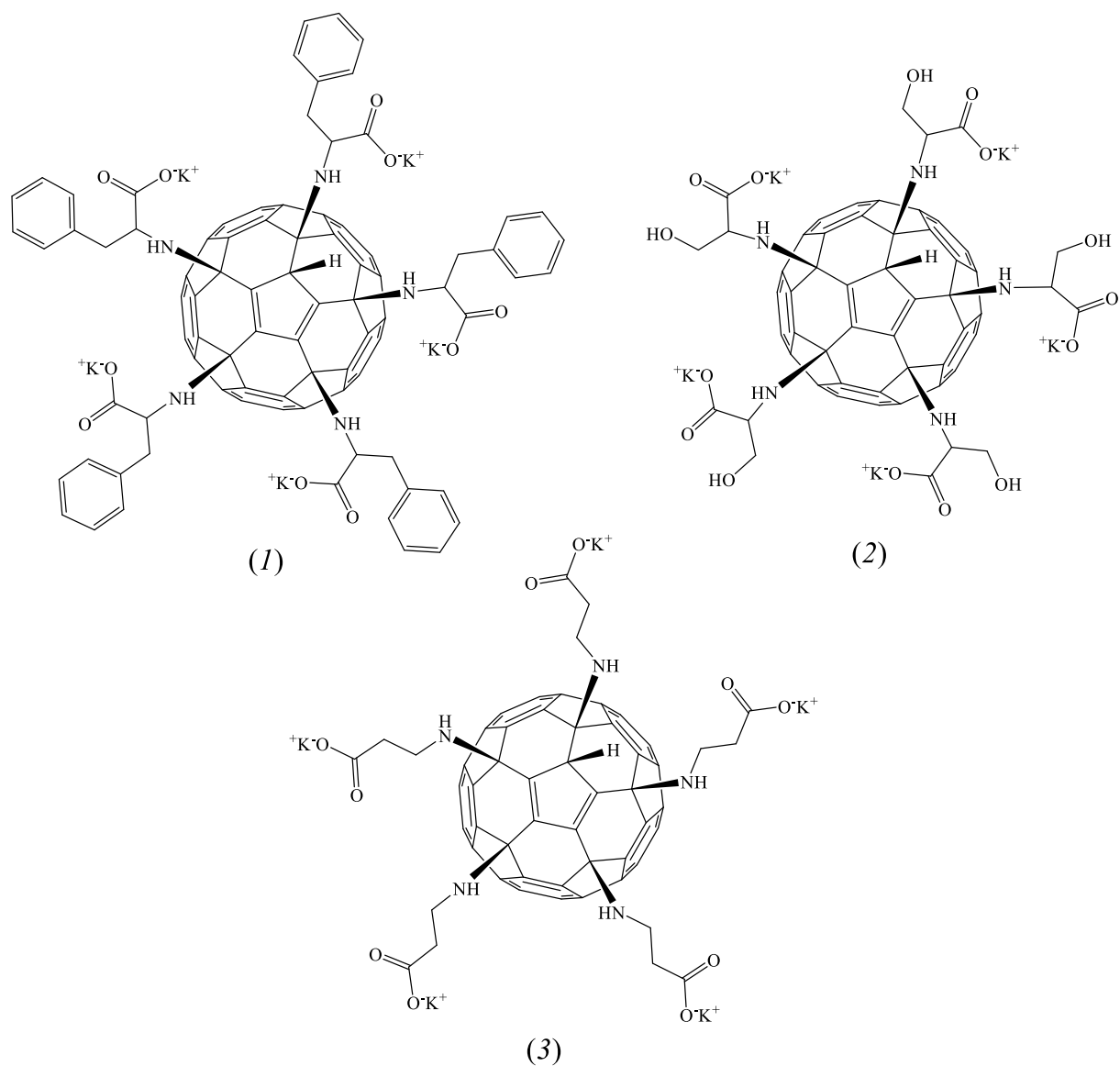


Fig. 5. Structure of C₆₀ pentaadducts with phenylalanine (1), serine (2), β-alanine (3), synthesized from C₆₀Cl₆ [49].

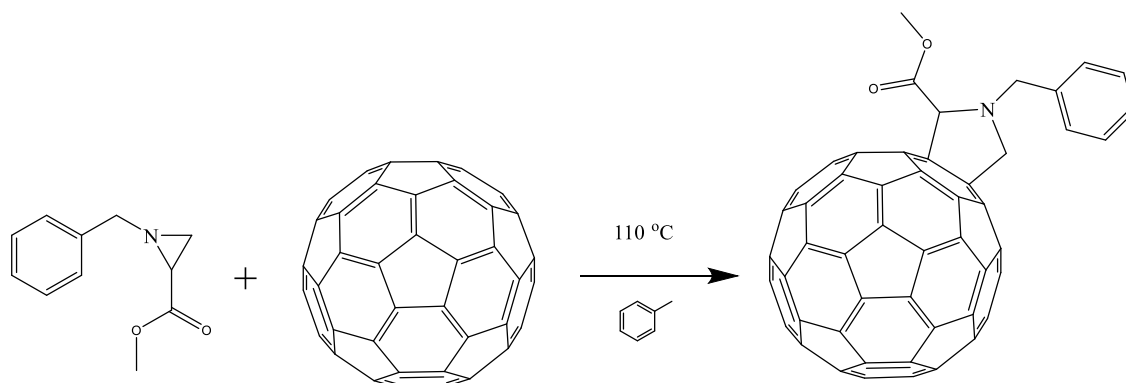


Fig.6. Synthesis of fulleroproline by the Prato reaction scheme [50].

1. 3. Thermodynamic properties of fullerenes and fullerene adducts

Enthalpies of combustion ($\Delta_c H^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) and enthalpies of formation ($\Delta_f H^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) of C_{60} fullerene at 298,15 K and standard pressure, as well as changes in entropy ($\Delta_f S^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), Gibbs energies ($\Delta_f G^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) and the logarithm of the equilibrium constant ($\lg K_f^0$) of the formation of C_{60} fullerene from graphite are given in Tab. 2.

Tab. 2. Enthalpies of combustion ($\Delta_c H^0$) and formation ($\Delta_f H^0$) of C_{60} fullerene at 298,15 K and standard pressure, as well as the change in entropy, the Gibbs energy and the logarithm of the equilibrium constant of the formation of C_{60} fullerene from graphite [54].

$\Delta_c H^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_f H^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_f S^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\Delta_f G^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\lg K_f^0$
-25937 ± 16	2327 ± 17	$420,8 \pm 1,2$	2202 ± 17	$-0,386$

Analysis of the experimental data on the temperature dependence of the heat capacity (Fig. 7) demonstrates that C_{60} can exist in three physical states: glassy crystalline modification (KIII), crystalline (KII) and plastic (KI). The curve (Fig. 7) shows the interconversions KIII \rightarrow KII (86 K), and KII \rightarrow KI (260,7 K). KI crystals have a face-centered cubic lattice, at the nodes of which spherical C_{60} molecules rotate freely, that is, there is an orientational molecular disorder characteristic of plastic crystals. When KI crystals are cooled, the face-centered cubic lattice is rearranged into a simple cubic lattice and the orientational ordering of C_{60} at the lattice sites occurs. Further cooling leads to a transition to the glassy modification of KIII. Thus, in the temperature range $T = 0\text{--}340$ K, two transitions take place: second-order (disordering of molecules in the crystal lattice) and first-order (transition from a simple cubic lattice to a face-centered cubic lattice).

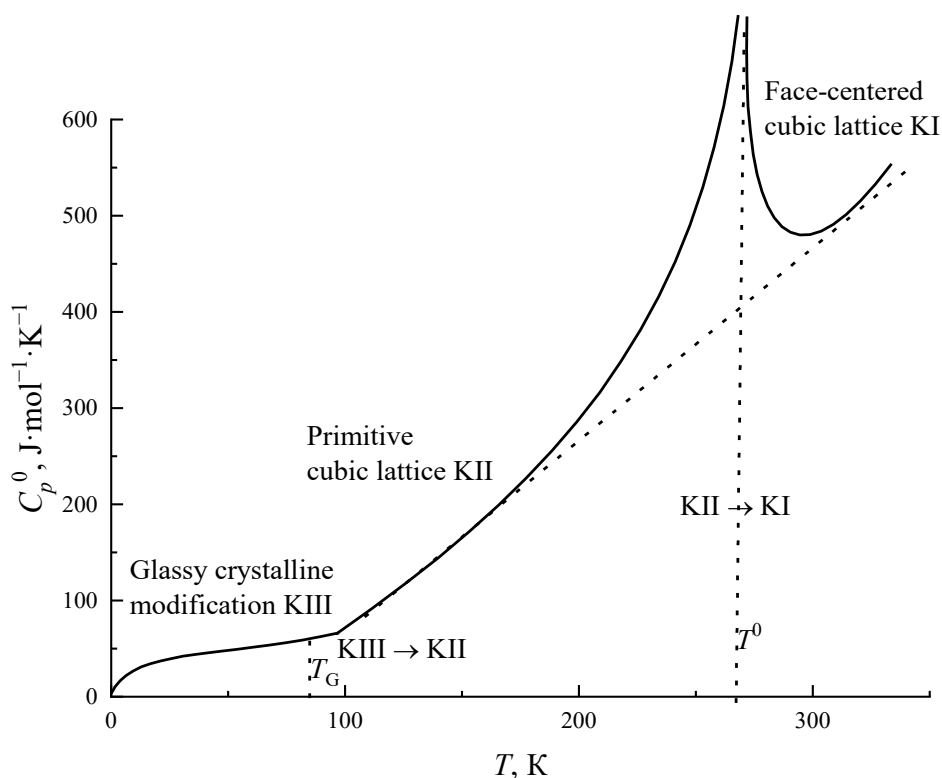


Fig. 7. C_{60} fullerene heat capacity temperature dependence.

Based on the experimental data on the temperature dependence of the isobaric heat capacity [54], the thermodynamic functions of C_{60} fullerene were calculated [54–60].

Tab. 3 shows the C_{70} fullerene thermodynamic functions values.

Tab. 3. The values of the enthalpies of combustion ($\Delta_c H^0$) and formation ($\Delta_f H^0$) of C_{70} fullerene at 298,15 K and standard pressure, as well as the change in entropy, Gibbs energy and the logarithm of the equilibrium constant of the reaction of formation of C_{70} fullerene from graphite at the same conditions [61].

$\Delta_c H^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_f H^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta_f S^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\Delta_f G^0$, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\lg K_f^0$
-30101 ± 10	2555 ± 12	$62,94 \pm 1,41$	2536 ± 12	-445

According to the literature data, fullerene C_{70} is characterized by polymorphism, and at present there are data on several crystalline modifications. KI crystals form a hexagonal lattice, in the nodes of which fullerene molecules rotate almost freely. When KI crystals are cooled to the region of existence of KII crystals, the lattice is rearranged, remaining hexagonal. At the same time, the orientational ordering of C_{70} molecules in the crystal lattice occurs. With a further decrease in temperature, the hexagonal lattice is rearranged into a monoclinic one, and complete orientational ordering of C_{70} molecules in KIII crystals is achieved. When KIII crystals are cooled in the temperature range $T = 19\text{--}45$ K, an anomalous change in heat capacity occurs due

to successive phase transitions and the presence of a mixture of several crystalline phases [60], while two intervals of such a change are visible (Fig. 8). The phase transition temperatures correspond to the maximum value of the apparent heat capacity. The considered transitions KIII \rightarrow KII and KII \rightarrow KI are non-exothermic, there are no breaks in the curves of the dependence of C_p on T on the curves of apparent heat capacities in the transformation range. Both transitions are accompanied by a change in the crystal structure of C_{70} , which is one of the criteria for first-order transitions; however, they are accompanied by a change in molecular orientation from complete order in KIII crystals to complete disorder in KI crystals, which are usually referred to as second-order transitions. Thermodynamic functions of fullerene C_{70} in a wide range of temperatures are presented in [61,62].

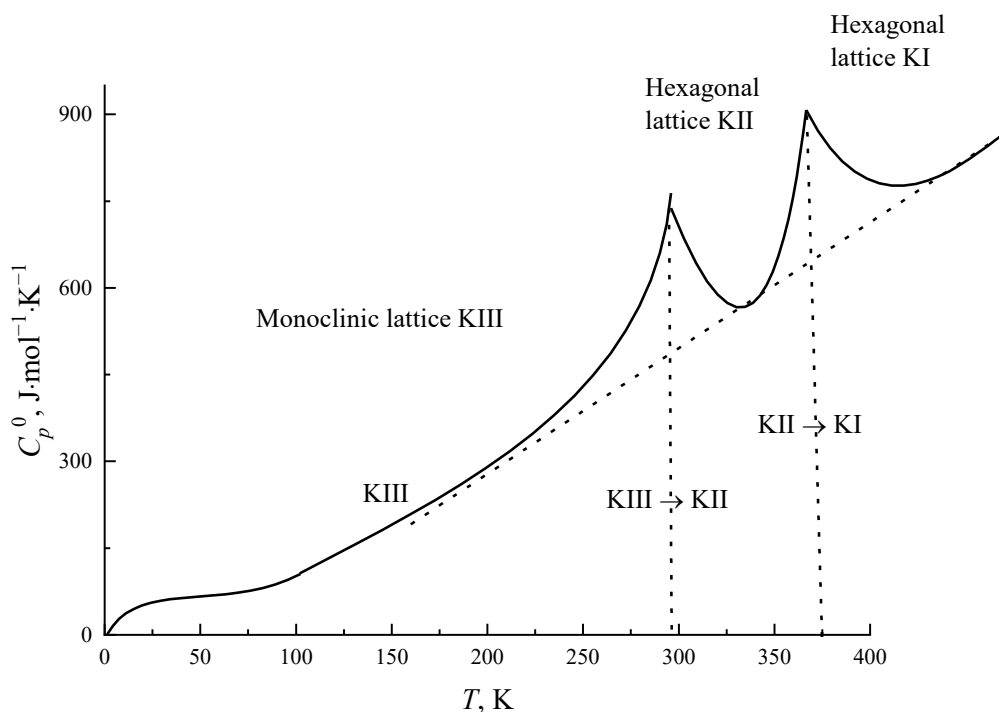
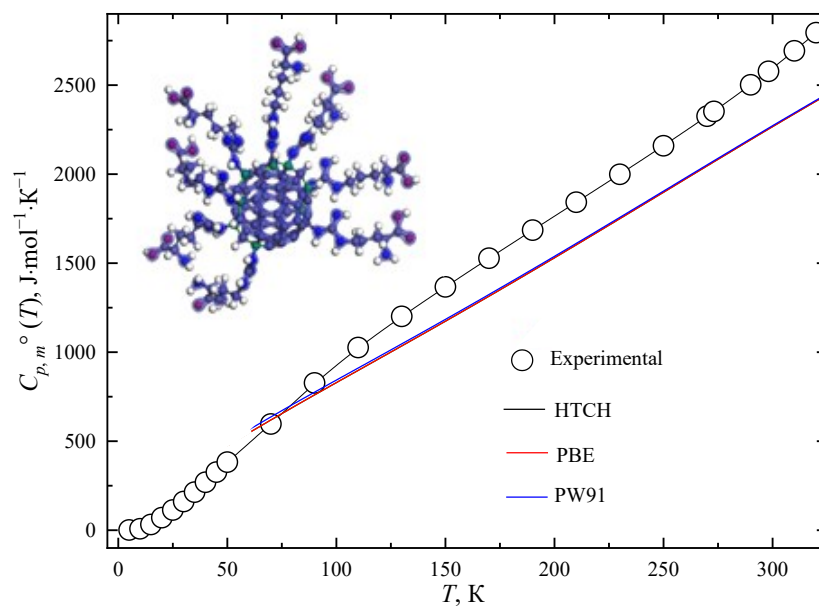


Fig. 8. C_{70} fullerene heat capacity temperature dependence [60].

An analysis of the literature shows a limited number of works devoted to the thermodynamic study of C_{60} and C_{70} fullerenes adducts. To date, the isobaric heat capacities of the crystal solvate $C_{60}Cl_{30} \cdot 0,09Cl_2$ [63], dimeric complex $[(Me_3Si)_3C_{60}]_2$ in the temperature range from 0 to 480 K [64], crystal complex $[(\eta^6\text{-PhCH}(\text{CH}_3)_2)_2\text{Cr}]^+[\text{C}_{60}]^-$ in the temperature range from 0 to 310 K [65], $C_{60}H_{36}$ hydrofullerene in the temperature range from 5 to 340 K [66]. Using the Knudsen effusion method, the authors of [67] studied the temperature dependence of the saturated vapor pressure of the $C_{60}F_{18}$ derivative in the temperature range $T = 591\text{--}671$ K. The authors of the [68] determined the standard molar enthalpy of combustion and

calculated the standard molar enthalpies of formation in the solid and gaseous states of the $C_{60}F_{48}$ derivative. The series of the papers [69–72] presents the enthalpies of combustion and formation, as well as isobaric heat capacities and standard thermodynamic functions (enthalpies, entropies, and Gibbs energies) of C_{60} and C_{70} fullerenes. In works [73–77] the temperature dependences of the isobaric heat capacity of $C_{60}CHCOOH$ monocarboxylated fullerene were studied in the temperature range from 6,8 to 326 K [73], $C_{60}(OH)_{40}$ fulleranol in the temperature range from 5 to 326 K [74], $C_{70}(OH)_{12}$ fulleranol in the temperature range from 9,2 to 304 K [75], $C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$ fullerene adduct with L-arginine in the temperature range from 5 to 328 K [79], $C_{60}(C_6H_{13}N_2O_2)_2H_2$ fullerene adduct with L-lysine [73] in the temperature range from 13 to 326 K, and also the values of standard thermodynamic functions were calculated. As an example, in Fig. 9 shows the temperature dependence of the isobaric heat capacity of the C_{60} adduct with L-arginine obtained by adiabatic vacuum calorimetry in comparison with the calculated data obtained using the DFT method in the DMol³ program within the harmonic approximation. At low temperatures, good agreement was obtained between the calculated and experimental data for two isomers of the C_{60} adduct with L-arginine (for the $C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$ molecule with a uniform (Fig. 9, *a*) and equatorial (Fig. 9, *b*) functional groups distribution).

(a)



(b)

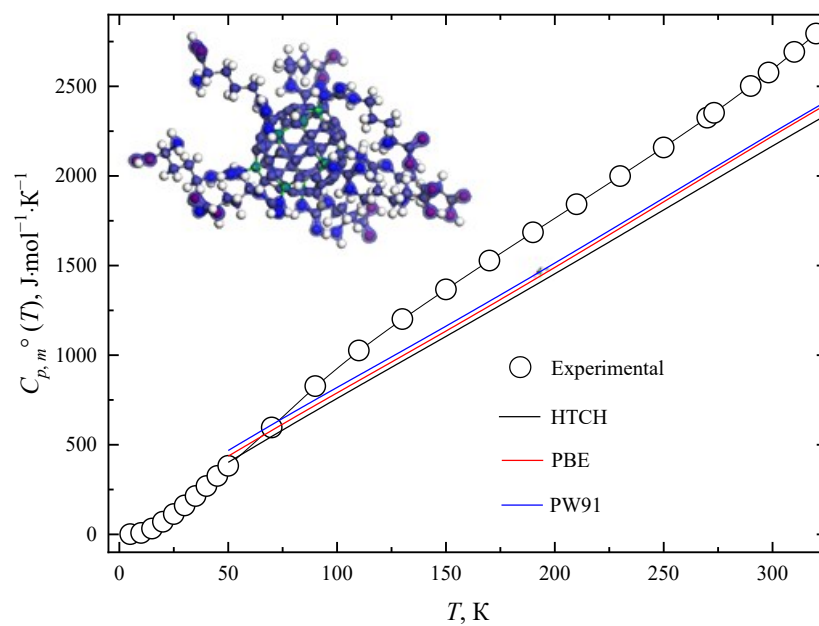


Fig. 9. Comparison of experimental and calculated isobaric heat capacities of $\text{C}_{60}(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2)_8\text{H}_8$ with equatorial (a) and uniform (b) distribution of functional groups. HTCH - black line, PBE - red line, PW 91 - blue line [77].

1.4. Physicochemical properties of fullerene adducts

Let us consider the works devoted to the study of the physicochemical properties of adducts of fullerenes with amino acids. An analysis of the literature shows that the following areas can be singled out, devoted to the physicochemical study of adducts of light fullerenes:

(1) physicochemical study of fullerene adducts by quantum chemistry and molecular dynamics methods;

(2) physicochemical study of fullerene adducts solutions, as well as the establishment of a correlation between the structure, physicochemical properties and biological activity.

Let us briefly dwell on the works devoted to the application of computer simulation methods to the study of fullerenes adducts with amino acids. Ahmadian et al. [78] calculated the electronic structure of the complex based on metallofullerene $C_{60}Al$ and glycine by DFT method. To carry out the calculation, the authors used the SIESTA package with a numerically defined basis, normalizing pseudopotential Troullier–Martins and the PBE functional (considering polarization for valence electrons). During the calculations, the authors carried out a complete optimization of the geometry of the systems under consideration, and the energy of interaction of Gly with $C_{60}Al$ was determined from the differences in the total energies. As a result of the calculations, it was shown that the effect of aluminum on the electronic structure of the $C_{60}Al$ system is very significant due to the formation of molecular orbitals with fullerene, while the electronic structure of glycine does not participate in the formation of molecular orbitals with fullerene. The authors also concluded that glycine preferentially binds to the fullerene backbone through the amino group with the formation of an unstable complex with an interaction energy of $-2,54 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Andreeva et al. [79] were calculated the changes in the standard thermodynamic functions (Gibbs energy, enthalpy, entropy) of the formation reactions of amino - $C_{60}H_n(NH_2)_n$ and carboxamide $(C_{60}H_n(NH_2)_n(CO_2)_n) C_{60}$ derivatives with varying degrees of substitution (Fig. 10). To carry out calculations, the authors used a hybrid method of the density functional theory (M11) implemented in the Gaussian 09 program. The authors showed that the reaction of interaction of polyaminofullerene with carbon dioxide is completely determined by the enthalpy contribution to the Gibbs energy. The authors noted that as the number of amino and carboxamide groups increases, the free energies of hydration of molecules increase, and due to strong electrostatic interactions, carboxamide adducts can exhibit a certain degree of aggregation (cluster formation) in aqueous solutions.

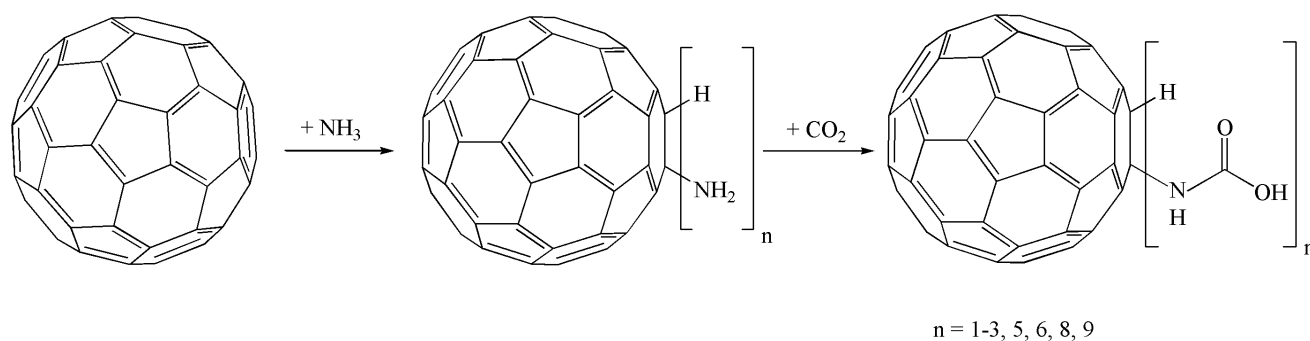


Fig. 10. Reaction for the formation of amino- ($C_{60}H_n(NH_2)_n$) and carboxamide ($C_{60}H_n(NH_2)_n(CO_2)_n$) C_{60} adducts scheme [79].

Basiuk et al. [80] were calculated the non-covalent interaction energies of 20 proteinogenic L-amino acids with C_{60} fullerene in vacuum and water (PCM model). For calculations, the DFT method, implemented in the DMol³ module from the Materials software package Studio with PBE functional and Grimme correction (correction for non-covalent interactions) based on DNP, was used. The authors carried out geometry optimization both for the amino acids themselves and for complexes with fullerene. As a result of the study, it was found that the highest interaction energy corresponds to the C_{60} with L-methionine conjugate (in vacuum and in water), and the lowest interaction energy corresponds to C_{60} with L-threonine conjugates (in vacuum) and C_{60} with L-phenylalanine (in water).

Dolinina et al. [81] studied the interaction of biologically active 1,4-isomers of C_{60} containing substituted proline and substituted ethyl group (Fig. 11) with water molecules by DFT method in Gaussian program 03. The equilibrium conformations of the considered adducts were determined using the B3LYP functional and the 631G* basis. As a result of the study, it was shown that the presence of functional groups reduces the contact area of the fullerene core with water molecules, however, the presence of a non-functionalized (hydrophobic) part of the fullerene molecule promotes the formation of associates, which is confirmed experimentally.

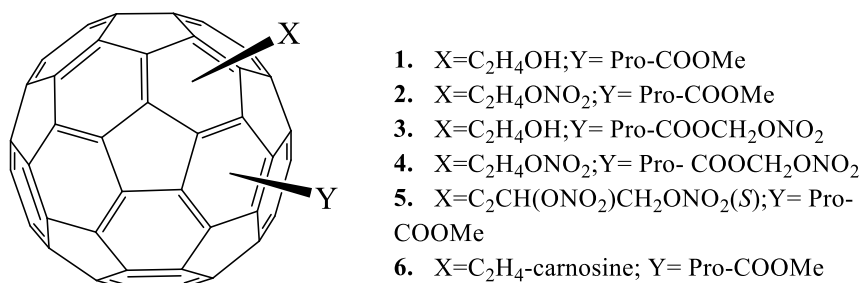


Fig. 11. Fullerene adducts isomers containing substituted proline and substituted ethyl group [81].

Ganji et al. [82] theoretically studied a model system based on the C_{60} molecule, in which one carbon atom was replaced by a boron atom, and determined the mechanism for the addition of a glycine molecule to the $C_{59}B$ fullerene modified with boron and the unmodified C_{60} fullerene using the DFT method. For calculations, the authors used the SIESTA program and the PBE functional. As a result of the studies, it was shown that the electron density of the glycine molecule is shifted to the fullerene core when the latter is modified with boron, while in the case of unmodified fullerene, there is practically no shift in the electron density from the amino acid.

Jalbout et al. [83] provided a theoretical study of van der Waals interactions of $Ca@C_{60}$ metallofullerene with amino acid molecules by the DFT method implemented in the DMol³ program (BLYP functional, DND basis). The authors found that an excess negative charge is generated on the fullerene surface (due to the location of the calcium atom inside the fullerene core), which plays a significant role in the interaction of such a system with amino acid molecules.

The authors of the publication [84] studied the mechanism of enantioselective addition of L-histidine to C_{60} fullerene and its derivatives (Fig. 12). The PM3, HF, and MP2 methods were successively used for calculations. The dipole moments, total energy, charge states, vibrational frequencies, and band gap calculated by the authors form an idea of the interaction of the L-histidine molecule with fullerene and its derivatives. The authors also found that the formation of complexes based on fullerene derivatives with L-histidine occurs due to hydrogen bonds.

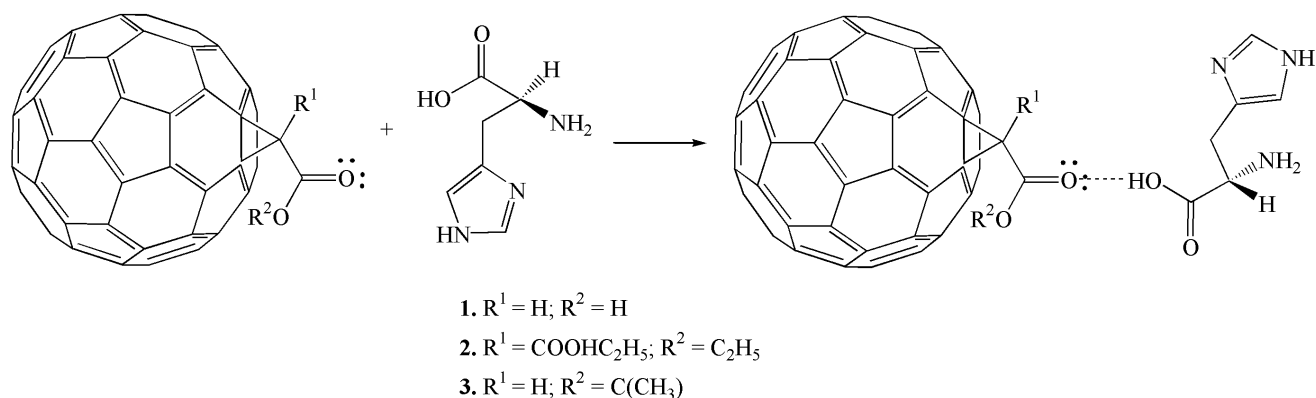


Fig. 12. Reaction of enantioselective addition of L-histidine to C_{60} fullerene and its derivatives scheme [84].

Luzhkov et al. [85] calculated the dissociation constants of the C_{60} with L-alanine (C_{60} -L-Ala) monoadduct in the gas phase and in aqueous solution using the HF and DFT methods in the Gaussian 03 program using the PCM model. The authors calculated the stability of the C_{60} -L-Ala adducts isomers and showed that the carboxyl group is a stronger acid than the CH group

(formed by the addition of protons to the fullerene core). At the same time, hydrogen bound directly to the fullerene core, is also relatively easily split off and imparts a significant negative charge to the fullerene core. Amino group of adduct C₆₀-L-Ala is electrically neutral (pK_a (NH) = -1,44), while the carboxyl group is negatively charged in the physiological pH range. The calculation of the dissociation constants of the carboxyl and CH groups showed that pK_a (COOH) = 4,2 and pK_a (CH) = 5,8. The obtained results are in good agreement with the experimental data.

Basiuk et al. [86] studied non-covalent interactions of oligopeptides glycine and L-alanine with fullerene C₆₀ using DFT and molecular mechanics methods. The authors studied the effect of the peptide chain length (containing up to 10 amino acids), as well as various peptide conformations on non-covalent interaction with fullerene. For calculations of the electronic structure by the DFT method, the GGA - BLYP and LDA - VWN functionals were used; in the course of calculations by the molecular dynamics method, force fields AMBER, MM+ were used. As a result of the study, the authors calculated the heats of formation of complexes of peptides with C₆₀ and determined the points of closest contacts of the interacting molecules.

Naderi et al. [87] using the DFT method with the B3LYP functional in the Gaussian 98 program, the formation energies of C₃₆ fullerene complexes with glycine were calculated. The instability of such complexes during interaction both through the nitrogen atom and through the oxygen atom of the amino acid is shown.

Theoretical studies of the molecular structure, vibrational spectra, solvation mechanisms, as well as optical properties and electrical conductivity of C₂₀(OH)₈, C₆₀(OH)_n (n = 8, 12, 24, 36, 44), C₇₀(OH)_n (n = 14, 16, 18, 20) fullerenol solutions were carried out in [88–95].

An analysis of the literature shows that the number of works devoted to the experimental physicochemical study of aqueous solutions of light fullerenes adducts with amino acids and peptides, as well as to the study of phase equilibria in systems containing these adducts, is small. Let us briefly dwell on the main results obtained. The authors of the [96–100] were studied the physicochemical properties of aqueous solutions and phase equilibria in systems containing light fullerenes adducts with glycine, L-alanine, L-arginine, L-lysine, L-hydroxyproline, L-threonine. The authors obtained concentration and temperature dependences of density, refractive index, electrical conductivity, viscosity, associates size distribution, and excess thermodynamic functions.

In the works [96,101,102] the degree of association of fullerene derivatives depending on the concentration and nature of the substituent for aqueous solutions of the following fullerene derivatives were studied: C₆₀ adducts with amino acids (glycine, L-alanine) and peptides (glycyl-L-glycine, glycyl-L-alanine, glycyl-L-valine and L-alanyl-L-alanine) containing a free carboxyl group [96]; methyl esters of peptide-containing maleimidofullerenes (*N*-maleimidofullerenyl-L-valyl-L-valine, *N*-maleimidofullerenyl-DL-alanyl-L-leucine, *N*-maleimidofullerenyl-DL-alanyl-DL-alanine, *N*-maleimidofullerenylglycyl-L-valine, *N*-maleimidofullerenyl-L-valyl-L-valyl-L-valine) [101]; mono- and disubstituted C₆₀ adducts with propionic, γ -aminobutyric and ω -aminocaproic acids (sodium salt of *N*-monohydrofullerenyl- ω -aminocaproic acid, *N*-monohydrofullerenyl- γ -sodium aminobutyrate, *L-N-sodium* monohydrofullerenylpropionate, *N*-2-hydroxyethylfullerenyl- ω -sodium aminocaproate, methyl *N*-2-hydroxyethylfullerenyl- ω -aminocaproate, *N*-2-hydroxyethyl fullerenyl- γ -sodium aminobutyrate, methyl *L-N*-2-hydroxyethylfullerenylpropionate, methyl *L-N*-2-nitroxyethylfullerenylpropionate, 2-nitroxyethyl *L-N*-2 nitroxyethylfullerene propionate, 2-nitroxyethyl *L-N*-2 hydroxyethylfullerenyl propionate) [102].

Timofeeva et al. [103] conducted a study of the of C₆₀ adducts with amino acids and peptides (*N*-monohydrofullerenyl-DL-serine, *N*-monohydrofullerenyl-L-arginine, *N*-monohydrofullerenyl-DL-alanyl-DL-alanine and *N*-monohydrofullerenyl-L-alanine) association degree in aqueous solutions depending on pH, ionic strength, concentration and nature of the substituent.

C₆₀ fullerene adducts with amino acids and peptides (DL-serine, L-alanine, L-arginine, DL.alanyl-DL-alanine and glycyl-L-arginine) were studied in [104].

Our scientific group carried out a comprehensive study of solutions and phase equilibria in systems containing individual light fullerenes adducts with L-arginine, L-lysine, L-hydroxyproline, L-threonine [97–100,105–107]: concentration and temperature dependences of density, refractive index, electrical conductivity, viscosity, size distribution of associates, excess thermodynamic functions.

The obtained results allow us to draw the following conclusions:

(1) high compatibility of fullerene adducts with amino acids with water and aqueous solutions has been determined. As an example, in Fig. 13 shows the temperature dependence of solubility in the binary system C₆₀ adduct with L-arginine (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈) – H₂O in the temperature range of 293,15–333,15 K [105]. Dependence of solubility on temperature in the

Fig. 13 clearly shows that the solubility of the adduct varies from tens to hundreds of grams per liter (depending on temperature).

Fig. 14 shows, for example, the solubility isotherm in the ternary fulleranol system $C_{60}(OH)_{22-24} - NaCl - H_2O$ at $25^\circ C$, obtained by isothermal saturation in ampoules [108]. It can be seen that the diagram consists of two branches corresponding to the crystallization of fulleranol $C_{60}(OH)_{22-24} \cdot 30H_2O$ crystalline hydrate and anhydrous sodium chloride, and contains one invariant point of the eutonic type (point E in Fig. 14), corresponding to the joint saturation with both of the above solid phases. At the same time, on the $C_{60}(OH)_{22-24}$ fulleranol crystallization branch the effect of salting out is observed, and on the branch of crystallization of sodium chloride - salting in.

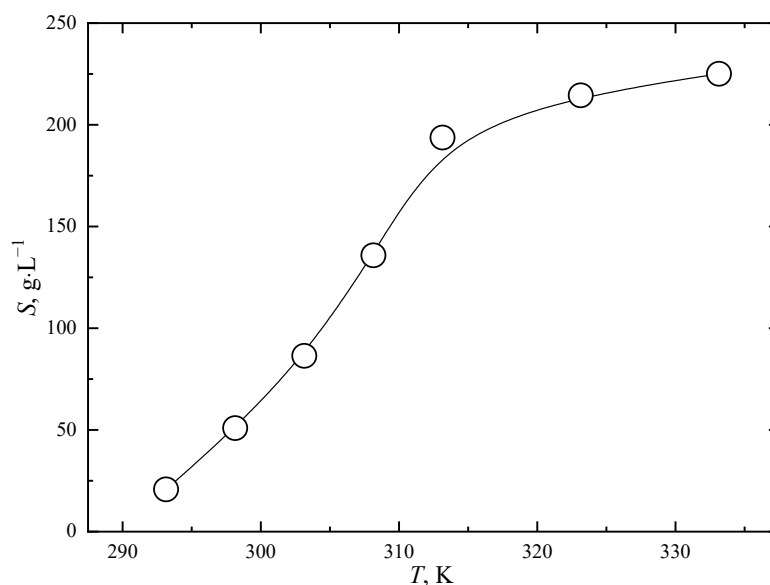


Fig. 13. C_{60} adduct with L-arginine ($C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$) solubility in water temperature dependence at the temperature range 293,15–333,15 K [105].

(2) in dilute solutions, water-soluble adducts of fullerenes with amino acids, as a rule, have large negative partial volumes, which indicates compaction and structuring of solutions [5,99,100,106,109]. As an example, Fig. 15 shows the dependence of the partial molar volume of the adduct C_{60} -Gly ($C_{60}(C_2H_4NO_2)_4H_4$) on its mole fraction;

(3) it has been shown [99,105,106] that fullerenes adducts with amino acids in aqueous solutions are relatively weak electrolytes. In particular, $pK_D^{\text{therm}}(C_{60}\text{-Arg}) = 7,2$ [105]; $pK_D^{\text{therm}}(C_{60}\text{-Thr})$ [106] = 4,87; $pK_D^{\text{therm}}(C_{60}\text{-Lys}) = 3,7$ [99];

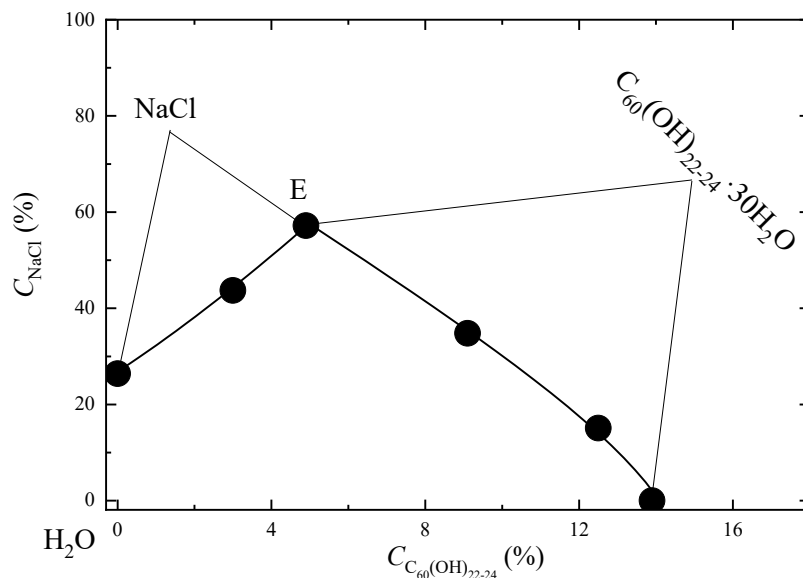


Fig. 14. Solubility isotherm in the ternary system NaCl – $C_{60}(\text{OH})_{22-24}$ - H_2O at 25°C [108].

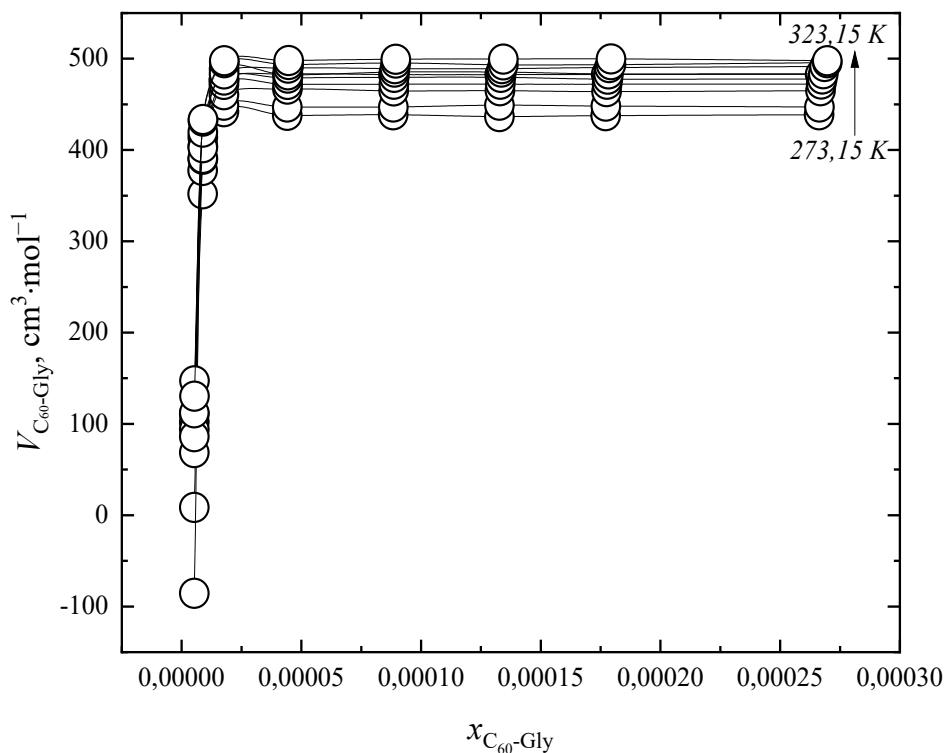


Fig. 15. Dependence of the partial molar volume of $C_{60}\text{-Gly}$ ($V_{C_{60}\text{-Gly}}$) on its mole fraction in the temperature range $278,15\text{--}323,15\text{ K}$ [109].

(4) it was found [99,109] that aqueous solutions of fullerene adducts with amino acids are strongly associated (associate sizes range from tens of nm to thousands of nm in the

concentration range from 0,01 to 10 g·L⁻¹). As an example, in Fig. 16 shows the size distribution concentration dependence of C₆₀-Gly (C₆₀(C₂H₄NO₂)₄H₄) associates [109]. There is no C₆₀-Gly monomeric molecules with linear dimensions of about 2 nm in the entire range of studied concentrations of solutions. In the concentration range $C = 0,01\text{--}0,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, the solution contains first-order associates with a linear size of 30–50 nm. Second-order associates with a linear size of 100–400 nm, along with first-order associates, were detected in the concentration range $C = 0,3\text{--}0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. 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.

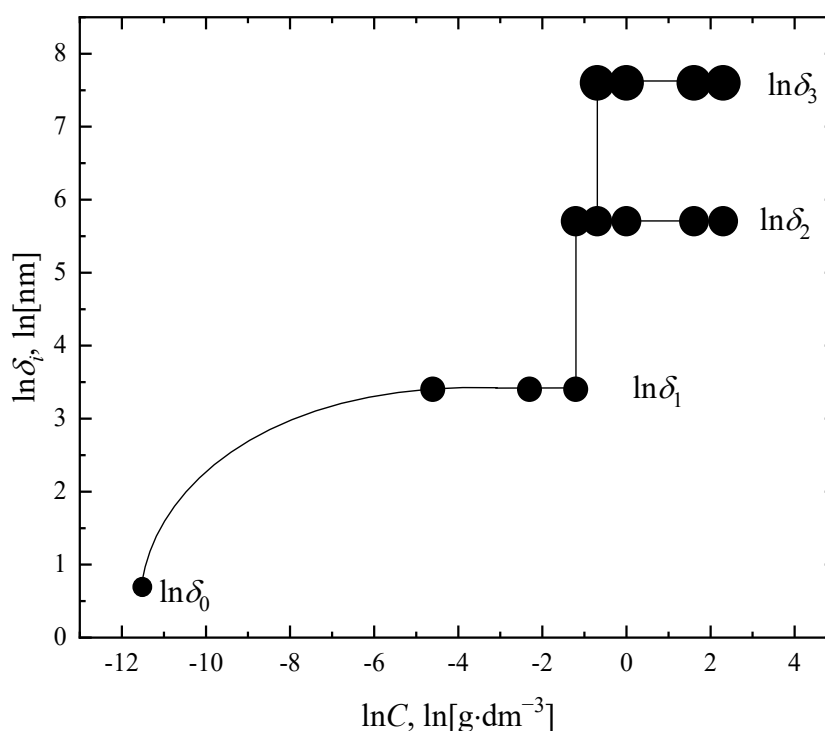


Fig. 16. Size distribution concentration dependence of C₆₀-Gly (C₆₀(C₂H₄NO₂)₄H₄) associates in aqueous solutions at 298,15 K. C - volume concentration of C₆₀-Gly [109].

1.6. Biological activity of fullerenes and their adducts

1.6.1 Toxicity of fullerenes and their adducts

The first studies of the toxicity of fullerenes appeared in 1995–1996. It was found that C₆₀ fullerene at a concentration of up to 1 mg/ml practically does not affect the viability of human leukocytes when incubated for 5 hours; at the same time, after 24 hours, there was a decrease in the viability of leukocytes by 35% [110]. Intraperitoneal injection of a high dose (about 4-5 g/kg) of a suspension of C₆₀ fullerene in saline, stabilized with Tween-80 and sodium carboxymethyl

cellulose, to male Swiss mice did not cause either death of mice or any changes in the behavior of animals for 8 weeks of observation [111].

In the study [112], male rats were intragastrically injected with C_{60} fullerene in the form of an aqueous dispersion containing 1% starch and 0.1% Tween-80 for 1 and 30 days at daily doses of 2000 and 250 mg/kg of body weight, respectively. There were no statistically significant differences in hematological and biochemical parameters of the control and experimental groups after single and multiple injections of the drug. During the experiment, no animal mortality was observed. At autopsy, pathomorphological changes in the internal organs were not recorded. Fullerene was detected by HPLC after extraction with toluene in the stomach, small intestine, liver, lungs, spleen, kidneys and blood. The amount of detected fullerene compared to the administered doses is much less, which indicates its removal from the body. The authors suggest that fullerene nanoparticles penetrate from the gastrointestinal tract of rats into the bloodstream and then are transported to secondary organs without a pronounced toxic effect under experimental conditions.

In the [113] oral administration of C_{60} fullerene dissolved in olive oil (0.8 mg/ml) to rats in repeated doses (1.7 mg/kg of body weight) not only does not cause chronic toxicity, but almost doubles the duration of their life. The effects of C_{60} solutions in olive oil in an experimental model of CCl_4 -induced toxic hepatitis in rats suggest that the effect of C_{60} on lifespan is associated with the suppression of oxidative stress.

The mechanisms of cytotoxicity of a suspension of C_{60} fullerene in water, as well as fulleranol $C_{60}(OH)_n$ (the composition of fulleranol is not specified) in relation to cell cultures of mouse fibrosarcoma, rat glioma and human glioma were studied [114]. In contrast to fulleranol, which mainly exhibits antioxidant, cytoprotective, and low proapoptotic activity at a concentration of $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, C_{60} in suspension apparently has a strong prooxidant activity leading to rapid necrotic cell death at a concentration of $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

The authors of [115] noted a statistically significant decrease in the viability of human epidermal keratinocyte cells after 24-h incubation with $C_{60}(OH)_{32}$ fulleranol ($C = 42,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

The results [116] of the action of C_{60} fullerene adduct with modified glutamic acid GluEG for 12 and 24 hours on the HeLa cell line (human cervical carcinoma cell line) showed that C_{60} -GluEG has low cytotoxicity and high biocompatibility.

In the review of 2004 – 2012 publications [117] a comparative assessment of the toxicity of C_{60} and its adducts on mammalian cells and tissues *in vitro* and *in vivo* is presented. It was

shown that the cytotoxic effect of fullerene C₆₀ during its irradiation is due to hyperproduction of ROS, while in the absence of irradiation, the toxic effect of fullerene C₆₀ consists in damage to cell membranes, reorganization of the cytoskeleton, and initiation of autophagic digestion of cellular components. Nevertheless, as the authors note, the cytotoxic and cytoprotective effect of C₆₀ dispersions and its adducts depends on the concentration and conditions of the experiment.

1.6.2. Fullerenes biodegradation

Fullerene is known to form epoxides, hemiacetals, and hydroxylated adducts in biological systems [118–121]. During the biodegradation of fullerenes, the intermediate formation of fullerlenols occurs predominantly [122–124].

Under the action of peroxidases, in particular, myeloperoxidase, eosinophil peroxidase and lactoperoxidase, *in vitro* can cause deep degradation of fullerene molecules C₆₀ [125,126]. Nanosized dispersions of C₆₀ obtained by mixing C₆₀ in a toluene solution with water using ultrasound were subjected to biodegradation [127]. The reaction of fullerene with hypochlorite generated by myeloperoxidase leads to the destruction of the fullerene core, the signs of which are the disappearance of the absorption bands characteristic of the fullerene core in the UV, visible and IR regions of the spectrum [126].

Photodegradation of fullerene C₆₀ under the action of Fenton's reagent was studied in the work [128]. The first stage of the process was the hydroxylation of the fullerene molecule, the subsequent transformations of which lead to polycyclic saturated adducts upon core opening. The resulting polycyclic fragments during ring opening lead to the formation of various hydroxyl-substituted α,ω -dicarboxylic acids, the decarboxylation of which leads to the formation of acetic acid, ethanol, propylene and other products.

1.6.3. Photosensitivity and pro-oxidant properties

In an aqueous medium, fullerene derivatives tend to form associates due to the hydrophobicity of the fullerene core. Associates are more intensively accumulated by tumor cells compared to normal tissues due to the increased permeability of the vessels that feed the tumor and the relative immaturity of the lymphatic system [1]. Due to their photodynamic activity, fullerenes and their adducts are potential antitumor agents in the treatment by photodynamic therapy (PDT). PDT is a method of local light activation of a photosensitizer that accumulates in a tumor and in the presence of tissue oxygen, leading to the development of photochemical reactions that destroy tumor cells [129].

The biological effect of C₆₀ fullerene adducts with folacin, L-phenylalanine and L-arginine in relation to tumor cells of the HeLa line was studied [34]. It was shown that when these cells were irradiated with visible light, there was a decrease in the mitochondrial membrane potential, cell viability, activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, which ultimately lead to the activation of caspase-3 and the launch of the apoptosis program.

Biological effect of adducts C₆₀(NH₂CH₂COOH)_n obtained under different conditions on cell lines HeLa and Lm8 (cell line of mouse osteosarcoma) was studied [45]. As a result of the research, it was found that the C₆₀-Gly adduct under irradiation ($\lambda = 500\text{--}600$ nm) causes dose-dependent death of the Lm8 cell line and induces apoptosis of the HeLa cell line. Under the light exposition, C₆₀-Gly passes from an excited singlet state to an excited triplet state. Then singlet oxygen instantly reacts with proteins, nucleic acids and membrane phospholipids, which leads to damage to macromolecules, cell membranes and cell death.

It was shown [49] in *in vitro* and *in vivo* experiments that C₆₀ fullerene adducts with L-phenylalanine, L-serine and β -alanine and γ -phenylbutyric acid inhibit the proliferation of glioblastoma cells and reduce its growth rate in *Danio rerio* fish under artificial lighting day-night. It was found that the adduct of fullerene C₆₀ with L-phenylalanine inhibits the growth of glioblastoma without slowing down the recovery of neurons and without affecting neural stem cells.

C₈₄ fullerene adducts with two, three, and four malonic acid residues were tested as photosensitizers for PDT on the HeLa cell line [130]. Of all the studied adducts, the fullerene adduct with four malonic acid residues showed the highest efficiency. This compound reduced 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 synthesized fullerene quadromalonate has prospects as a phototherapeutic agent.

Fullerene-porphyrin dyads were studied as photosensitizers for photoinactivation *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [131]; *in vitro* research showed their phototoxic effect. The photosensitizing ability of water - soluble aminoadducts of fullerenes to inactivate *S. aureus* was studied in the work [132]. As a result of research *in vitro* photoinduced death of *S. aureus* was observed in the presence of 0,5 μM C₆₀ fulleropyrrolidine. The results obtained by the authors of this work indicate the possibility of using C₆₀ fulleropyrrolidine for photoinactivation of microbial cells.

Efficiency as photosensitizers of water-soluble carboxyfullerenes: C₆₀ and C₇₀ di-, tris-, quadromalonates was investigated [133]. The assessment was carried out according to their photodynamic effect on HeLa cells. All compounds are potentially applicable for photodynamic therapy; the mechanism of their phototoxicity was studied. C₇₀ trismalonate was shown to be endocytosed by HeLa cells in the form of small clusters that accumulate predominantly in endosome-like organelles. The increased efficiency of C₇₀ trismalonate can be explained by the disaggregation of nanoparticles in organelles with the formation of small associates, up to individual molecules [134]. Direct measurements of particle sizes of three C₇₀ carboxyfullerenes by dynamic light scattering at a concentration of 2.5 μM in a nutrient medium showed that C₇₀ trismalonate forms particles with a hydrodynamic diameter smaller than C₇₀ di- and quadromalonates. Smaller aggregates may promote ROS formation and accelerate photoinduced cell death due to the larger surface area.

Possibility of using water-soluble cationic derivatives of fullerenes as photosensitizers for antimicrobial PDT for the destruction of infectious agents: bacteria, protozoa, fungi, and viruses was studied [135,136]. The antimicrobial activity of cationic fullerene derivatives was evaluated *in vitro* during PDT by adding Gram -positive methicillin-resistant *S. aureus*, Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The results shows high activity of cationic fullerene derivatives, and the highest activity is characteristic of compounds with a higher solubility and a lower tendency to form associates.

1.6.4. Antioxidant and cytoprotective properties

Free radical processes are an integral part of the metabolism in all living systems. On the one hand, excessive formation of free radicals leads to damage to cellular structures and can lead to the development of various diseases. On the other hand, free radicals generated by phagocytes are an important factor in nonspecific immune defense. In addition, free radical processes are involved in the regulation of many important biological processes, including signal transduction, cell proliferation, and apoptosis [137].

Of all the fullerene adducts, the most studied are fullerlenols; the study of their antioxidant and cytoprotective properties is the subject of most works.

The authors of the work [138] demonstrated the ability of C₆₀(OH)₂₄ fullerlenol to capture the nitroxyl radical. Preliminary administration of C₆₀(OH)₂₄ prevented the decrease in the activity of catalase, glutathione transferase and glutathione peroxidase caused by the nitroxy

radical. $C_{60}(OH)_{24}$ fulleranol showed antioxidant properties, reducing the intensity of lipid peroxidation. The efficiency of fulleranol is comparable to the well-known antioxidant ionol.

In work [139] to study the possible mechanisms of the protective action of fulleranol, a CCl_4 -induced model of hepatotoxicity and nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats was used. Rats were injected with $C_{60}(OH)_{22-24}$ fulleranol (0, 1, 1.5 and 5 mg/kg day) intravenously or intraperitoneally 3 days before CCl_4 exposure. 24 h after exposure to CCl_4 , the protective effect of fulleranol was assessed using biomarkers of blood serum and tissue homogenates. Exposure to CCl_4 significantly increased the serum activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, the concentration of urea and creatinine in the blood. Significantly increased the level of malon dialdehyde, while the ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione in tissue homogenates was reduced. Fulleranol, being a trap for free radicals, has a nephro- and hepatoprotective effect, protecting liver and kidney cells from the toxic effects of CCl_4 . The protective effect of fulleranol was to increase the ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione, which indicates that fulleranol protects tissues and organs from oxidative stress.

Doxorubicin is well known to be an anticancer drug, but its use is limited due to its low selectivity and cardiotoxicity. In the series of works [140–143] in experiments *in vivo*, the potential protective function of $C_{60}(OH)_{24}$ fulleranol was shown in the toxic effect of doxorubicin on the cells of the liver, kidneys and heart. The authors found that fulleranol exhibits the properties of a hepato-, cardio- and nephroprotector. It was shown [144] that the use of the conjugate doxorubicin with C_{60} fullerene in experiments *in vivo* in mice with Lewis lung carcinoma led to a 2,5-fold increase in life expectancy and a decrease in tumor volume by 63%, compared with individual doxorubicin.

The authors of the work [145] compared the antioxidant effect of $C_{60}(OH)_{18-20}$ fulleranol and ascorbic acid. Both compounds were found to inhibit the proliferation of rat vascular smooth muscle cells and human coronary artery smooth muscle cells. It is noteworthy that fulleranol, 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.

The work [146] demonstrates that fulleranol under *in vitro* blocks the action of hydrogen peroxide, which inhibits signaling in rat hippocampal neurons.

The authors of the work [43] showed for the first time a correlation between the development of cytomegalovirus infection and the intensity of lipid peroxidation in infected

human lung fibroblast cells. It was found that C_{60} fullerene adducts with sodium salts of γ -aminobutyric and ϵ -aminocaproic acids reduce the rate of formation of malonic acid dialdehyde in mitochondria.

1.6.5. Radioprotective properties

Efficiency of fulleranol $C_{60}(\text{OH})_{24}$ ($C = 10$ and 100 mg/kg) was compared to the standard radioprotector amifostine ($C = 300$ mg/kg) in protecting rats from exposure to ionizing radiation [147]. It was found that the radioprotective effect of fulleranol was manifested in the spleen, small intestine and lungs. In turn, amifostine was superior to fulleranol in radioprotective properties in protecting the liver, heart, and kidneys. Fulleranol, in comparison with amifostine, more effectively prevented the radiation-induced decrease in the level of leukocytes.

The ability of fulleranol $C_{60}(\text{OH})_{36}$ to reduce damage caused by high-energy electrons when exposed to human erythrocyte membranes was studied in [148]. It was found that fulleranol prevented post-irradiation haemolysis, potassium efflux and oxidation of thiol groups, as well as prevented an increase in membrane fluidity and changes in protein conformations. Presumably, the radioprotective properties of fulleranol are due to its ability to absorb ROS.

The capture of free radicals and the cytoprotective effect of $C_{60}(\text{OH})_{6-12}$, $C_{60}(\text{OH})_{32-34}$, and $C_{60}(\text{OH})_{44}$ fullerenols using human keratinocytes (NaCaT) exposed to UV irradiation were studied [149]. As a result of UVB irradiation, the level of oxidative stress rapidly increased in NaCaT cells, cyclobutanepyrimidine dimers in the DNA molecule were formed and chromatin condensation occurs. It has been determined that damage to NaCaT caused by UV irradiation is suppressed by all the studied fullerenols, the cytoprotective effect of which is associated with the absorption of ROS.

1.6.6. Interaction with proteins

Fullerenes form supramolecular complexes with proteins, as has been shown in works [150,151]. In particular, carboxyfullerene C_3 with four proteins (HIV protease, fullerene-specific antibodies, HSA and BSA) docking was carried out and a high degree of binding site homology was found [151]. Fig. 17a shows a general view of the HSA-carboxyfullerene complex. Fig. 17b shows the interaction of carboxyfullerene with the Trp214 amino acid fragment of HSA subdomain IIA.

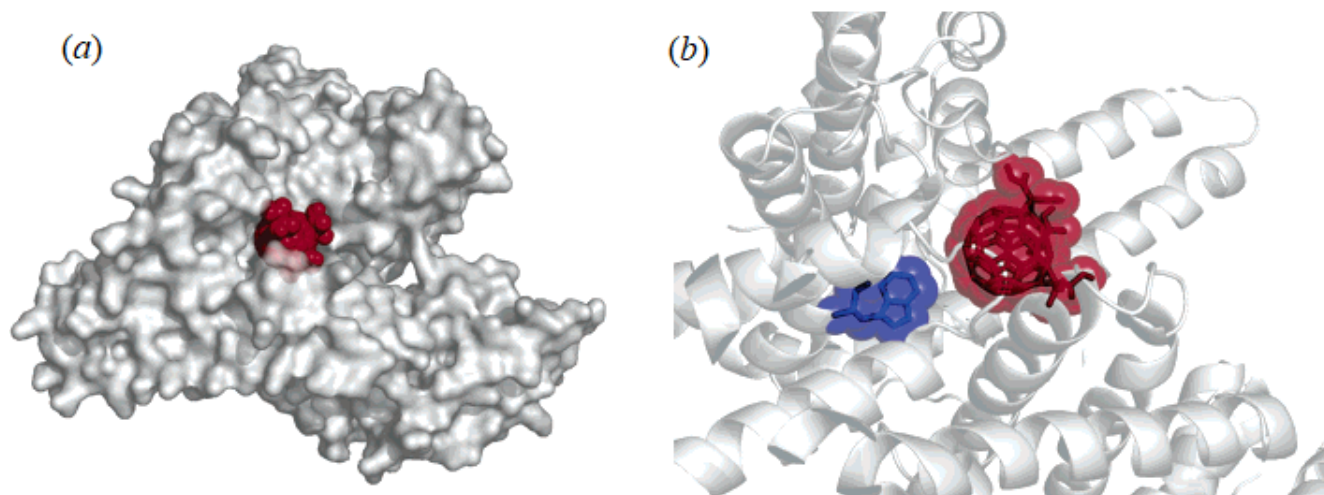


Fig. 17. General view of the HSA complex with carboxyfullerene C_3 (a); interaction of carboxyfullerene with amino acid fragment Trp214 of subdomain IIA of HSA (b) [150].

The interaction of BSA proteins and γ -globulin with fullereneol $C_{60}(OH)_{44}$ was studied in [152]. The ability of $C_{60}(OH)_{44}$ to effectively quench the internal fluorescence of proteins by a dynamic mechanism was discovered; the calculated binding constants from the fluorescence quenching data are of the order of 10^4 . It was found that the binding of fullereneol to proteins is an exothermic process.

Chapter 2. Experimental part

2.1. Synthesis and identification of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts

To carry out the synthesis of adducts C₇₀ with L-lysine (C₇₀-Lys) and L-threonine (C₇₀-Thr), C₇₀ fullerene (purity 99.9 wt %) produced by CJSC "ILIP" (St. Petersburg) was used, L-lysine (Panreac, chemical pure), L-threonine (Panreac, chemical pure), toluene (Vekton, high purity 22-5), deionized water (18 MΩ·cm), sodium hydroxide (Vekton, chemical pure), ethanol (Rosbio, 95%). The synthesis of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts was carried out according to the method developed in our scientific group earlier (Fig. 18).

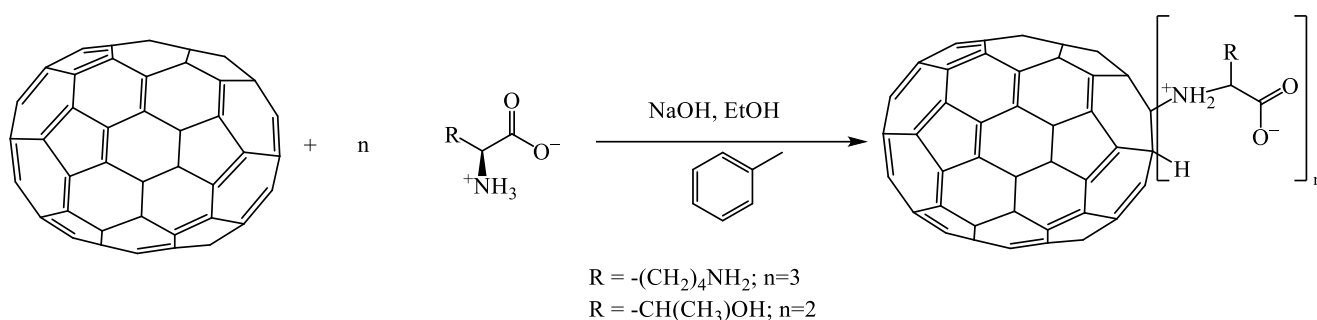


Fig. 18. Synthesis of fullerene C₇₀ adducts with amino acids scheme.

Amino acids (0,1 mol) and NaOH (0,2 mmol) were dissolved in 30 ml of water. Alkali was used to create a highly alkaline environment and convert the amino acid into a salt form. Then, a saturated solution of C₇₀ fullerene in toluene (1 g in 600 ml) and ethanol (200 ml) were added to the solution to ensure mutual solubility of the phases. Next, the resulting reaction mixture was stirred on a magnetic stirrer at room temperature for seven days. The solvent was distilled off from the reaction mixture on a rotary evaporator, and the resulting precipitate was dissolved in water. Then the solution was filtered from insoluble impurities of the reagents. Next, the fullerene adduct was recrystallized from ethanol. After that, the resulting precipitate was washed with ethanol until the neutral reaction (pH = 7). The compounds obtained were dried at 60°C. The yield of the obtained products was ~85%.

Identification of the obtained compounds was carried out using a complex of physicochemical methods: ¹³C NMR spectroscopy (Bruker Avance III 400 WB, USA) by CP/MAS (cross-polarization/magic angle spinning) and DE (direct excitation), IR spectroscopy (Nicolet 8700, USA), UV spectroscopy (SOLAR CM 2203, Belarus), thermogravimetric analysis (NETZSCH TG 209 F1 Libra, Germany), elemental analysis C, H, N (Euro EA-3000, Italy) and high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu LC-20 Prominence, Japan).

2.2. Physicochemical study of solutions containing adducts C₇₀-Lys and C₇₀-Thr

Aqueous solutions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr were prepared using an analytical balance (Sartorius CP224S, USA, accuracy 10⁻⁷ kg). Deionized water was used for physicochemical studies. Water purification was carried out using the Millipore Simplicity UV (USA) purification system.

Solution densities were measured on an Anton Paar DSA 5000 (Austria) density analyzer. The measurement repeatability is 1·10⁻⁶ g·cm⁻³, the density measurement accuracy is 5·10⁻⁶ g·cm⁻³. The temperature measurement accuracy was 0.01 K. The instrument was calibrated with water and dry air.

The values of the of the binary systems C₇₀-Lys – H₂O and C₇₀-Thr – H₂O viscosities in the temperature range (293,15 – 333,15) K were obtained on a Lovis 2000M Anton Paar (Austria) microviscometer. The capillary was calibrated using deionized water, filled with the sample, and then thermostated for 15 min. The temperature control accuracy is 0,02 K, the viscosity determination accuracy is 0,5%.

Refractive indices concentration dependences of the C₇₀-Lys and C₇₀-Thr aqueous solutions at a temperature of 298,15 K were obtained using an automatic multi-wavelength refractometer Abbemat WR/MW Anton Paar (Austria) at a wavelength of 589.3 nm. The temperature measurement accuracy is 0.03 K, the refractive index determination accuracy is 4·10⁻⁵.

The Cyber Scan PC-300 device (USA) was used to determine the electrical conductivity of aqueous solutions of fullerene adducts. The relative error in determining the specific electrical conductivity was 1%.

The surface properties of fullerene adducts aqueous solutions study at 298,15 K was carried out using various physicochemical methods such as the Wilhelmy plate method, Brewster angle microscopy (BAM) and atomic force microscopy (AFM). The morphology of films formed on the surface of aqueous solutions of adducts was studied *in situ* using a Brewster angle microscope (NFT, Germany) equipped with a 10-mW helium-neon laser. Additionally, the morphology of adduct films transferred from the solution surface to a solid substrate by the Langmuir-Schafer method was studied. The experiments were carried out on a scanning probe microscope Nano Scope IV (Digital Instruments, USA).

Size distributions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr nanoparticles and electrophoretic mobility in aqueous solutions were measured on a Malvern Zetasizer 3000 (Great Britain) instrument. The values of the polydispersity index were 0,24–0,47.

2.3. Study of biocompatibility of adducts C₇₀-Lys and C₇₀-Thr

The studies were approved by the Local Ethics Committee of the First St. Petersburg State Medical University. acad. I. P. Pavlov, the experimental procedures were in accordance with the university guidelines and ethical standards [153].

2.3.1. Haemocompatibility

2.3.1.1. Spontaneous haemolysis

Spontaneous haemolysis was studied by measuring the optical density of supernatants at a wavelength of 540 nm using an Allsheng AMR-100 microplate reader (China). To prepare the samples, a mixture was prepared containing 1 ml of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr fullerene adduct solution ($C = 1\text{--}100\ \mu\text{M}$) and 1 ml of a suspension of erythrocytes in an isotonic NaCl solution. After that, the samples were incubated at $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ for 1 and 3 h, and then centrifuged for 1 min at 3000 rpm.

2.3.1.2. 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 (BD, USA) containing sodium citrate as a stabilizer ($C = 0,129\ \text{M}$) in a sodium citrate: blood ratio of 1:9. Stabilized blood was centrifuged for 7 min at room temperature and 1000 rpm (150 g). Part of the platelet-rich plasma was taken into a plastic tube in the amount necessary to perform the analysis. Platelet-poor plasma was obtained from the remaining blood by centrifugation for 30 min at 3600 rpm (2500 g). Platelet-poor plasma was used to calibrate the aggregometer (SolarAP 2110, Belarus). Plasma was standardized to obtain a platelet concentration of $(2,00\text{--}2,50) \cdot 10^{11}/\text{L}$, considering the addition of test substances.

Platelet aggregation in platelet-rich plasma was studied using the following aggregation inducers: ADP (final concentration $C = 10\ \mu\text{M}$), collagen (final concentration $C = 2\ \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) and adrenaline (final concentration $C = 10\ \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), (Chrono-Par Reagents, Chrono-Log Corporation, USA). The effect of fullerene adducts on induced platelet aggregation was determined by mixing 270 μl of platelet-rich plasma and 30 μl of test substance solution in cuvettes at a final concentration of 5, 10, 25, 50, 75, and 100 μM , respectively. The inducers were introduced into the cuvettes 5 min after the mixture was incubated. Aggregation was

recorded until the curve reached a plateau. Data were presented as "mean \pm standard error of the mean".

2.3.1.2. Plasma coagulation haemostasis

The effect of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts on plasma coagulation haemostasis was studied by adding a test substance solution to plasma in the APTT (activated partial thromboplastin time) and PT (prothrombin time) tests. Reagent kits were used to determine APTT and PT (Technology-Standard, Russia). The measurements were carried out on an APG2-02-P coagulometer (EKMO, Russia). Commercial plasma of healthy donors (Technology-Standard, Russia) was used for the studies. Three measurements were made for each concentration of adducts. To do this, 50 μ l of plasma and 50 μ l of a substance solution were mixed at a final concentration of 5, 10, 25, 50, 75, and 100 μ M, incubated at 37 °C for 60 s, and, in accordance with the study protocol, the clot formation time was determined on the analyzer in APTT and PT tests.

2.3.1.3. Binding to albumin

Study of fullerene adducts binding with human serum albumin (ChSA; Biotol, Russia) were carried out on a spectrofluorimeter Solar (Belarus). Emission spectra were recorded in the wavelength range of 310–450 nm and in the temperature range of 298,15–318,15 K; the excitation wavelength was 290 nm. The HSA concentration was 3 μ M, the concentration of fullerene adducts varied in the range $C = 0,3\text{--}1,5$ μ M with a step of 0.3 μ M and in the range $C = 6,0\text{--}24,0$ μ M with a step of 3,0 μ M. The measurements were carried out in the absence and presence of binding site markers, which were warfarin (Sigma, USA), ibuprofen (Sigma, USA), digitonin (Sigma, USA) with a final concentration of $C = 3$ μ M.

2.3.1.4. Esterase activity

To assess the effect of fullerene adducts on the esterase activity of HSA, solutions were prepared: *p*-nitrophenylacetate (NFA; Sisco Research Laboratories, India) in ethanol, HSA, C₇₀-Lys and C₇₀-Thr in phosphate-buffered saline (PBS; Paneko, Russia) with pH=7,02. After mixing the solutions, the final concentration of NPA was 100 μ M, HSA 3 μ M, C₇₀-Lys and C₇₀-Thr from 0 to 24 μ M. The hydrolysis rate of NPA was estimated by the formation of *p*-nitrophenol by spectrophotometric method at a wavelength of 405 nm. As a result, the kinetic dependences of the hydrolysis reaction of NFA HSA were obtained in the absence and in the presence of fullerene adducts.

2.3.2. Antiradical activity

The study of the antiradical activity of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts with the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma, USA) was carried out on a Thermo Scientific Evolution 300 (USA) spectrophotometer. For this, a solution of DPPH in ethanol with a concentration (130 μM), solutions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts in water with a concentration (200 μM) were prepared. A solution of DPPH (1 ml) and a solution of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr (1 ml) were added to a quartz cuvette. 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 of 298,15–318,15 K in the dark every minute for 30 minutes, and also 6 days after the start of the reaction. The temperature control accuracy was 0,1 K.

2.3.3. Cytotoxicity and proliferation

2.3.3.1. Cytotoxicity

Cytotoxicity of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts was studied using the MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Paneko, Russia) on human embryonic kidney cells HEK 293 (bank of cell cultures of the Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences). The cells were cultured in a CO₂ incubator at +37°C in a humidified atmosphere containing air and 5% CO₂ in a DMEM nutrient medium (Paneco, Russia) containing 10% thermally inactivated fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% L-glutamine (Paneko, Russia), 50 U·ml⁻¹ penicillin (Paneko, Russia) and 50 μg·ml⁻¹ streptomycin (Paneko, Russia).

As a result of the action of NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductases on MTT, a colored 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, the cells were seeded in a 96-well plate and placed overnight in a CO₂ incubator: during this time, the cells attached to the surface of the wells (5000 cells were added to each well in 200 μl of DMEM medium). The number of cells was counted on a BioRad TC10 cell viability analyzer (*Bio-Rad* Laboratories, USA), after which a solution containing fullerene adducts 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 culture medium was discarded by inverting the plate. Next, 100 μl DMEM medium and 20 μl of the MTT reagent were added to the wells and plates with cells were incubated for 1 h in a CO₂ incubator at +37°C. After removal of the supernatant, the resulting formazan crystals were dissolved for 15 min with

stirring in 200 μl of dimethyl sulfoxide (Vekton, Russia) per well. Next, the optical density of the obtained solutions was measured on an Allsheng AMR-100 microplate reader (China) at wavelengths 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 normalized as a percentage of control cells [152].

2.3.3.2. Cell proliferation

Cell proliferation was assessed using sulforodamine B (Sigma, USA). HEK293 cells were seeded on a 96-well microplate at a concentration of $2 \cdot 10^4$ cells per well. Cells were incubated for 48 hours with or without C_{70} -Lys and C_{70} -Thr adducts (control), and then 100 μl of 10 wt. % trichloroacetic acid (Sigma, USA). The plates were incubated at 4°C for 1 h, washed with distilled water, and dried at room temperature. After adding 100 μl of 0,057 wt. % solution of sulforodamine B in 1 wt. % acetic acid (Vekton, Russia), the plates were incubated at room temperature for 30 min and washed four times with 1 wt. % acetic acid to remove unbound dye. Optical density measurements were performed at 510 nm using an Allsheng AMR-100 plate reader (China) after adding 200 μl of 10 mM Tris buffer solution (pH = 10,5; Paneko, Russia) to each well.

2.3.4. Interaction with DNA

2.3.4.1. Binding to DNA

UV absorption spectra of solutions of C_{70} -Lys and DNA (Fluka, USA), C_{70} -Thr and DNA in the wavelength range of 220–340 nm were recorded on a Beckman Coulter DU 800 (USA) spectrophotometer versus control in a quartz cell ($l = 1$ cm). Working solutions were obtained by mixing solutions of DNA and C_{70} -Lys, C_{70} -Thr at room temperature. The final DNA concentrations were $1,67 \cdot 10^{-8}$ - $3,89 \cdot 10^{-8}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; adduct concentrations - $4 \cdot 10^{-8}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The experiments were carried out in physiological saline.

2.3.4.2. Genotoxicity

Genotoxicity of C_{70} -Lys and C_{70} -Thr adducts was evaluated by the DNA comet method using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using alkaline gel electrophoresis [154]. DNA comets were visualized using a Micromed 3 LUM fluorescent microscope (Russia). DNA comet tail lengths were measured using the CASP software (version 1.2.2). Tail DNA content and tail length were determined experimentally; tail moment was calculated as the percentage of DNA in the tail times the length between the center of the comet's head and its tail [155].

Chapter 3. Results and discussion

3.1. Synthesis and identification of adducts C₇₀-Lys and C₇₀-Thr

3.1.1. ¹³C NMR spectroscopy

As an example, in Fig. 19 shows the NMR spectrum of the C₇₀-Thr adduct. The analysis of the spectrum makes it possible to characterize the C₇₀-Thr sample: (1) the peak in the region of 177 ppm can be attributed to the carbon atoms of the fullerene core associated with the amino acid molecule (Fig. 19, *a*); (2) an intense peak at 166 ppm corresponds to the carbon atom in the carboxyl group of the amino acid (Fig. 19*b*); (3) peaks with chemical shifts of 105 and 74 ppm can be attributed to the carbon atoms of the fullerene core bonded to the hydrogen atom (Fig. 19, *c* and *c**), the simultaneous presence of two peaks can be explained by the migration of the hydrogen atom during the attack of L-threonine at the C=C bond; (4) a chemical shift of 62 ppm can be identified as a signal of carbon atoms in the amino acid associated with hydroxyl groups (Fig. 19, *d*); (5) the peak around 45 ppm can be attributed to the carbon atoms that are attached to the nitrogen atom (Fig. 19, *e*); (6) the peak with a chemical shift of 18 ppm refers to the carbon atom of the methyl group of the L-threonine molecule (Fig. 19, *f*). For comparison, in Fig. 19 shows the ¹³C NMR spectra obtained using the CP/MAS method for pure C₇₀ fullerene (red) and pure threonine (green). A significant shift in the chemical shift of the carbon atom (compared to pure L-threonine, Fig. 19, *e*) may be due to the fact that this atom is bonded to the nitrogen atom attached to the fullerene core.

3.1.2. FT-IR spectroscopy

The obtained data of FTIR spectroscopy allow to characterize adducts C₇₀-Lys (Fig. 20, *a*) and C₇₀-Thr (Fig. 20, *b*). Peaks in the long wavelength region of the spectrum (500–1100 cm⁻¹) correspond to vibrations of the C–C bonds of the fullerene molecule. In the interval 1335–1345 cm⁻¹, there is a peak corresponding to stretching vibrations of C–O bonds. The peak at about 1400–1410 cm⁻¹ refers to bending vibrations of the OH groups of amino acid residues. The peak in the range 1577–1585 cm⁻¹ can be attributed to bending vibrations of the amino group. The low-intensity peak in the region of 2850–2950 cm⁻¹ refers to stretching vibrations of methylene groups in amino acid residues. Finally, a broad peak in the range of 3300–3500 cm⁻¹ corresponds to stretching vibrations of the OH groups of amino acid residues.

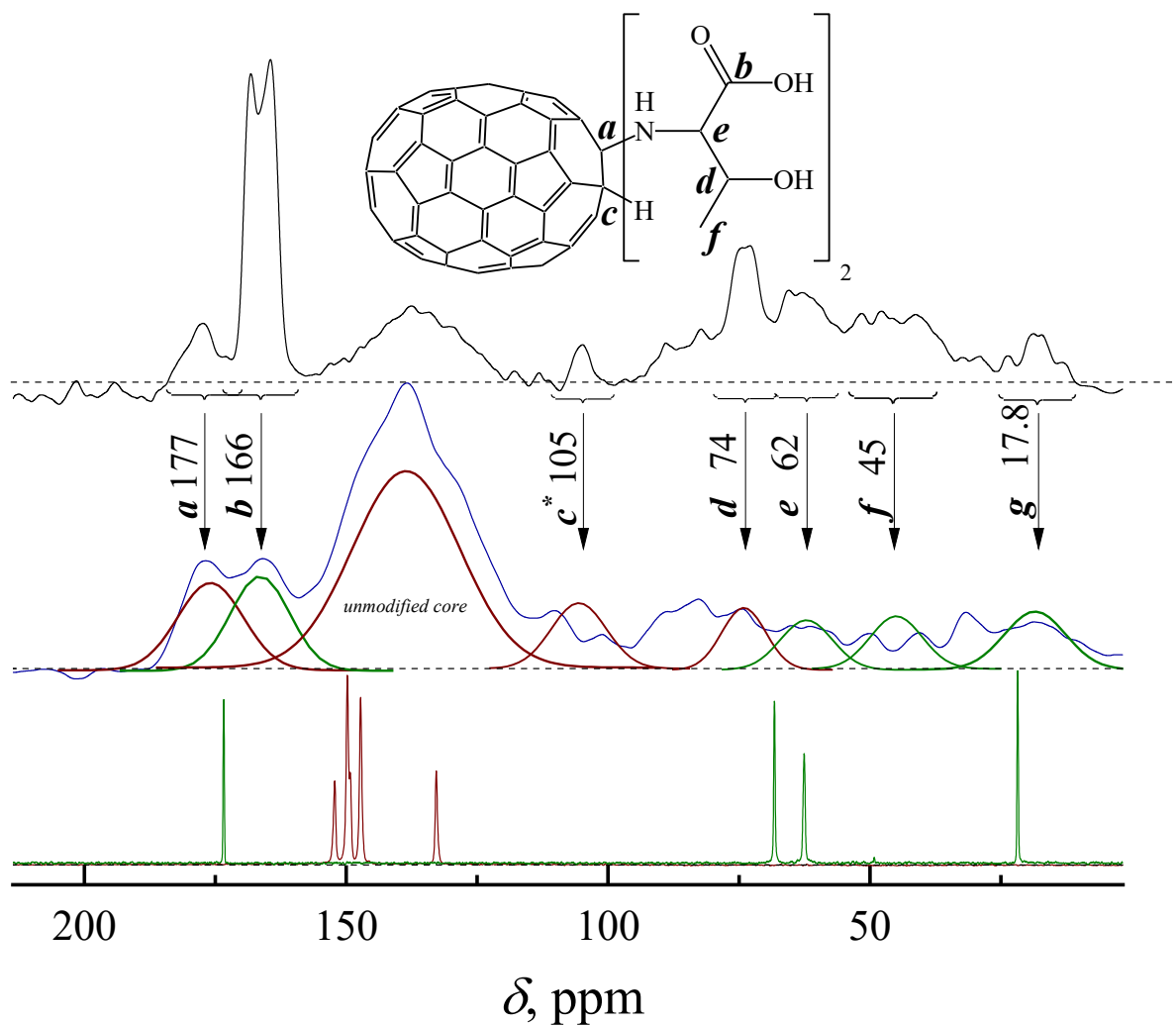
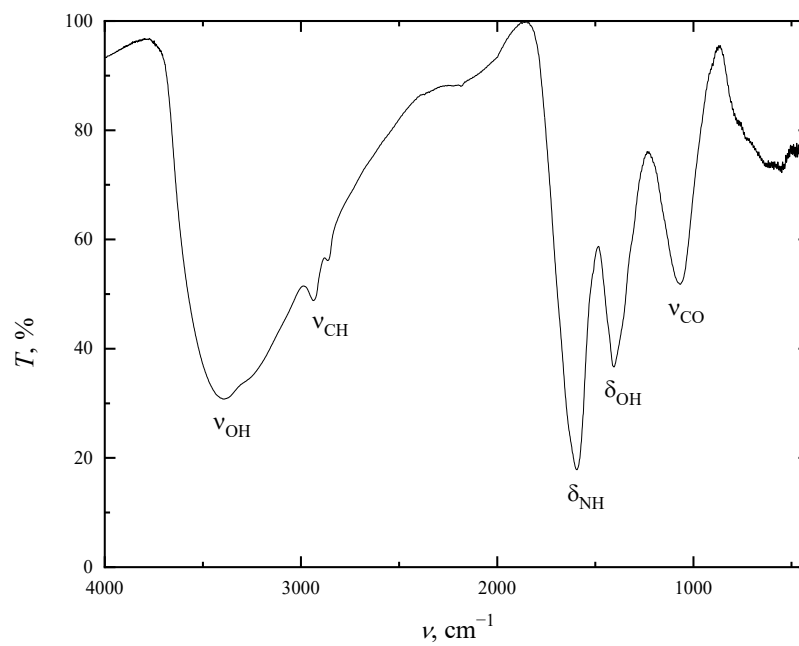


Fig. 19. ¹³C-NMR spectra of C₇₀-Thr (—), C₇₀ fullerene (—) and L-threonine (—) obtained by CP/MAS and ¹³C-NMR spectrum of the C₇₀-Thr adduct (—) obtained by the DE method.

(a)



(b)

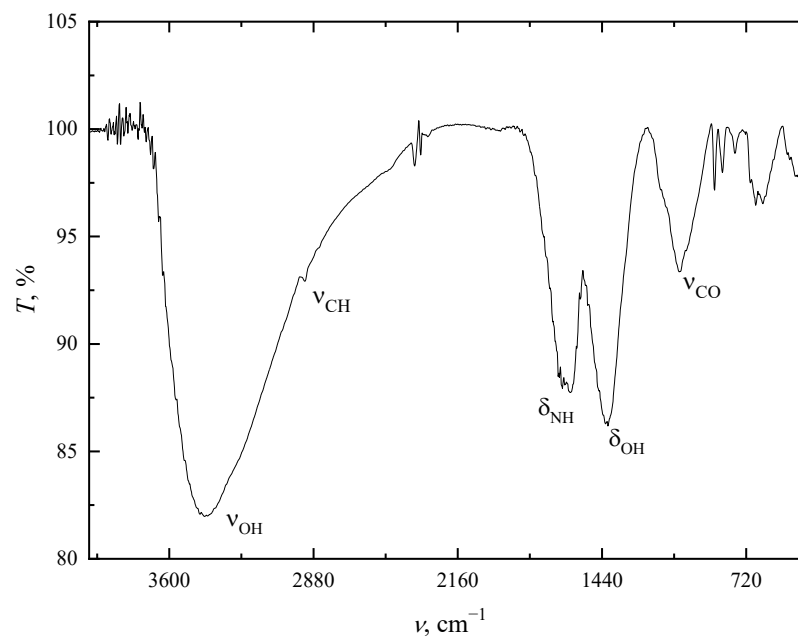
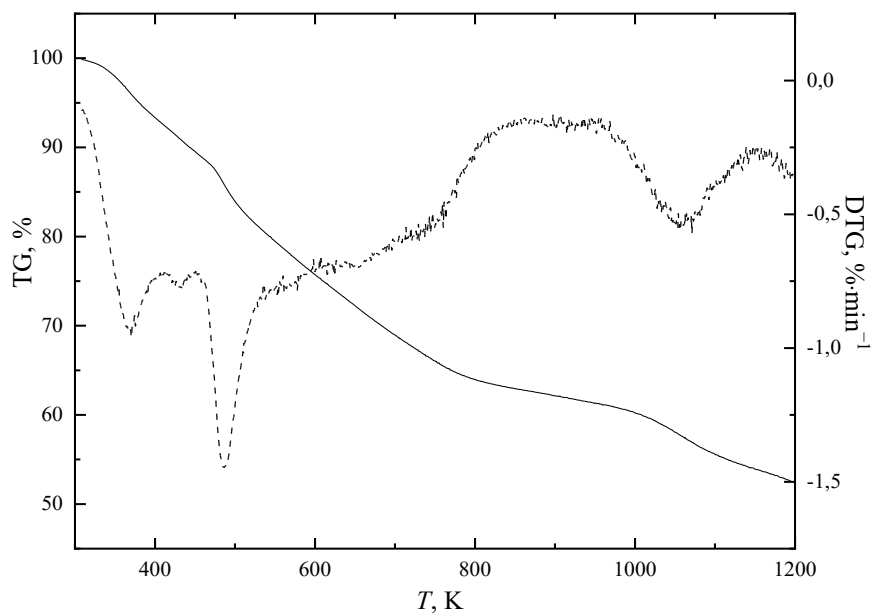


Fig. 20. FTIR spectra of (a) C₇₀-Lys and (b) C₇₀-Thr adducts.

3.1.3. Thermogravimetric analysis

Fig. 21 shows the results of thermogravimetric analysis of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts.

(a)



(b)

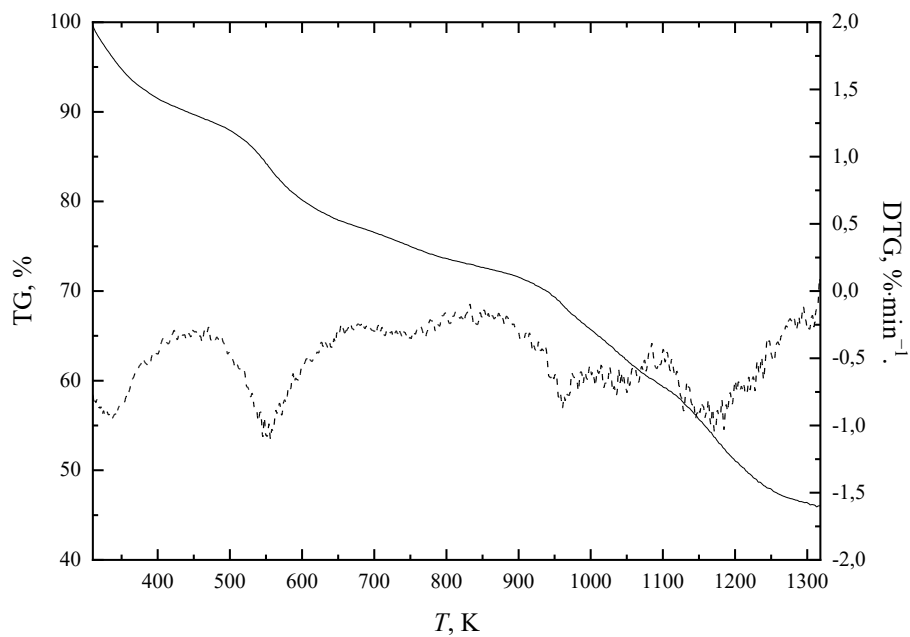


Fig. 21. Results of thermogravimetric analysis: temperature dependence of weight loss of C₇₀-Lys (a) and C₇₀-Thr (b) adducts (solid line) and differential curve (dashed line).

Based on the obtained data, the following conclusions can be drawn: (1) first, water is desorbed from crystalline hydrates of fullerene adducts; (2) with a further increase in temperature, the amino acid residues of the adducts decompose, accompanied by the processes of denitrogenation, dehydration, and decarboxylation; (3) at much higher temperatures, partial oxidation of the fullerene core occurs.

3.1.4. Spectroscopy in the UV and visible region

The results of UV-vis spectroscopy are shown in Fig. 22. It can be concluded that (1) there are no visible absorption bands in the electronic spectrum of the C₇₀-Lys and C₇₀-Thr samples; (2) there are no absorption peaks characteristic of C₇₀ fullerene in the region of 335, 385, and 472 nm; (3) comparison of the spectra indicates the absence of unreacted initial C₇₀ fullerene.

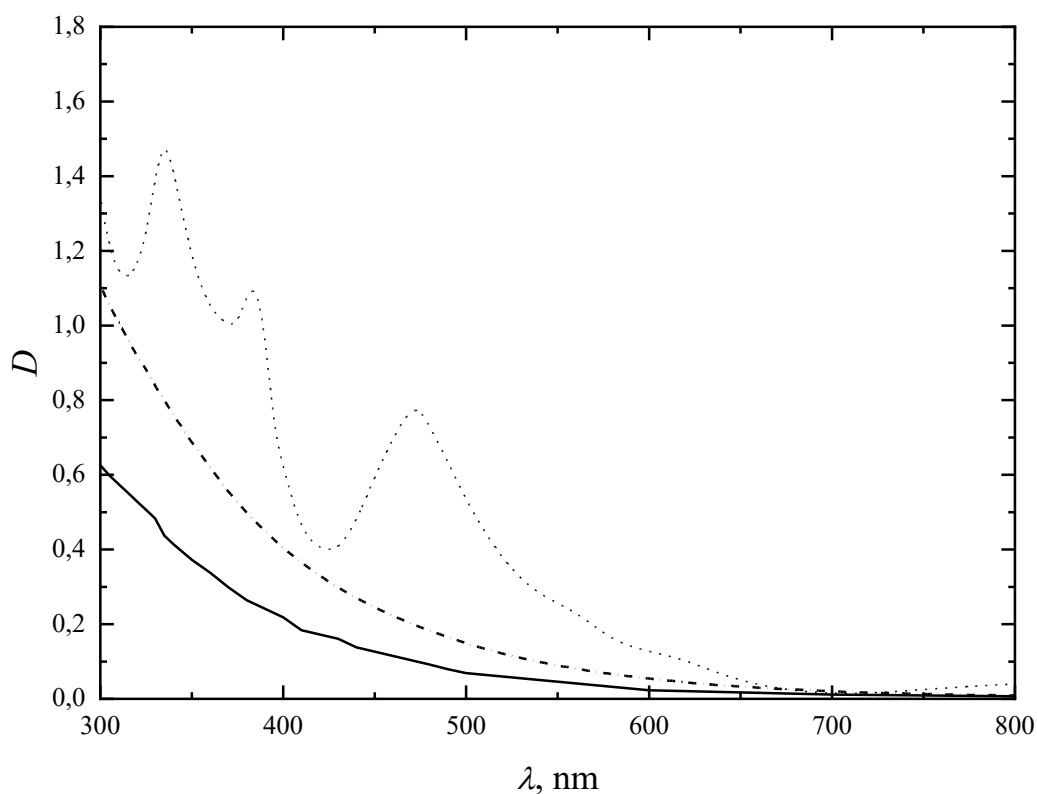


Fig. 22. Electronic absorption spectra of samples C₇₀-Lys (---), C₇₀-Thr (-) with concentration $C = 0,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ and initial fullerene C₇₀ (solution in *o*-xylene) with concentration $C = 0,029 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (⋯).

Despite the fact that the spectra of aqueous solutions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr are not informative, they can be used for spectrophotometric analysis of fullerene adducts in water and aqueous solutions [156].

3.1.5. elemental analysis

The results of elemental analysis of adducts C₇₀-Lys and C₇₀-Thr are presented in Tab. 4, which shows a good agreement between the calculated and experimental values. Based on the elemental analysis data, the composition of the synthesized adducts was determined: the tris adduct in the case of C₇₀-Lys (C₇₀(C₆H₁₄N₂O₂)₃, C₈₈H₄₂N₆O₆, $M=1279,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and a bis-adduct in the case of C₇₀-Thr (C₇₀(C₄H₉NO₃)₂, C₇₈H₁₈N₂O₆, $M=1078,99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Tab. 4. Elemental analysis results for C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts.

Substance	Theoretical content (wt.%)			Experimental content (wt.%)		
	C	H	N	C	H	N
C ₇₀ -Lys	82,6	3,3	6,5	82,6 ± 0,2	3,2 ± 0,3	6,3 ± 0,3
C ₇₀ -Thr	86,8	1,7	2,6	86,9 ± 0,3	1,5 ± 0,2	2,5 ± 0,1

3.1.6. HPLC

Fig. 23 shows HPLC results for C₇₀-Lys (Fig. 23, *a*) and C₇₀-Thr (Fig. 23, *b*). Based on the data obtained, it can be seen that the purity of the obtained compounds is at least 99,5%.

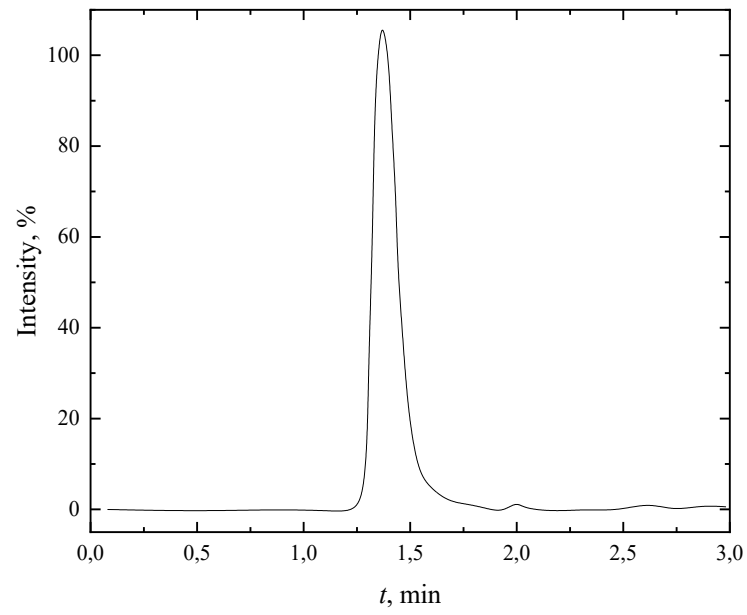
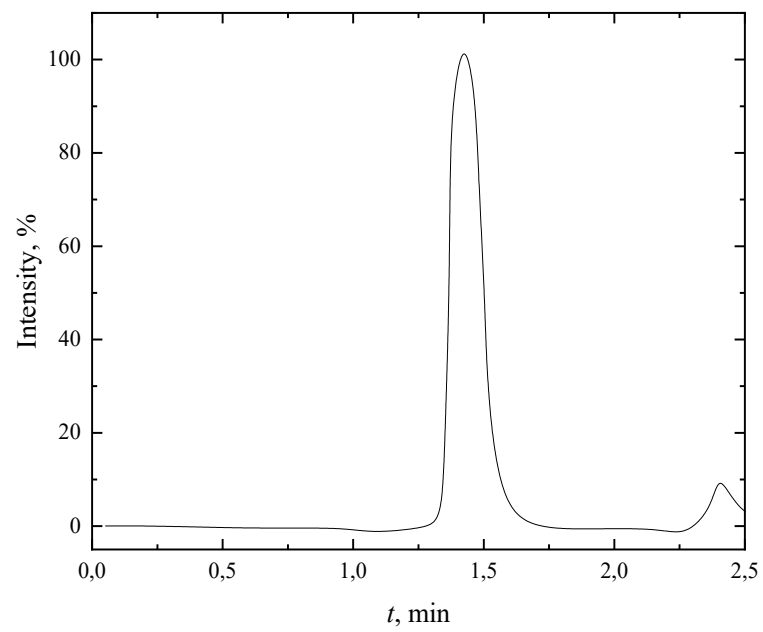
(A)*(b)*

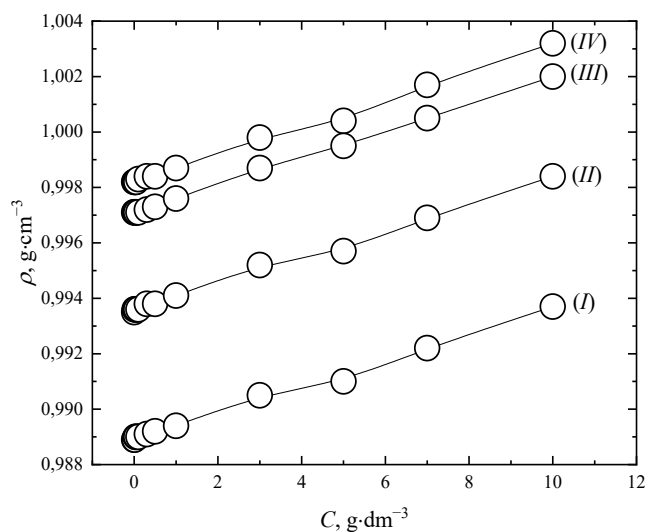
Fig. 23. HPLC results for C₇₀-Lys (*a*) and C₇₀-Thr (*b*) samples.

3.2. Physicochemical Properties of Aqueous Solutions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr Adducts

3.2.1. Densities of aqueous solutions

Fig. 24 and Tab. 5 and 6 show the concentration dependences of the densities of aqueous solutions of C₇₀-Lys (Fig. 24, *a*) and C₇₀-Thr (Fig. 24, *b*) in the temperature range $T = 293,15\text{--}333,15\text{ K}$.

(*a*)



(*b*)

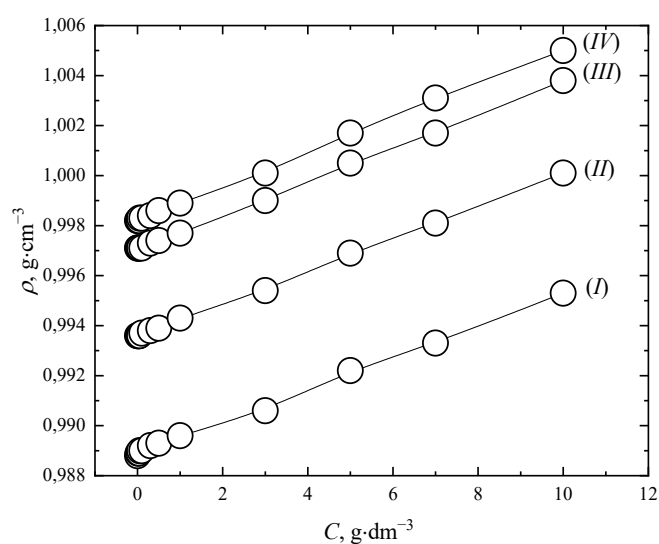


Fig. 24. Concentration dependence of the density (ρ) of of C₇₀-Lys (*a*) and C₇₀-Thr (*b*) aqueous solutions at 293,15 K (*IV*), 298,15 K (*III*), 313,15 K (*II*), 333,15 K (*I*). $C_{C_{70}\text{-Thr}}$ and $C_{C_{70}\text{-Lys}}$ are the volume concentrations of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr, respectively.

Tab. 5. Temperature and concentration dependences of the C₇₀-Lys aqueous solutions density (ρ). C is the volumetric concentration of C₇₀-Lys in an aqueous solution.

$C, \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$x_{\text{C}_{70}\text{-Lys}} \cdot 10^{-4}$	$\rho, \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$			
		293,15 K	298,15 K	313,15 K	333,15 K
0,00	0,0000	0,9982	0,9971	0,9935	0,9889
0,01	0,0014	0,9982	0,9971	0,9936	0,9889
0,03	0,0042	0,9982	0,9971	0,9936	0,9890
0,05	0,0070	0,9982	0,9971	0,9936	0,9890
0,10	0,0141	0,9983	0,9971	0,9936	0,9890
0,30	0,0422	0,9984	0,9972	0,9938	0,9891
0,50	0,0704	0,9984	0,9973	0,9938	0,9892
1,0	0,1408	0,9987	0,9976	0,9941	0,9894
3,0	0,4234	0,9998	0,9987	0,9952	0,9905
5,0	0,7070	1,0004	0,9995	0,9957	0,9910
7,0	0,9918	1,0017	1,0005	0,9969	0,9922
10,0	1,4212	1,0032	1,0020	0,9984	0,9937

The concentration dependence of the average molar volume (\bar{V}) of the solution was calculated according to Eq. 1:

$$\bar{V} = \frac{V}{n_{\text{H}_2\text{O}} + n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \quad (1),$$

where V is the volume of an aqueous solution of the fullerene adduct, $n_{\text{H}_2\text{O}}$ and $n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}$ are the amounts of water and fullerene adduct substances in 1 dm³ of the solution. In accordance with Eq. 2 and 3, the partial molar volumes of the solution components ($V_{\text{H}_2\text{O}}$ and $V_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}$) were calculated [157]:

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P,n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \quad V_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \right)_{T,P,n_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (2),$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = \bar{V} - x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}} \right)_{T,P} \quad V_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} = \bar{V} - x_{\text{H}_2\text{O}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{\text{H}_2\text{O}}} \right)_{T,P} \quad (3).$$

As an example, Fig. 25, 26 shows the concentration dependences of the partial molar volumes of C₇₀-Lys, C₇₀-Thr and water at 298,15 K.

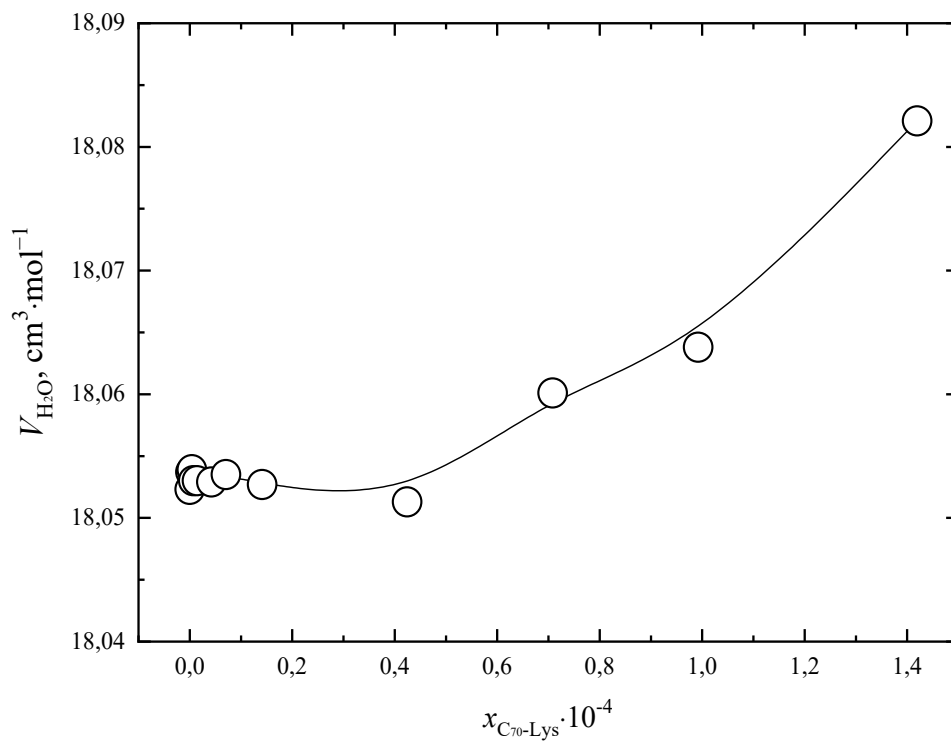
Tab. 6. Temperature and concentration dependences of the C₇₀-Thr aqueous solutions density (ρ). C is the volumetric concentration of C₇₀-Thr in an aqueous solution.

$C, \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$x_{\text{C}_{70}\text{-Thr}} \cdot 10^{-4}$	$\rho, \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$			
		293,15 K	298,15 K	313,15 K	333,15 K
0,00	0,0000	0,9982	0,9971	0,9936	0,9888
0,01	0,0017	0,9982	0,9971	0,9936	0,9889
0,03	0,0050	0,9982	0,9971	0,9936	0,9889
0,05	0,0083	0,9983	0,9971	0,9936	0,9890
0,10	0,0167	0,9983	0,9971	0,9937	0,9890
0,30	0,0501	0,9984	0,9973	0,9938	0,9892
0,50	0,0835	0,9986	0,9974	0,9939	0,9893
1,0	0,1670	0,9989	0,9977	0,9943	0,9896
3,0	0,5020	1,0001	0,9990	0,9954	0,9906
5,0	0,8383	1,0017	1,0005	0,9969	0,9922
7,0	1,1760	1,0031	1,0017	0,9981	0,9933
10,0	1,6851	1,0050	1,0038	1,0001	0,9953

It should be noted the complex nature of the concentration dependence of the partial molar volume of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr.

The high absolute values of the partial molar volumes in dilute solutions show that the addition of even small portions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts leads to significant densification and structuring of the aqueous solution. It can be concluded that the molecules of the studied fullerene adducts are incorporated into the structure of an aqueous solution. Similar effects were previously found in binary systems containing such water-soluble fullerene adducts as carboxylated fullerenes (C₆₀[C(COOH)₂]₃, C₇₀[C(COOH)₂]₃) [158,159], fullerenols (C₆₀(OH)₂₂₋₂₄, C₇₀(OH)₁₂) [160,161], adducts of light fullerenes with L-arginine (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈), L-threonine (C₆₀(C₄H₉NO₃)₂), L-lysine (C₆₀(C₆H₁₄N₂O₂)₂) and L-hydroxyproline (C₆₀(C₅H₉NO₃)₂) [98,100,105,106].

(a)



(b)

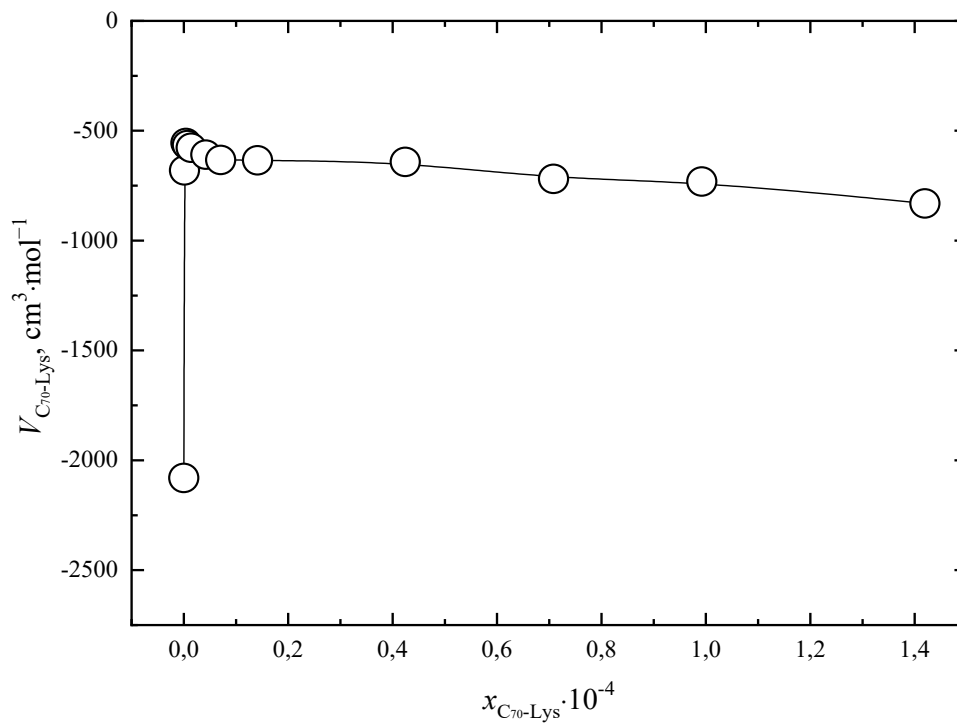
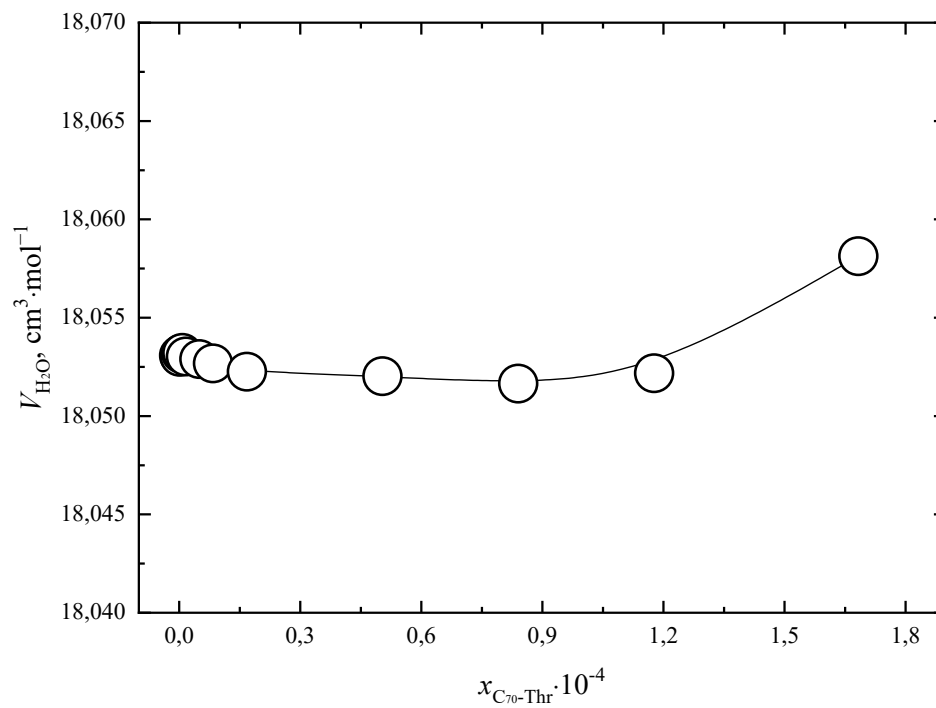


Fig. 25. Dependence of the partial molar volume of water (a) and C_{70} -Lys (b) on the mole fraction of the C_{70} -Lys adduct.

(a)



(b)

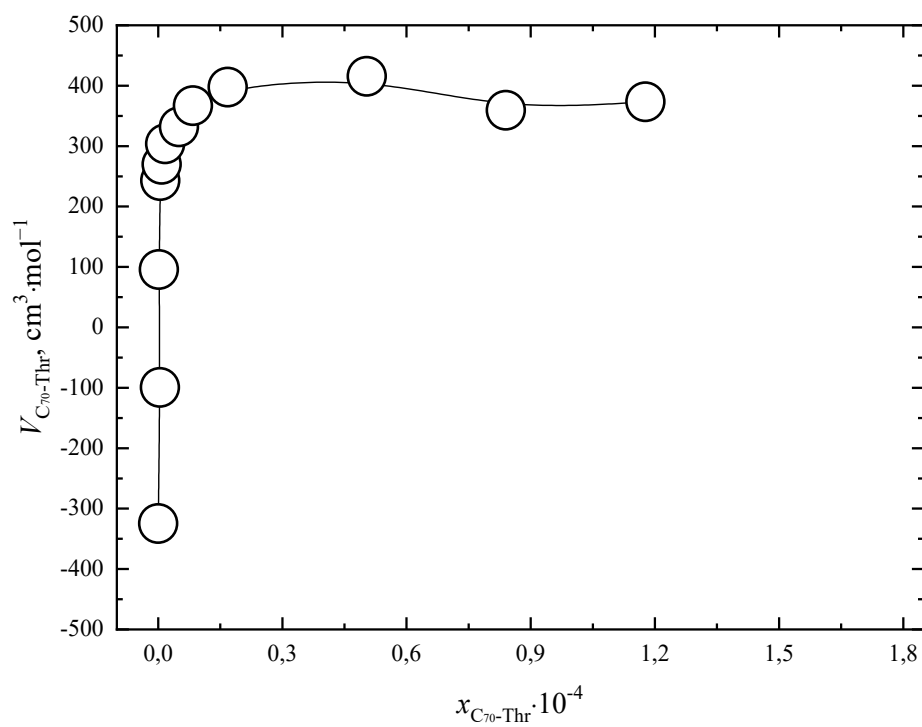
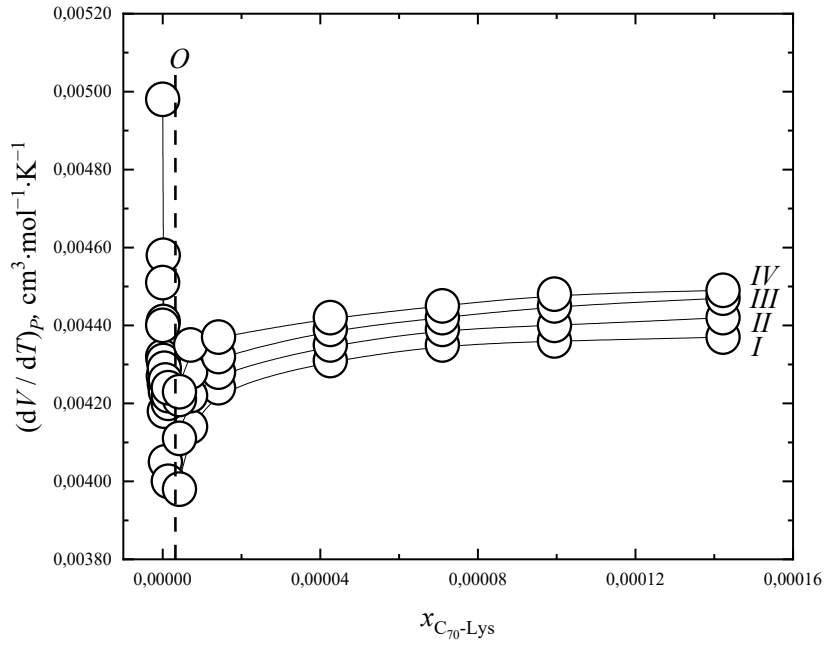


Fig. 26 Dependence of the partial molar volume of water (a) and $\text{C}_{70}\text{-Thr}$ (b) on the molar fraction of the $\text{C}_{70}\text{-Thr}$ adduct.

(a)



(b)

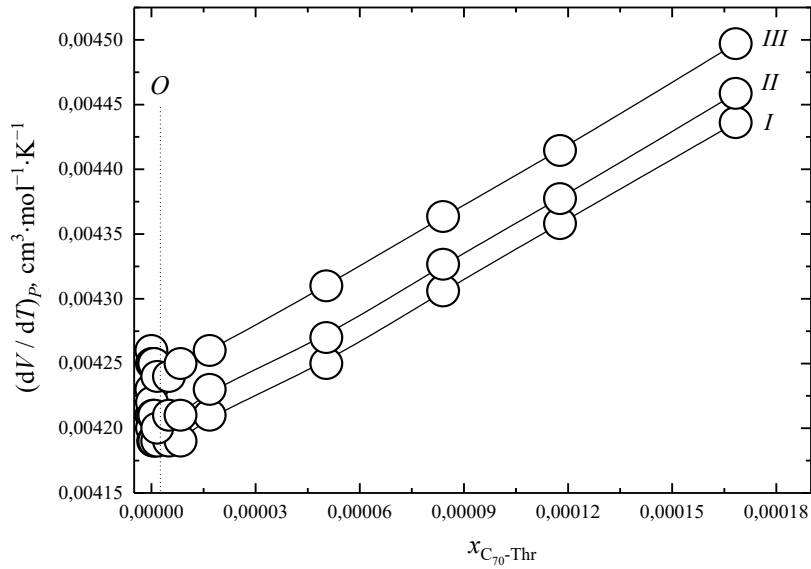


Fig. 27. Concentration dependences of derivatives $\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$ in the temperature range 293,15–333,15 K: (a) (I) $\left(\frac{\partial V_{293.15}}{\partial T}\right)_P$, (II) $\left(\frac{\partial V_{298.15}}{\partial T}\right)_P$, (III) $\left(\frac{\partial V_{313.15}}{\partial T}\right)_P$, (IV) $\left(\frac{\partial V_{333.15}}{\partial T}\right)_P$, (b) I – $\left(\frac{\partial V_{295.65}}{\partial T}\right)_P$; II – $\left(\frac{\partial V_{305.65}}{\partial T}\right)_P$; III – $\left(\frac{\partial V_{323.15}}{\partial T}\right)_P$. O is an extremum point.

Since the higher order of the Gibbs potential derivatives, which are the first derivatives of entropy or volume, are much more sensitive to changes in the structure of the solution compared to lower partial derivatives, mixed derivatives of the Gibbs potential of the second order were determined. In accordance with the Maxwell relations:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial T} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial T \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial T} \right)_{P,x} = - \left(\frac{\partial \bar{S}}{\partial P} \right)_{T,x} \quad (4),$$

where $\bar{G}, \bar{V}, \bar{S}$ is the mean Gibbs molar potential, volume and entropy of the solution, respectively.

It is clearly seen that the function $(\partial \bar{V} / \partial T)_P(x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}})$ passes through a minimum at the concentration of adducts $x_{C_{70}\text{-Lys}} \approx 4 \cdot 10^{-6}$ and $x_{C_{70}\text{-Thr}} \approx 2 \cdot 10^{-6}$ at all considered temperatures (Fig. 27). At these concentrations of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr in aqueous solutions, loss of stability and phase separation occurs. This fact is associated with a complex type of association C₇₀-Lys and C₇₀-Thr in an aqueous solution and the formation of associates of the second type with linear dimensions of hundreds of nanometers [105].

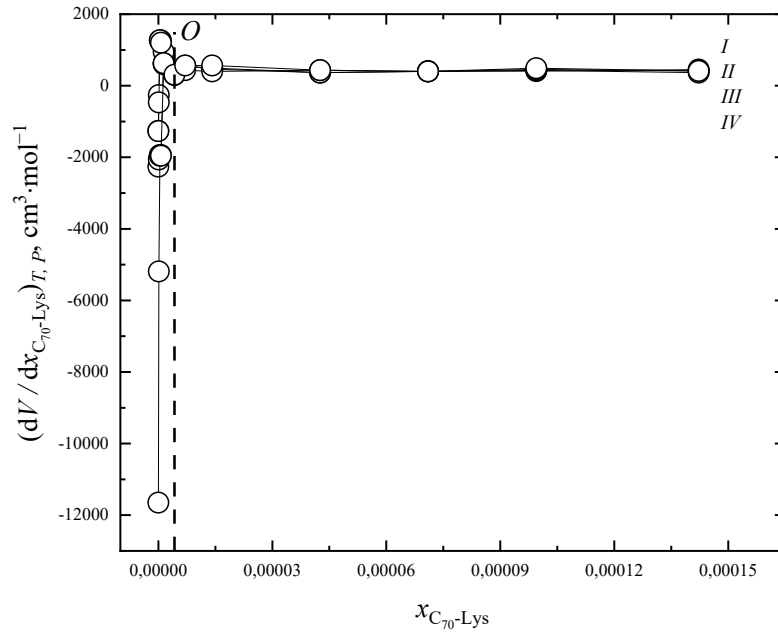
Similar results were obtained using another mixed derivative of the Gibbs potential:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial x} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x} \right)_{T,P} = \left(\frac{\partial \mu_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}{\partial P} \right)_T - \left(\frac{\partial \mu_{H_2O}}{\partial P} \right)_T = V_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}} - V_{H_2O} \quad (5),$$

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

It is clearly seen that the dependence $(\partial \bar{V} / \partial x)_{P,T}(x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}})$ also passes through a minimum at concentrations $x_{C_{70}\text{-Lys}} \approx 4 \cdot 10^{-6}$ and $x_{C_{70}\text{-Thr}} \approx 2 \cdot 10^{-6}$ (Fig. 28).

(a)



(b)

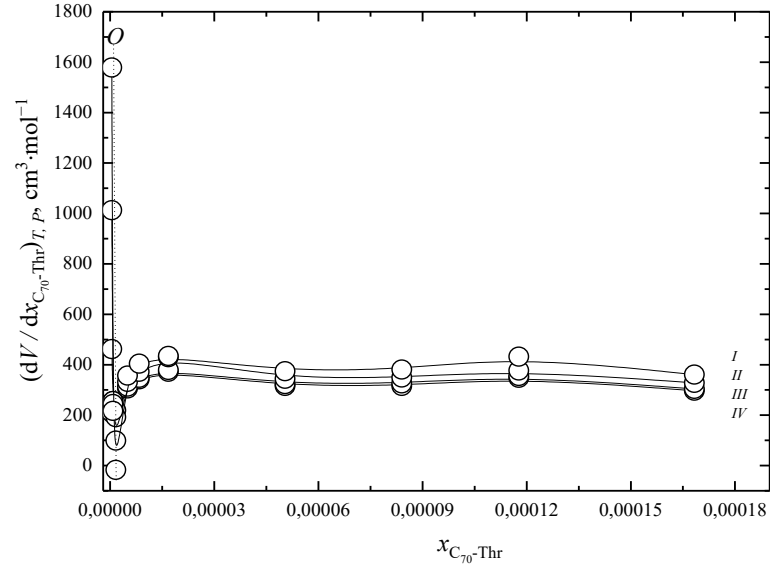


Fig. 28. Concentration dependences of adducts $\left(\frac{\partial V}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$ in the temperature range 293,15–333,15 K: (I) $\left(\frac{\partial V_{293.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$, (II) $\left(\frac{\partial V_{298.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$, (III) $\left(\frac{\partial V_{313.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$, (IV) $\left(\frac{\partial V_{333.15}}{\partial x_{C_{70}\text{-Lys(Thr)}}}\right)_P$. O is an extremum point.

3.2.2. Viscosities of aqueous solutions

The concentration dependences of the dynamic ($\eta(C)$) and kinematic ($\eta_k(C)$) viscosities of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr aqueous solutions at 293,15, 313,15 and 333,15 K are presented in Tab. 7, 8. An increase in dynamic and kinematic viscosity with an increase in the concentration of adducts in the temperature range of 293,15–333,15 K is observed.

The temperature dependence of dynamic viscosity in binary systems C₇₀-Lys – H₂O and C₇₀-Thr – H₂O was determined based on the Frenkel- Andrade equation:

$$\eta = A_S e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (6)$$

where E_a is the activation energy of the viscous flow, A_S is the pre-exponential factor.

To determine the activation energy of the viscous flow, as well as the pre-exponential factor, the logarithmic form of Eq. 6:

$$\ln \eta = \ln A_S + \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (7).$$

As a result, the following values of the viscous flow activation energy (E_a) and pre-exponential factor (A_S) for the C₇₀-Lys adduct were obtained: $E_a \approx 15,8 \pm 0,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $A_S = 0,0046 \pm 0,0007 \text{ mPa}\cdot\text{s}$; and C₇₀-Thr: $E_a \approx 15,2 \pm 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $A_S = 0,0020 \pm 0,0001 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Thus, the Frenkel- Andrade equation will be the following for the binary system C₇₀-Lys – H₂O:

$$\eta = (0,0046 \pm 0,0007) e^{\frac{(1900 \pm 50)}{T}} \quad (8),$$

and for the binary system C₇₀-Thr – H₂O:

$$\eta = (0,0020 \pm 0,0001) e^{\frac{(1830 \pm 70)}{T}} \quad (9).$$

The temperature dependence of viscosity in binary systems C₇₀-Lys – H₂O and C₇₀-Thr – H₂O was also described by the van't Hoff equation:

$$\gamma_{\eta}^{10} = \frac{\eta_{T-10}}{\eta_T} \quad (10),$$

or in numerical form for the C₇₀-Lys adduct:

$$\gamma_{\eta} = \frac{\eta_{T-10}}{\eta_T} = 1,22 \pm 0,02 \quad (11),$$

and C₇₀-Thr adduct:

$$\gamma_n = \frac{\eta_{T-10}}{\eta_T} = 1,21 \pm 0,04 \quad (12),$$

where γ_η is the van't Hoff viscosity coefficient. Fig. 29, 30 shows the comparatively high stability of the van't Hoff viscosity coefficient for the C₇₀-Lys – H₂O and C₇₀-Thr – H₂O binary systems.

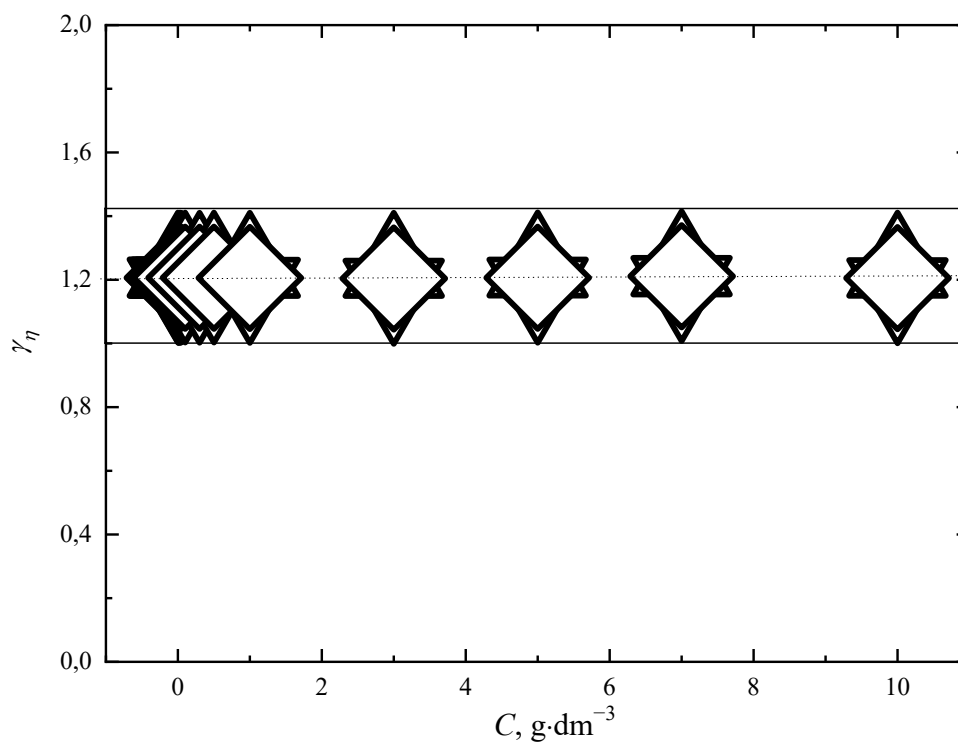


Fig. 29. Concentration dependence of the van't Hoff viscosity coefficient (γ_η) for the C₇₀-Lys–H₂O binary system. (Δ) $(\frac{\eta_{333.15}}{\eta_{353.15}})^{\frac{1}{2}}$; (∇) $(\frac{\eta_{313.15}}{\eta_{333.15}})^{\frac{1}{2}}$; (\diamond) $(\frac{\eta_{313.15}}{\eta_{353.15}})^{\frac{1}{4}}$. C is the volumetric concentration of C₇₀-Lys in aqueous solution.

Tab. 7. Temperature dependences of dynamic (η) and kinematic (η_k) viscosity in the C₇₀-Lys-H₂O binary system. ρ is the density of the solution, C is the volume concentration.

$C, \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$\eta, \text{mPa}\cdot\text{s}$			$\eta_k, \text{mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$		
	293,15 K	313,15 K	333,15 K	293,15 K	313,15 K	333,15 K
0,00	1,0008	0,6542	0,4721	1,0027	0,6584	0,4758
0,01	1,0013	0,6550	0,4740	1,0031	0,6596	0,4799
0,03	1,0032	0,6560	0,4741	1,0048	0,6600	0,4795
0,05	1,0016	0,6553	0,4730	1,0034	0,6596	0,4789
0,10	1,0036	0,6563	0,4737	1,0053	0,6605	0,4790
0,30	1,0044	0,6569	0,4744	1,0060	0,6611	0,4800
0,50	1,0065	0,6580	0,4750	1,0081	0,6621	0,4801
1,0	1,0089	0,6600	0,4770	1,0101	0,6639	0,4820
3,0	1,0262	0,6716	0,4882	1,0259	0,6749	0,4929
5,0	1,0330	0,6747	0,4873	1,0325	0,6776	0,4914
7,0	1,0669	0,6927	0,4959	1,0651	0,6948	0,4997
10,0	1,0736	0,7021	0,5088	1,0702	0,7031	0,5120

Tab. 8. Temperature dependences of dynamic (η) and kinematic (η_k) viscosity in the binary system C₇₀-Thr-H₂O. ρ is the density of the solution, C is the volume concentration.

$C, \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	$\eta, \text{mPa}\cdot\text{s}$				$\eta_k, \text{mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$			
	293,15 K	313,15 K	313,15 K	293,15 K	313,15 K	298,15 K	293,15 K	313,15 K
0,00	1,0050	0,8937	0,6560	0,4688	1,0068	0,8963	0,6603	0,4741
0,01	1,0054	0,9087	0,6840	0,4872	1,0072	0,9114	0,6884	0,4926
0,03	1,0065	0,912	0,6845	0,488	1,0083	0,9147	0,6889	0,4934
0,05	1,0076	0,9135	0,6848	0,4886	1,0094	0,9162	0,6892	0,4941
0,1	1,0133	0,9149	0,6876	0,4903	1,0150	0,9175	0,6920	0,4957
0,3	1,0146	0,9161	0,6884	0,4907	1,0162	0,9186	0,6927	0,4961
0,5	1,0226	0,9231	0,6932	0,4941	1,0241	0,9255	0,6974	0,4994
1,0	1,0309	0,9298	0,6964	0,4962	1,0320	0,9319	0,7004	0,5014
3,0	1,0359	0,9334	0,7012	0,4977	1,0358	0,9344	0,7044	0,5024
5,0	1,0422	0,9407	0,7052	0,4982	1,0405	0,9403	0,7074	0,5021
7,0	1,0467	0,9432	0,7070	0,4999	1,0437	0,9416	0,7084	0,5033
10,0	1,0517	0,9475	0,7087	0,5018	1,0465	0,9439	0,7086	0,5042

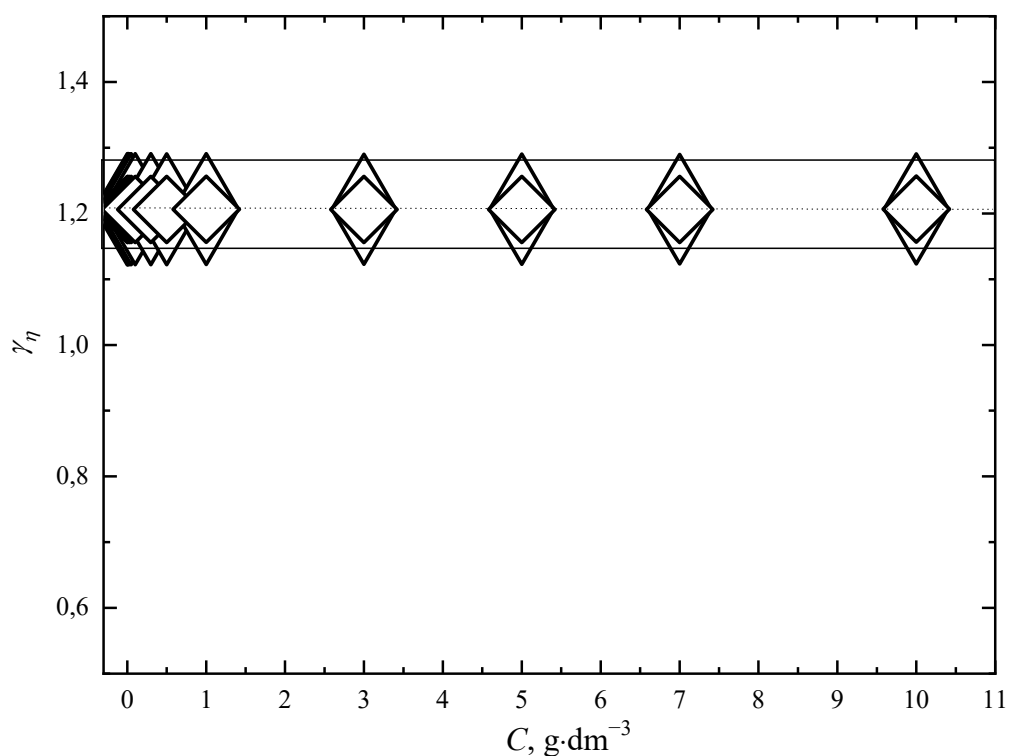


Fig. 30. Concentration dependence of the van't Hoff viscosity coefficient (γ_η) for the C_{70} -Thr-

H_2O binary system. $(\Delta)\left(\frac{\eta_{293,15}}{\eta_{313,15}}\right)^{\frac{1}{2}}$; $(\nabla)\left(\frac{\eta_{313,15}}{\eta_{333,15}}\right)^{\frac{1}{2}}$; $(\diamond)\left(\frac{\eta_{293,15}}{\eta_{333,15}}\right)^{\frac{1}{4}}$. C is the volumetric concentration

of C_{70} -Thr in aqueous solution.

3.2.3. Refractions of aqueous solutions

In Tab. 9, 10 shows the concentration dependence of the refractive indices of aqueous solutions of C_{70} -Lys и C_{70} -Thr at 298,15 K.

Tab. 9. Concentration dependence of the refractive index (n_D), specific refraction (r), molar refraction (R) of C₇₀-Lys adduct aqueous solutions, specific ($r_{C_{70}\text{-Lys}}$) and molar ($R_{C_{70}\text{-Lys}}$) refractions of the C₇₀-Lys adduct at 298,15 K. C is the volumetric concentration

$C, \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	n_D	$r, \text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$	$R, \text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$	$r_{C_{70}\text{-Lys}}, \text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$	$R_{C_{70}\text{-Lys}}, \text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$
0,0	1,332879	0,20624	3,71232	—	—
0,01	1,332882	0,20623	3,71218	—	—
0,03	1,332888	0,20624	3,71243	—	—
0,05	1,332892	0,20623	3,71232	—	—
0,10	1,332905	0,20624	3,71269	0,206	263
0,30	1,332951	0,20624	3,71342	0,206	263
0,50	1,332972	0,20624	3,71416	0,206	263
1,00	1,333113	0,20626	3,71635	0,226	289
3,00	1,333614	0,20631	3,72461	0,229	293
5,00	1,333826	0,20635	3,73271	0,228	292
7,00	1,334460	0,20641	3,74119	0,230	294
10,0	1,335121	0,20647	3,75339	0,229	293

Tab. 10. Concentration dependence of the refractive index (n_D), specific refraction (r), molar refraction (R) of C₇₀-Thr adduct aqueous solutions, specific ($r_{C_{70}\text{-Thr}}$) and molar ($R_{C_{70}\text{-Thr}}$) refractions of the C₇₀-Thr adduct at 298,15 K. C is the volumetric concentration.

$C, \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	n_D	$r, \text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$	$R, \text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$	$r_{C_{70}\text{-Thr}}, \text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$	$R_{C_{70}\text{-Thr}}, \text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$
0,00	1,333359	0,20650	3,71700	—	—
0,01	1,333365	0,20650	3,71704	—	—
0,03	1,333367	0,20650	3,71711	—	—
0,05	1,333374	0,20651	3,71736	—	—
0,10	1,333382	0,20650	3,71737	0,208	224
0,30	1,333433	0,20650	3,71810	0,206	222
0,50	1,333473	0,20650	3,71883	0,206	221
1,00	1,333583	0,20649	3,72049	0,196	211
3,00	1,333961	0,20645	3,72711	0,190	204
5,00	1,334444	0,20641	3,73373	0,189	202
7,00	1,334820	0,20637	3,74036	0,188	202
10,0	1,335480	0,20630	3,75013	0,187	201

Based on the obtained experimental data, the concentration dependences of the specific and molar refraction of aqueous solutions of C₇₀-Lys и C₇₀-Thr at 298,15 K were calculated using the Lorentz-Lorentz equation:

$$r = \left(\frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \right) \frac{1}{\rho} \quad (13),$$

$$R = \left(\frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \right) \frac{\bar{M}}{\rho} \quad (14),$$

where r , R are specific ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) and molar ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) refractions, \bar{M} is the average molecular weight of the solution: $\bar{M} = x_{\text{H}_2\text{O}} \cdot M_{\text{H}_2\text{O}} + x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \cdot M_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} (\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})$. The concentration dependences of molar and specific refraction are presented in Tab. 9, 10. According to the additivity rule of solution refraction (Eq. 15, 16), one can easily calculate the molar (r) and specific (R) refractions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts using the refraction values of water

$$r = (r_{\text{H}_2\text{O}} \cdot w_{\text{H}_2\text{O}} + r_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \cdot w_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}) \cdot \frac{1}{100} \quad (15),$$

$$R = R_{\text{H}_2\text{O}} \cdot x_{\text{H}_2\text{O}} + R_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \cdot x_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} \quad (16),$$

where r_i , R_i are the specific and molar refractions of the i -th component, w_i , x_i are the mass and molar fractions of the i -th component.

For the C₇₀-Lys adduct, the molar ($R_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}$) and ($r_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}}$) specific refractions were $275 \pm 25 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ and $0,218 \pm 0,020 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$; for the C₇₀-Thr adduct, the molar ($R_{\text{C}_{70}\text{-Thr}}$) and ($r_{\text{C}_{70}\text{-Thr}}$) specific refractions were $212 \pm 12 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ and $0,218 \pm 0,020 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Taking into account the low accuracy of refraction values at low concentrations ($C_{\text{C}_{70}\text{-Lys(Thr)}} < 0,05 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), they were not used for calculations.

In addition, the molar refraction of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts was calculated using Eisenlohr's additivity rule (taking into account atomic refractions $R_{i(j)}$ i -th atom in the j -th functional group):

$$R^{\text{add}} \approx 88R_c + 42R_H + 6R_{N(-NH_2)} + 3R_{O(-OH)} + 3R_{O(=CO)} + 3R_{=} \approx 294 \pm 5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \quad (17),$$

$$R^{\text{add}} \approx 78R_c + 16R_H + 2R_{N(-NH_2)} + 4R_{O(-OH)} + 2R_{O(=CO)} + 2R_{=} \approx 227 \pm 5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \quad (18).$$

The discrepancy in the calculation of molar refraction is associated with the choice of spectral lines ($H_\alpha[\lambda = 658,3 \text{ nm}]$ и $H_\gamma[\lambda = 436,1 \text{ nm}]$).

The specific refractions of the C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts were calculated according to Eq. 19 and 20:

$$r^{\text{add}} = \frac{R^{\text{add}}}{M_{\text{C}_{70}\text{-Lys}}} \approx 0.230 \pm 4 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \quad (19),$$

$$r^{\text{add}} = \frac{R^{\text{add}}}{M_{\text{C}_{70}\text{-Thr}}} \approx 0.210 \pm 3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \quad (20).$$

The values of specific and molar refractions calculated using the Eisenlohr additivity rule are in good agreement with the data calculated from the refractive indices of solutions.

3.2.4. Electrical conductivity of aqueous solutions

As an example, consider the data on the electrical conductivity of C₇₀-Lys adduct aqueous solutions. The concentration dependence of the electrical conductivity of C₇₀-Lys adduct aqueous solutions at 298,15 K was calculated from experimental data by means of the specific resistance of the solutions (ρ) according to Eq. 21:

$$\kappa = \frac{1}{\rho} \quad (21).$$

From the obtained data (Tab. 11) it follows that the concentration dependence of electrical conductivity $\kappa(C_M)$ (C_M is the molar concentration of C₇₀-Lys aqueous solution) increases with increasing of concentration. The molar electrical conductivity (λ) of aqueous solutions of C₇₀-Lys was calculated according to Eq. 22:

$$\lambda = \frac{1000\kappa}{C_M} \quad (22)$$

where C_M is the molarity of the solution, κ is the electrical conductivity of the solution.

Experimental data on the molar electrical conductivities of C₇₀-Lys aqueous solutions in the concentration range (0 - 5 g·dm⁻³) are presented in Tab. 11. The determination of molar electrical conductivity in infinitely dilute solutions (λ_0) was carried out by extrapolating the dependence $\lambda(C_M^{1/2})$ to $C_M^{1/2} = 0$ according to the Onsager equation:

$$\lambda = \lambda_0 - A \cdot C_M^{1/2} \quad (23)$$

where A is a constant under experimental conditions.

The apparent degree of dissociation (α) was calculated from Eq. 24:

$$\alpha = \frac{\lambda}{\lambda_0} \quad (24).$$

The calculated values of the apparent degree of dissociation are presented in Tab. 11 ($\lambda_0 \approx 0,9 \cdot 10^3 \text{ Sm} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$). Tab. 11 analysis shows that over the entire range of concentrations

C₇₀-Lys is an electrolyte of medium strength. For the dissociation of the adduct, a proton dissociation mechanism is assumed according to the following equation:



The concentration dependence of the dissociation constant K_d on the concentration was calculated by Ostwald dilution law, (without taking into account the activity coefficients of ions and undissociated molecules: $\gamma_i = \gamma_{\pm} = 1$):

$$K_d = \frac{C_M \alpha^2}{1 - \alpha} \quad (26).$$

The thermodynamic dissociation constant ($K_d^{\text{therm.}}$) was calculated by extrapolating *the* $K_d(C_M)$ dependence to the region of an infinitely dilute solution:

$$K_d^{\text{repM.}} = \lim_{C_M \rightarrow 0} K_d \quad (27).$$

Given that C₇₀-Lys aqueous solutions form associates and amino acid fragments can be hidden during the formation of associates in solution, the value of the dissociation constant is conditional. For the C₇₀-Lys adduct, the value of the thermodynamic dissociation constant ($pK_d^{\text{therm.}}$) is 3,4. For comparison with the C₇₀-Lys adduct, the pK_a value of the carboxyl group of L-lysine is 2,18. So the fullerene core reduces the dissociation of the carboxyl group and reduces the acidity of the carboxyl group in the C₇₀-Lys.

Tab. 11. Experimental data on the C₇₀-Lys aqueous solutions electrical conductivity at 298,15 K. *C* — volume concentration, *C_M* — molar concentration, *κ* — electrical conductivity, *λ* — molar electrical conductivity, *α* — apparent degree of dissociation, *K_d* — dissociation constant.

<i>C</i> , g·dm ⁻³	<i>C_M</i> , mol·dm ⁻³	<i>κ</i> , Sm·cm ⁻¹	<i>λ</i> , Sm·cm ² ·mol ⁻¹	<i>α</i>	<i>pK_d</i>
0,0000	0,0000	—	900,0 (extrapolation)	1,000 (extrapolation)	3,4 (extrapolation)
0,0781	6,911·10 ⁻⁵	4,899·10 ⁻⁵	708,8	0,787	3,7
0,1563	1,383·10 ⁻⁴	8,301·10 ⁻⁵	600,2	0,666	3,7
0,3125	2,765·10 ⁻⁴	1,175·10 ⁻⁴	425,0	0,472	3,9
0,6250	5,531·10 ⁻⁴	2,128·10 ⁻⁴	384,7	0,427	3,8
1,2500	0,00111	3,673·10 ⁻⁴	332,1	0,368	3,6
2,5000	0,00221	6,419·10 ⁻⁴	290,1	0,322	3,5
5,0000	0,004425	8,942·10 ⁻⁴	202,1	0,224	3,5

3.2.5. Surface properties of aqueous solutions

Let's consider the obtained results of C₇₀-Thr adduct as an example. Fig. 31 shows an example of the kinetic dependence of the change in surface tension in an C₇₀-Thr adduct aqueous solution. The absence of surface activity of C₇₀-Thr aqueous solutions (in the concentration range up to 1 g·L⁻¹) during 16 h of kinetic experiments was established. During this time, the surface tension corresponded to the surface tension of pure water (72,8 mN·m⁻¹) within the measurement accuracy (±0,5 mN·m⁻¹). After that, a slight decrease in the surface tension of C₇₀-Thr aqueous solutions to 72,2 mN·m⁻¹ was observed. In more concentrated solutions, a more significant decrease in surface tension was observed.

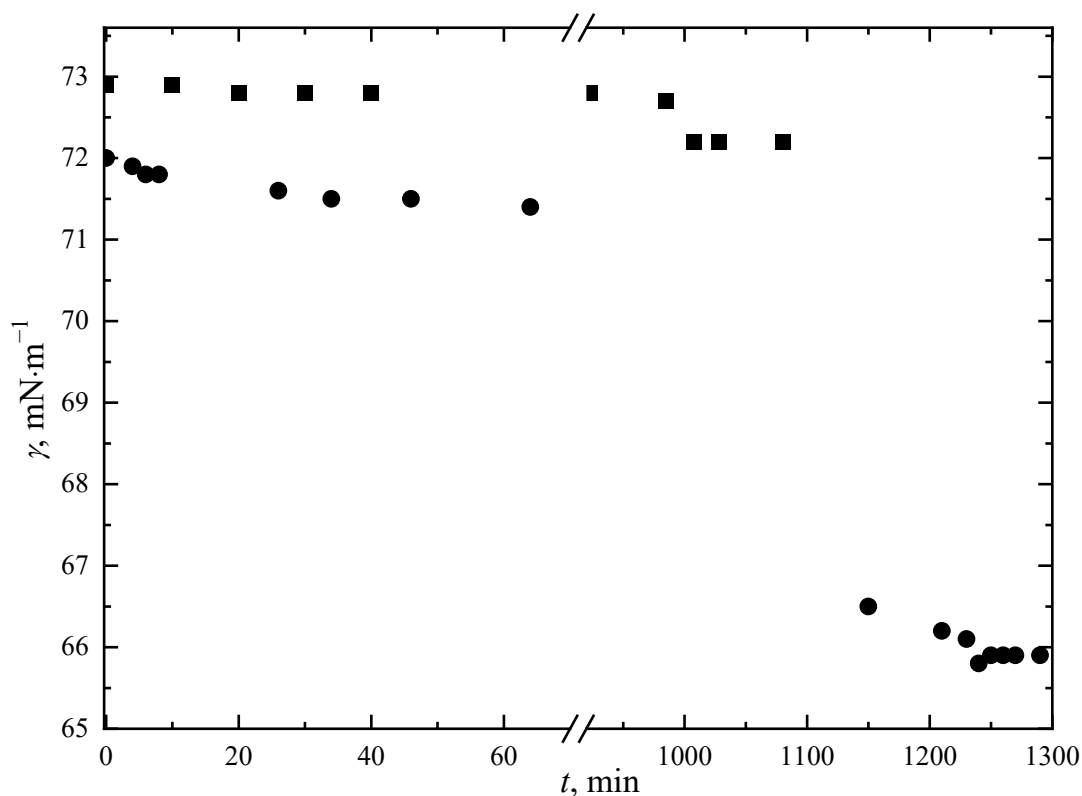


Fig. 31. Kinetic dependence of the change in surface tension in an aqueous solution of C_{70} -Thr: (■) $0,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, (●) $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

The concentration dependence of the surface tension of C_{70} -Thr aqueous solutions shows that with an increase in the concentration of C_{70} -Thr, the surface activity increases and, at the same time, the surface tension values decrease (see Fig. 32). The long induction period on the kinetic dependences of the surface tension indicates that the adsorption layer is inhomogeneous and probably consists of associates of individual molecules of the C_{70} -Thr adduct. At the same time, the slow rate of change in the surface tension of C_{70} -Thr aqueous solutions indicates that the adsorption kinetics is not controlled by diffusion from the bulk phase to the surface.

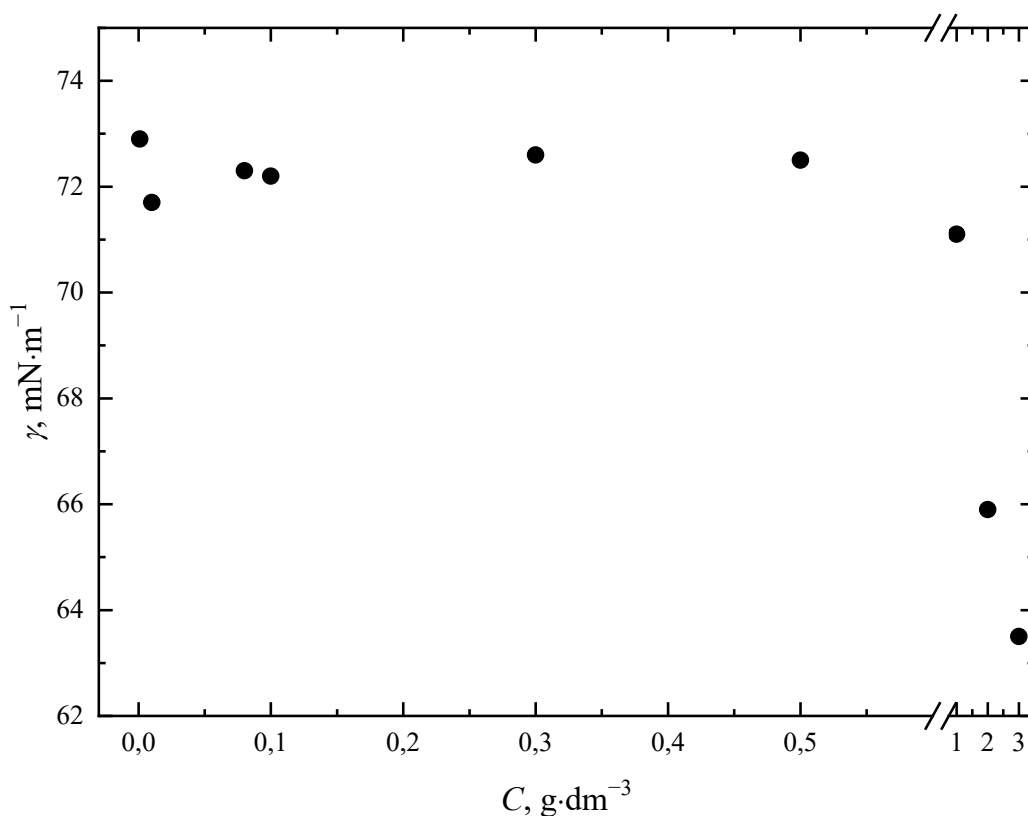
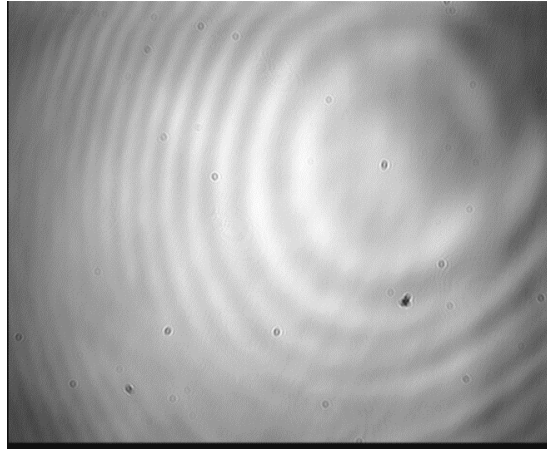


Fig. 32. Concentration dependence of the surface tension of C_{70} -Thr aqueous solutions.

BAM images (Fig. 33) demonstrate the formation of a dense film consisting of associates of the C_{70} -Thr adduct. In turn, the AFM image of surface films of C_{70} -Thr aqueous solutions reveals the formation of a continuous adsorption film consisting of low-density regions and associates C_{70} -Thr having a maximum linear size of 200 nm. As an example in Fig. 34 shows an AFM image of a film obtained from an aqueous solution of C_{70} -Thr at a concentration of $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. In the latter case, the associates are clearly visible C_{70} -Thr with linear dimensions of 15–50 nm.

(a)



(b)

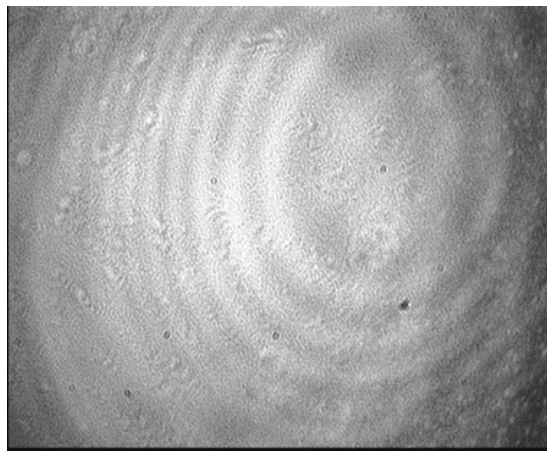


Fig. 33. BAM images of the surface of pure water (a) and the surface of an aqueous solution of C_{70} -Thr ($C = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 h after the start of the experiment (b).

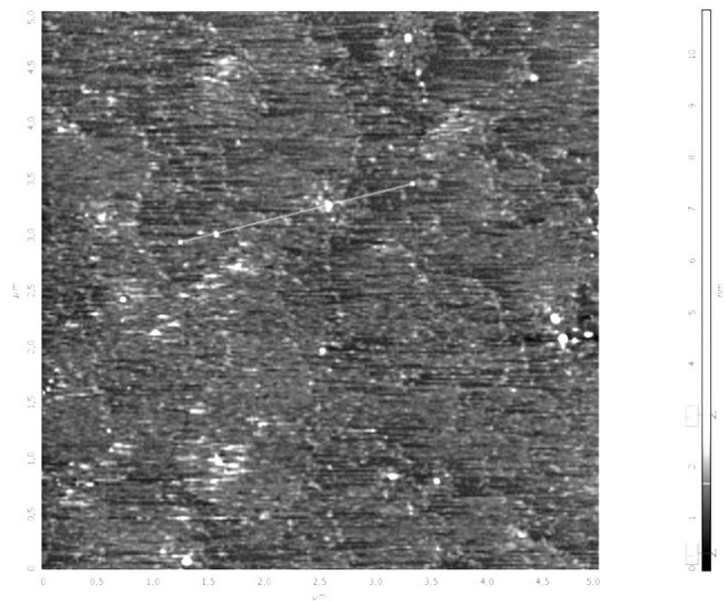


Fig. 34. AFM image of surface film from C_{70} -Thr aqueous solution ($C = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.2.6. Excess thermodynamic functions

To calculate excess thermodynamic functions and limits of stability to phase separation of water-soluble C₇₀-Lys, C₇₀-Thr fullerenes adducts solutions, an approach based on the use of the semi-empirical model VD-AS (Virial Decomposition Asymmetric Model) of the virial expansion of the excess molar Gibbs energy of the solution in mole fractions of the components was used [162–164]:

$$\frac{G^{ex}}{RT} = (n_1 + n_2) \sum_{i=1} \sum_{j=1} x_i^i x_j^j \cdot \lambda_{ij} = \frac{\sum_{i=1} \sum_{j=1} n_1^i n_2^j \cdot \lambda_{ij}}{(n_1 + n_2)^{i+j-1}} \quad (28)$$

where G^{ex} is the total molar excess Gibbs energy of the solution, $R = 8,31 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$, T is the temperature (K), n_i and x_i are the number of moles and the mole fraction of the i -th component (subscript 1 refers to fullerene adduct, index 2 refers to water), λ_{ij} is the virial coefficient in the expansion $\frac{G^{ex}}{RT}$ in mole numbers of components (upper limits of summation are generally not limited and can be arbitrary), λ_{ij} is identified with the reduced (to RT) nonspecific interaction energy of i particles 1st component and j particles of the 2nd component.

It should be noted that when only one term is used in such an expansion, the well-known model of strictly regular solutions is realized, when the temperature dependence of a single virial coefficient is assumed, the model of quasi-regular solutions is realized, when third virial coefficients are used, the model of subregular solutions and the EFLCP model, and finally, with the additional use in the expansion of the contribution of electrostatic non-specific interactions according to the Debye-Hückel theory - the Pitzer model in various modifications.

The experimental values of ice freezing temperature decrease for C₇₀-Lys–H₂O and C₇₀-Thr–H₂O binary systems are shown in Fig. 35, 36 and in Tab. 12, 13. The non-linear behavior of the function $\Delta T(x)$ indicates the non-ideality of C₇₀-Lys и C₇₀-Thr aqueous solutions. In addition, for the C₇₀-Lys–H₂O and C₇₀-Thr–H₂O binary systems, the decrease in the freezing point of ice significantly exceeds the corresponding values obtained for ideal solutions.

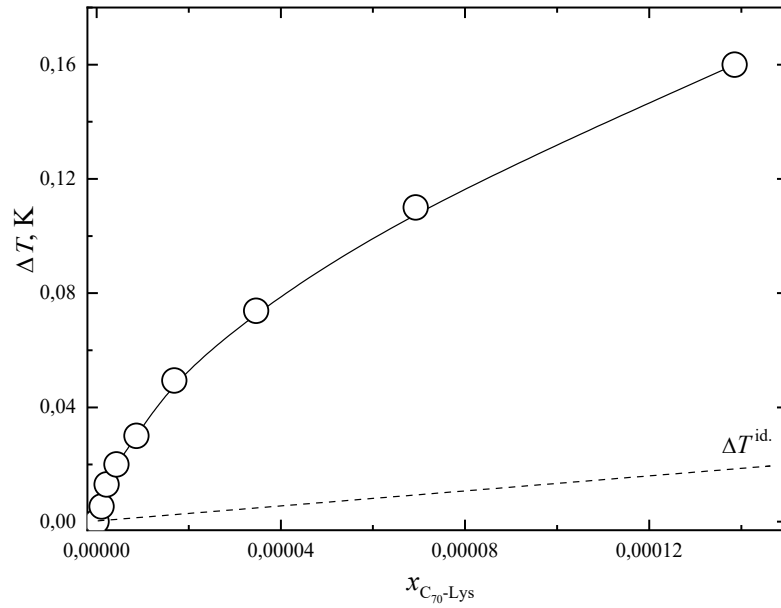


Fig. 35. Decrease in the freezing point of ice (ΔT) for the binary system $C_{70}\text{-Lys-H}_2\text{O}$. $x_{C_{70}\text{-Lys}}$ - mole fraction of $C_{70}\text{-Lys}$ in aqueous solution. The dotted line corresponds to the decrease in the freezing point of ice for ideal solutions of non-electrolytes.

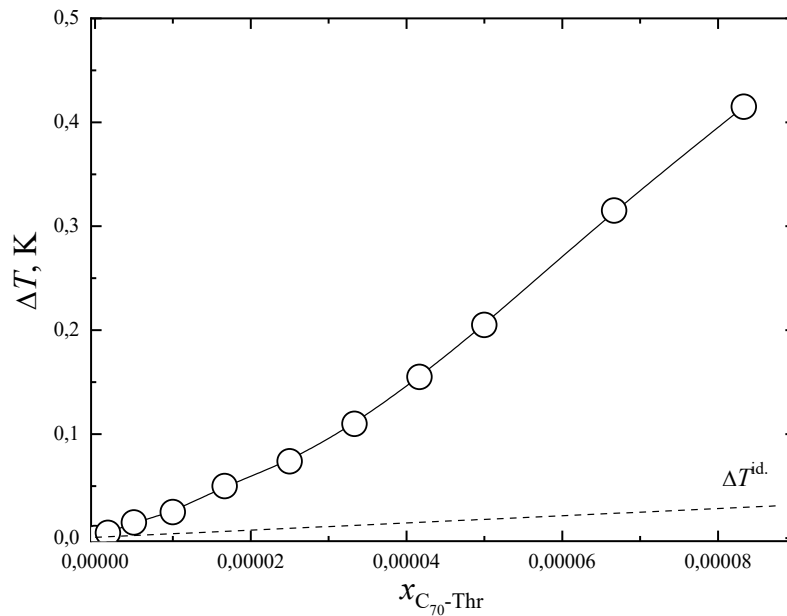


Fig. 36. Decrease in the freezing point of ice (ΔT) for the binary system $C_{70}\text{-Thr-H}_2\text{O}$. $x_{C_{70}\text{-Thr}}$ is the mole fraction of $C_{70}\text{-Thr}$ in aqueous solution. The dotted line corresponds to the decrease in the freezing point of ice for ideal solutions of non-electrolytes.

Tab. 12. Cryoscopic data and excess thermodynamic functions of the C₇₀-Lys-H₂O binary system. $x_{C_{70}\text{-Lys}}$ - mole fraction of C₇₀-Lys in aqueous solution, ΔT - lowering the freezing point of ice, $\ln a_{H_2O}$, $\ln \gamma_{H_2O}$ — logarithms of activity and water activity coefficient, $\ln \gamma_{C_{70}\text{-Lys}}^{\text{asymm.}}$ — logarithm of C₇₀-Lys activity coefficient in the "asymmetric" scale of normalization of activity coefficients.

$x_{C_{70}\text{-Lys}}$	ΔT , K	$\ln a_{H_2O}$	$\ln \gamma_{H_2O}$	$\ln \gamma_{C_{70}\text{-Lys}}^{\text{asymm.}}$
$1,083 \cdot 10^{-6}$	0,005	$-5,86 \cdot 10^{-5}$	$-5,75 \cdot 10^{-5}$	3,38
$2,166 \cdot 10^{-6}$	0,013	$-1,44 \cdot 10^{-4}$	$-1,42 \cdot 10^{-4}$	6,65
$4,332 \cdot 10^{-6}$	0,020	$-2,22 \cdot 10^{-4}$	$-2,18 \cdot 10^{-4}$	12,9
$8,66 \cdot 10^{-6}$	0,030	$-3,33 \cdot 10^{-4}$	$-3,25 \cdot 10^{-4}$	24,3
$1,73 \cdot 10^{-5}$	0,050	$-5,49 \cdot 10^{-4}$	$-5,32 \cdot 10^{-4}$	42,2
$3,46 \cdot 10^{-5}$	0,075	$-8,22 \cdot 10^{-4}$	$-7,87 \cdot 10^{-4}$	66,0
$6,92 \cdot 10^{-5}$	0,11	-0,00122	-0,00116	72,5
$1,38 \cdot 10^{-4}$	0,16	-0,00178	-0,00164	73,1

Tab. 13. Cryoscopic data and excess thermodynamic functions of the C₇₀-Thr-H₂O binary system. $x_{C_{70}\text{-Thr}}$ - mole fraction of C₇₀-Thr in aqueous solution, ΔT - lowering the freezing point of ice, $\ln a_{H_2O}$, $\ln \gamma_{H_2O}$ - logarithms of activity and water activity coefficient, $\ln \gamma_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{asymm.}}$ - logarithm of C₇₀-Thr activity coefficient in the "asymmetric" scale of normalization of activity coefficients.

$x_{C_{70}\text{-Thr}}$	ΔT , K	$\ln a_{H_2O}$	$\ln \gamma_{H_2O}$	$\ln \gamma_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{asymm.}}$
$1,67 \cdot 10^{-6}$	0,005	$-5,56 \cdot 10^{-5}$	$-5,40 \cdot 10^{-5}$	5,64
$5,00 \cdot 10^{-6}$	0,015	$-1,67 \cdot 10^{-4}$	$-1,62 \cdot 10^{-4}$	16,2
$1,00 \cdot 10^{-6}$	0,025	$-2,78 \cdot 10^{-4}$	$-2,68 \cdot 10^{-4}$	30,1
$1,67 \cdot 10^{-5}$	0,050	$-5,56 \cdot 10^{-4}$	$-5,40 \cdot 10^{-4}$	45,4
$2,50 \cdot 10^{-5}$	0,074	$-8,22 \cdot 10^{-4}$	$-7,97 \cdot 10^{-4}$	59,5
$3,33 \cdot 10^{-5}$	0,110	-0,00122	-0,00119	68,5
$4,17 \cdot 10^{-5}$	0,155	-0,00173	-0,00168	72,9
$5,00 \cdot 10^{-5}$	0,205	-0,00228	-0,00223	73,1
$6,67 \cdot 10^{-5}$	0,315	-0,00351	-0,00345	62,8
$8,33 \cdot 10^{-5}$	0,415	-0,00463	-0,00455	41,1

Water activity coefficients were calculated according to Eq. 29:

$$\ln a_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{-\Delta H_{\text{H}_2\text{O}}^f \Delta T - \Delta C_p \Delta T^2}{R(T_0^f - \Delta T)T_0^f} \quad (29)$$

where $\Delta H_{\text{H}_2\text{O}}^f$ is the enthalpy of ice melting ($5990 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$), ΔC_p is the change in isobaric heat capacity for the ice melting process ($-38,893 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T_0^f is the melting temperature of pure ice ($273,15 \text{ K}$), $\Delta T = T_0^f - T$, T is the temperature of the onset of the crystallization process in solution, R is the universal gas constant.

Based on Eq. 30 calculated coefficients of water activity:

$$\ln \gamma_{\text{H}_2\text{O}} = \ln a_{\text{H}_2\text{O}} - \ln x_{\text{H}_2\text{O}} = \ln a_{\text{H}_2\text{O}} - \ln(1 - x_1) \quad (30).$$

Thermodynamic description of C_{70} -Lys- H_2O and C_{70} -Thr- H_2O binary systems was performed using the semi-empirical asymmetric virial decomposition model (VD-AS). This model has previously been successfully used for the thermodynamic description of aqueous solutions of water-soluble adducts of light fullerenes, including carboxylated adducts $\text{C}_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ and $\text{C}_{70}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ [165], adducts of fullerenes with L - amino acids $\text{C}_{60}(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2)_2$, $\text{C}_{60}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3)_2$, $\text{C}_{70}(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2)_3$ [167]. For aqueous solutions of carbon nanoclusters, this model was first applied by N. A. Charykov, professor of the Department of Physical Chemistry [168] at St. Petersburg State Technical University.

Based on the VD-AS model, the following equations were obtained for calculating the excess thermodynamic functions in the "asymmetric" normalization scale:

$$\ln \gamma_1^{ass} \approx 2\Lambda_2 x_1 + 3\Lambda_3 x_1^2 + 4\Lambda_4 x_1^3 \quad (31.1),$$

$$\ln \gamma_2^{ass} \approx -\Lambda_2 x_1^2 - 2\Lambda_3 x_1^3 - 3\Lambda_4 x_1^4 \quad (31.2),$$

where

$$\Lambda_i(T) = \sum_{j=1}^i \lambda_{ij} \quad (32).$$

Sustainability limits of C_{70} adducts solutions to phase separation were calculated according to Eq. 33 using Eq. 31.1 and 31.2:

$$g_{11}^{mix} = \frac{\partial^2 \left(\frac{G^{mix}}{RT} \right)}{\partial x_1^2} = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1 = 0 \quad (33)$$

According to the obtained data $\ln \gamma_2(X_1)$ for binary systems C_{70} -Lys- H_2O and C_{70} -Thr- H_2O using the VD-AS model according to Eq. 33 the following values of the parameters $\Lambda_2 = 1,58 \cdot 10^6$, $\Lambda_3 = -1,40 \cdot 10^{10}$, $\Lambda_4 = 4,15 \cdot 10^{13}$ (C_{70} -Lys) and $\Lambda_2 = 1,73 \cdot 10^6$, $\Lambda_3 = -1,55 \cdot 10^{10}$, $\Lambda_4 =$

$3,27 \cdot 10^{13}$ (C_{70} -Thr) were obtained. In general, the high numerical values of the parameters are not surprising, because they represent the sum of thousands of terms corresponding to the interaction of nanoclusters with a large number of water molecules. The calculated concentration dependences of activity and activity coefficients C_{70} -Lys and C_{70} -Thr are presented in Tab. 12, 13 and in Fig. 37, 38.

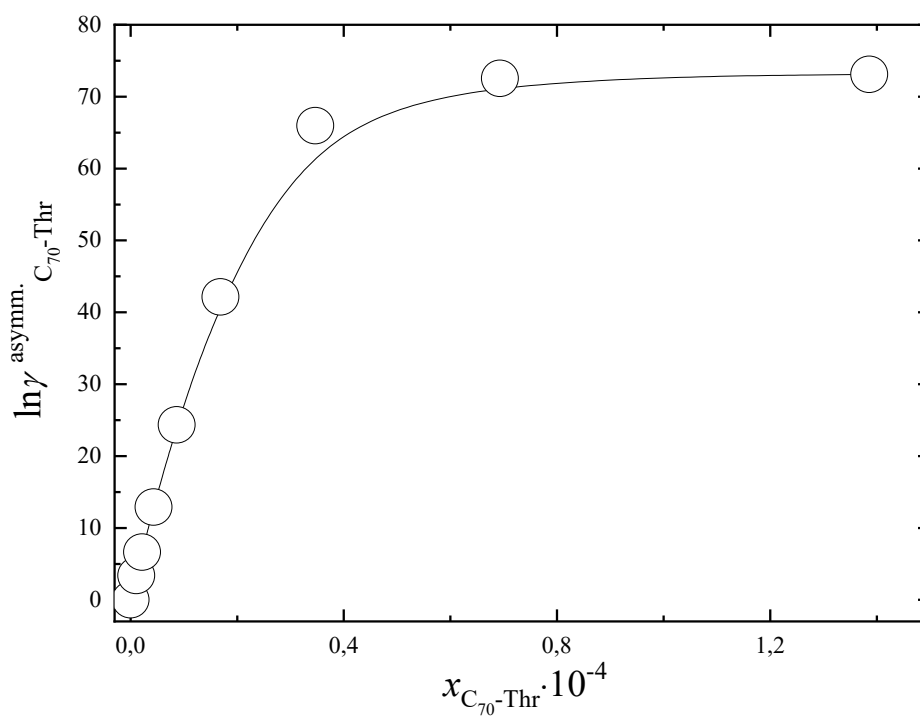


Fig. 37. Concentration dependence of the logarithm of the activity coefficient C_{70} -Lys ($\ln \gamma^{\text{asymm.}}_{C_{70}\text{-Lys}}$) in an aqueous solution. $x_{C_{70}\text{-Lys}}$ — mole fraction of C_{70} -Lys in aqueous solution.

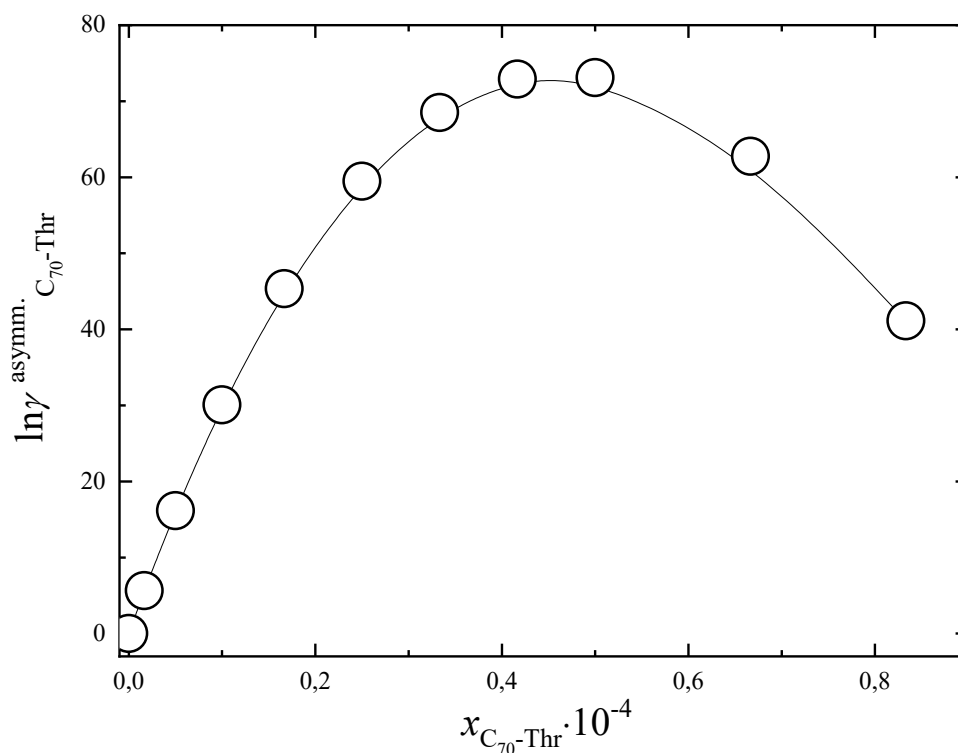


Fig. 38. Concentration dependence of the logarithm of the activity coefficient $C_{70}\text{-Thr}$ ($\ln \gamma_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{asymm.}}$) in an aqueous solution. $x_{C_{70}\text{-Thr}}$ is the mole fraction of $C_{70}\text{-Thr}$ in aqueous solution.

Fig. 39 and 40 shows the intersection of the function $F(x_1) = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1$ with the x-axis. Additionally, it can be concluded that in the concentration range up to $x_1^{\text{instab.}} = 6,0 \cdot 10^{-5}$ ($C_{70}\text{-Lys}$) and $x_1^{\text{instab.}} = 4,7 \cdot 10^{-5}$ ($C_{70}\text{-Thr}$), the formation of stable aqueous solutions of fullerene adducts is observed. The point of intersection of the ordinate axis with the zero value of the function corresponds to the concentration value at which the solution becomes unstable. Concentration range $x_1 > x_1^{\text{instab.}}$ corresponds to the stratification of solutions (solutions lose their stability).

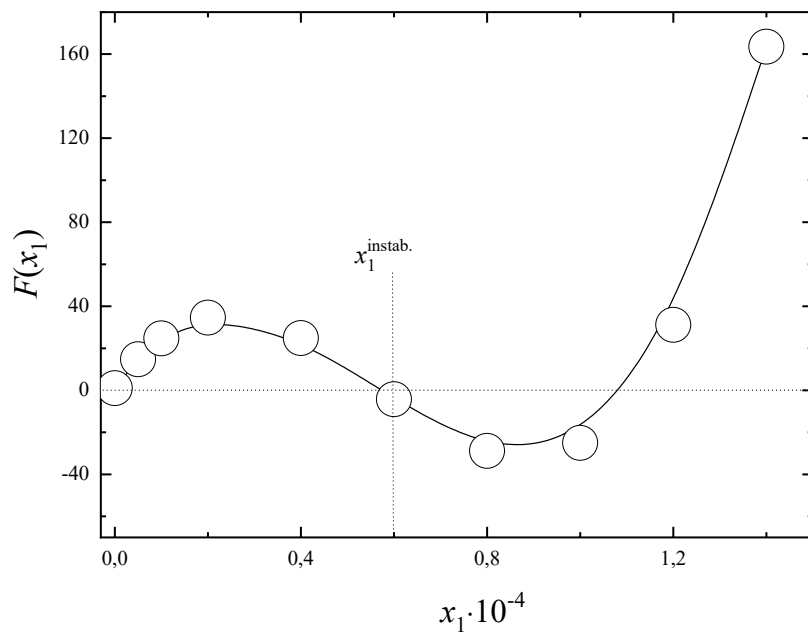


Fig. 39. Concentration dependence $F(x_1) = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1$ for the C₇₀-Lys-H₂O binary system. x_1 — mole fraction of C₇₀-Lys in aqueous solution.

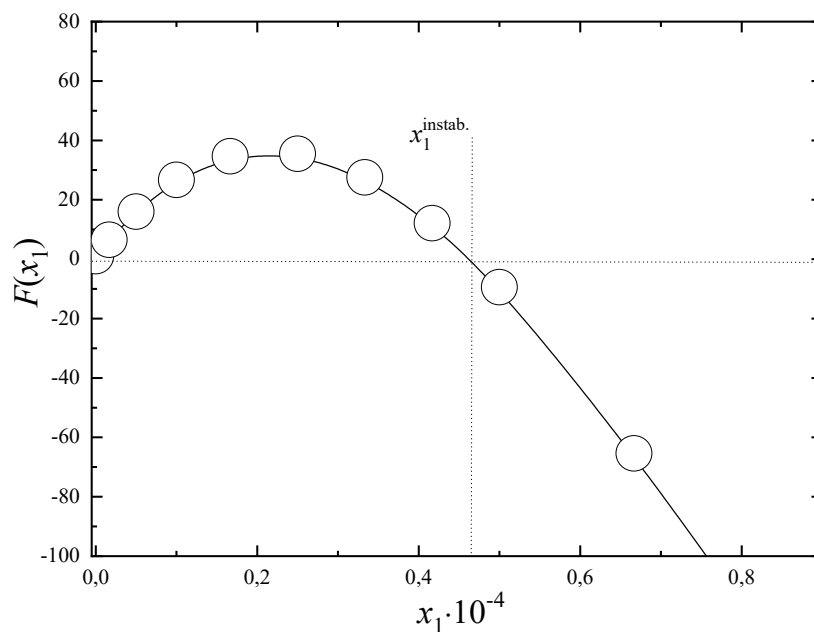


Fig. 40. Concentration dependence $F(x_1) = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1$ for the C₇₀-Thr-H₂O binary system. x_1 — mole fraction of C₇₀-Thr in aqueous solution.

3.2.7. Nanoparticles size distribution and ζ -potentials

In Tab. 14, 15 and Fig. 41, 42 present experimental data on the size distribution of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr associates in aqueous solutions at $T = 298,15$ K. An analysis of the obtained values allows us to draw the following conclusions: (1) C₇₀-Lys and C₇₀-Thr monomeric molecules with linear dimensions of 2 nm were not detected in the entire range of concentrations; (2) in the concentration range less than $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, the formation of associates of the first order with linear dimensions of 30–50 nm and the second order with dimensions of 100–300 nm was observed; (3) at concentrations above $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, the formation of associates of the third order (700–900 nm) and the fourth order (5–6 μm) was observed. The formation of third-order associates corresponds to the loss of stability of fullerene adducts solutions.

According to Eq. 32, the number of associates i -th type, packed into associates $(i + 1)$ -th type $N_{i \rightarrow i+1}$ was calculated:

$$N_{i \rightarrow i+1} = \left(\frac{d_{i+1}}{d_i} \right)^3 \cdot K_{\text{упак.}} \quad (34),$$

where $K_{\text{упак.}}$ is the formal coefficient of packing "small spheres" into a "large sphere".

Due to the relatively large size and the same charge of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr particles in aqueous solutions, leading to repulsion, the packing factor corresponding to the cubic cell was chosen ($K_{\text{упак.}} \approx 0,52$). For comparison, the value of $K_{\text{упак.}} = 0,74$ corresponds to the densest packing of spheres (face-centered cubic cell).

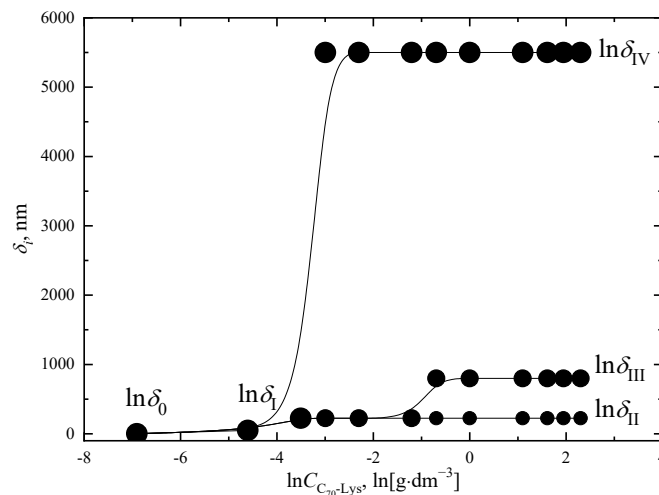


Fig. 41. Concentration dependence of the linear dimensions of C₇₀-Lys associates in an aqueous solution at 298,15 K. $C_{\text{C}_{70}\text{-Lys}}$ - volumetric concentration of C₇₀-Lys in an aqueous solution.

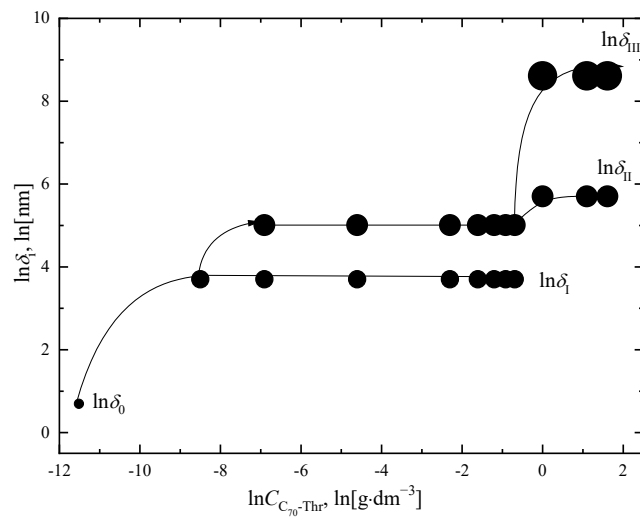


Fig. 42. Concentration dependence of the linear dimensions of $C_{70}\text{-Thr}$ associates in an aqueous solution at 298,15 K. $C_{C_{70}\text{-Thr}}$ - volumetric concentration of $C_{70}\text{-Thr}$ in an aqueous solution.

Tab. 14. C₇₀-Lys associates size distribution in aqueous solutions at 298,15 K. δ_i is the average diameter of i -th type associates. $N_{i \rightarrow j}$ is the average number of C₇₀-Lys associates of the i -th type in associates j -th type, ζ_i — zeta potentials of i -th type associates.

$C,$ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	$\delta_0,$ nm	$\delta_{\text{I}},$ nm	$\delta_{\text{II}},$ nm	$\delta_{\text{III}},$ nm	$\delta_{\text{IV}},$ μm	$N_{0 \rightarrow 1}$	$N_{0 \rightarrow 2}$	$N_{0 \rightarrow 3}$	$N_{0 \rightarrow 4}$	$N_{1 \rightarrow 2}$	$N_{2 \rightarrow 3}$	$N_{3 \rightarrow 4}$	$\zeta_{\text{II}},$ mV	$\zeta_{\text{III}},$ mV	$\zeta_{\text{IV}},$ mV
0	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,01	—	40–60	150–300	—	—	$8 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^5$	—	—	50	—	170	-20	—	—
0,03	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,05	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,1	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,3	—	—	150–300	—	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	—	$1,5 \cdot 10^9$	—	—	170	-20	—	-50
0,5	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
1,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
3,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
5,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
7,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50
10,0	—	—	150–300	700–900	5–6	—	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^9$	—	20	170	-20	-30	-50

Tab. 15. C₇₀-Thr associates size distribution in aqueous solutions at 298,15 K. δ_i is the average diameter of i -th type associates. $N_{i \rightarrow j}$ is the average number of C₇₀-Thr associates of the i -th type in associates j -th type, ζ_i — zeta potentials of i -th type associates.

C , $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	δ_0 , nm	δ_I , nm	δ_{II} , nm	δ_{III} , μm	$N_{0 \rightarrow 1} \cdot 10^{-3}$	$N_{0 \rightarrow 2} \cdot 10^{-4}$	$N_{0 \rightarrow 3} \cdot 10^{-9}$	$N_{1 \rightarrow 2} \cdot 10^{-1}$	$N_{2 \rightarrow 3} \cdot 10^{-3}$	ζ_I , mV	ζ_{II} , mV	ζ_{III} , mV
0	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,001	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	—	—
0,01	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,1	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,2	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,3	—	30–50	100–200	—	2–8	3–30	—	3–1000	—	-20	-35	—
0,4	—	30–50	100–200	5–6	2–8	3–30	2–3	3–1000	—	-20	-35	—
0,5	—	30–50	100–200	5–6	2–8	3–30	2–3	3–1000	—	-20	-35	—
1,0	—	—	200–400	5–6	—	30–200	2–3	—	1–10	-20	-35	-55
3,0	—	—	200–400	5–6	—	30–200	2–3	—	1–10	-20	-35	-55
5,0	—	—	200–400	5–6	—	30–200	2–3	—	1–10	-20	-35	-55

In addition, based on the experimental values of the electrophoretic mobility, the concentration dependence of the ζ potential was obtained using the Helmholtz–Smoluchowski equation, since in the case of aqueous solutions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr $\kappa a \gg 1$ (a is the radius of the particle and κ is reversal Debye length or reversal electrical double layer thickness):

$$\zeta = \frac{u_e \eta}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (35),$$

where u_e is the electrophoretic mobility, ε is the relative permittivity of the electrolyte solution, ε_0 is the permittivity of the vacuum, η is the dynamic viscosity of the liquid medium.

The ionic strength of the aqueous solution was determined from the dissociation of fullerene adducts. Debye length values were determined using the following equation:

$$\delta = \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 D}{\kappa}} \quad (36),$$

where D is the proton diffusion coefficient, κ is the electrical conductivity, ε is the relative permittivity of the electrolyte solution, and ε_0 is the permittivity of vacuum. According to calculations, the Debye lengths are on the order of units of nanometers.

Analysis of the presented data (Fig. 43, 44) shows that over the entire range of concentrations, C₇₀-Lys and C₇₀-Thr solutions are aggregative stable over the entire range of concentrations. In addition, the distribution of ζ potentials corresponds to the nanoparticles size distribution.

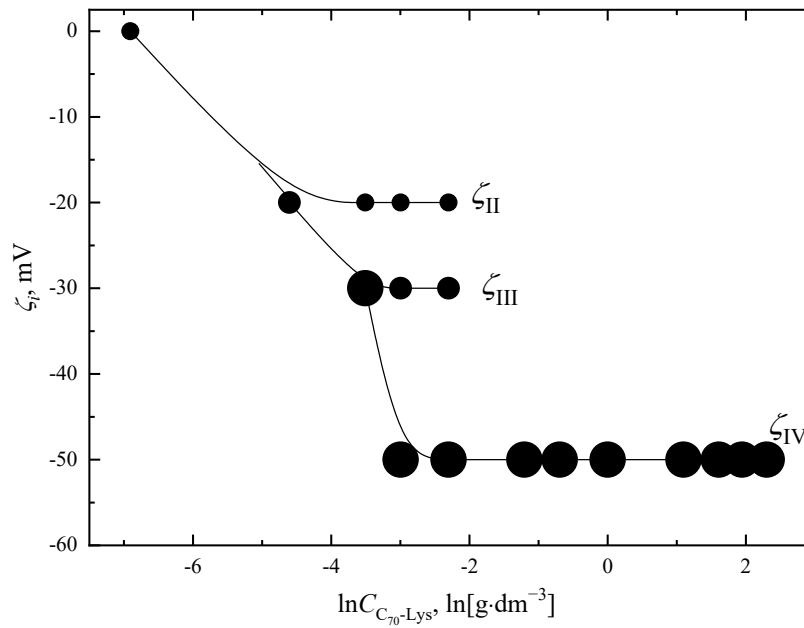


Fig. 43. Concentration dependence of ζ -potentials of C_{70} -Lys associates in an aqueous solution at 298,15 K. $C_{C_{70}\text{-Lys}}$ - volume concentration of the C_{70} -Lys adduct in an aqueous solution.

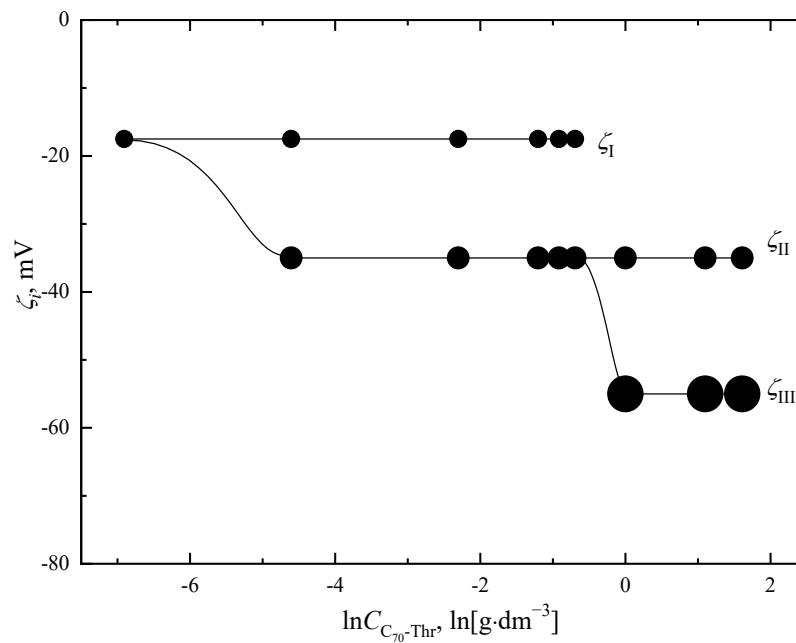


Fig. 44. Concentration dependence of ζ -potentials of C_{70} -Thr associates in an aqueous solution at 298,15 K. $C_{C_{70}\text{-Thr}}$ - volume concentration of the C_{70} -Thr adduct in an aqueous solution.

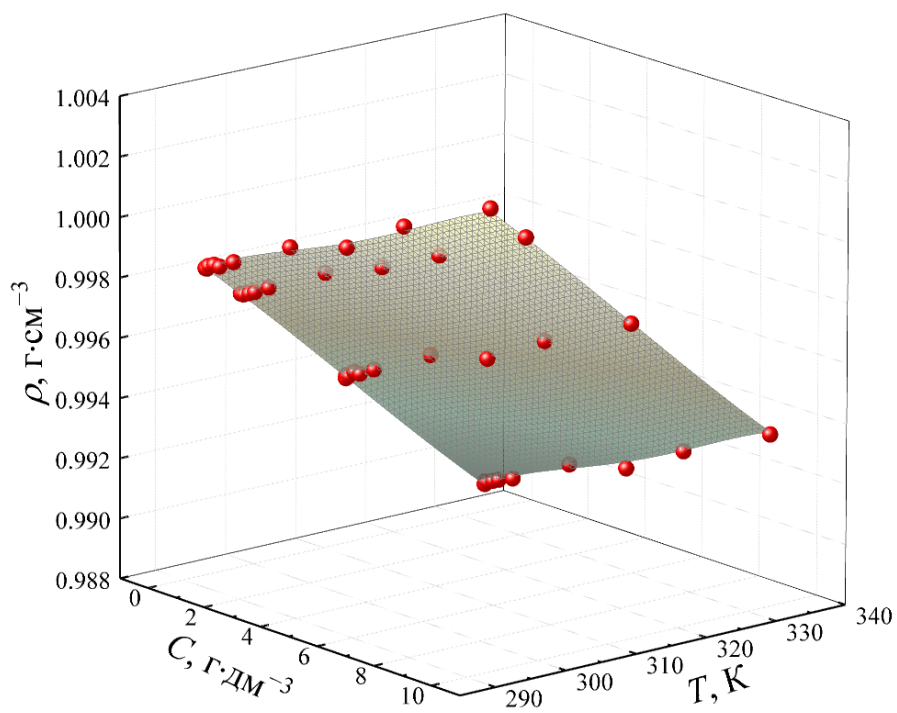
3.2.8. Correlation between density and viscosity experimental data

The temperature and concentration dependences of density and viscosity were described using the following fourth order polynomial function, $M(T, x)$:

$$M = A + \sum_{i=1}^4 b_i \cdot T^i + \sum_{j=1}^4 b_j \cdot C^j \quad (37),$$

where M is the property of the solution (density, dynamic viscosity), C is the volume concentration of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr, T is the absolute temperature, A , b_i ($i = 1-8$) are empirical parameters calculated using the method of least squares in MATLAB. The results obtained are shown in Fig. 45, 46 and in Tab. 16.

(a)



(b)

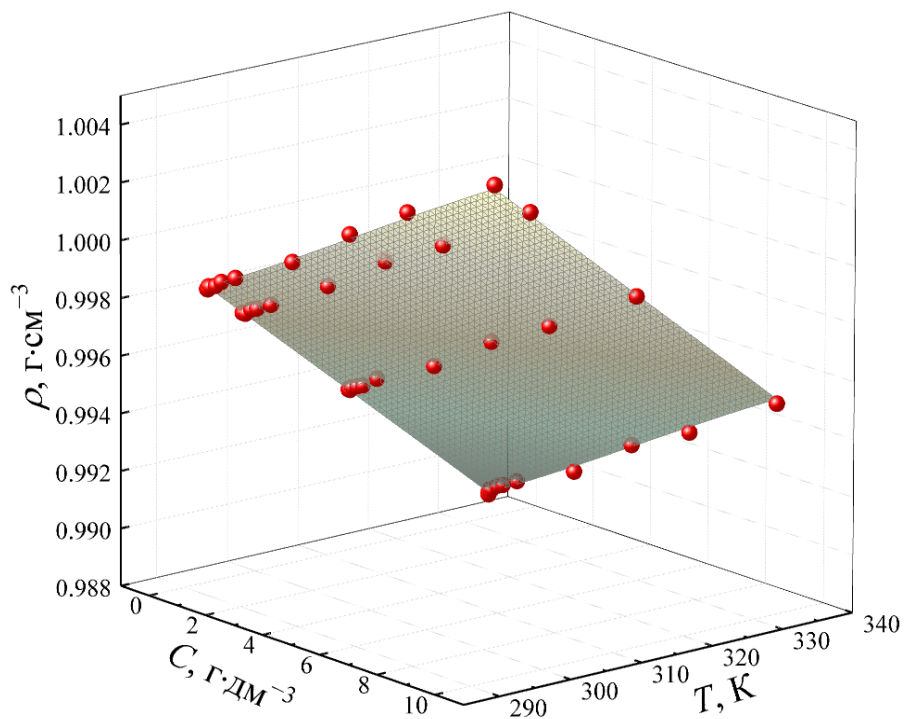
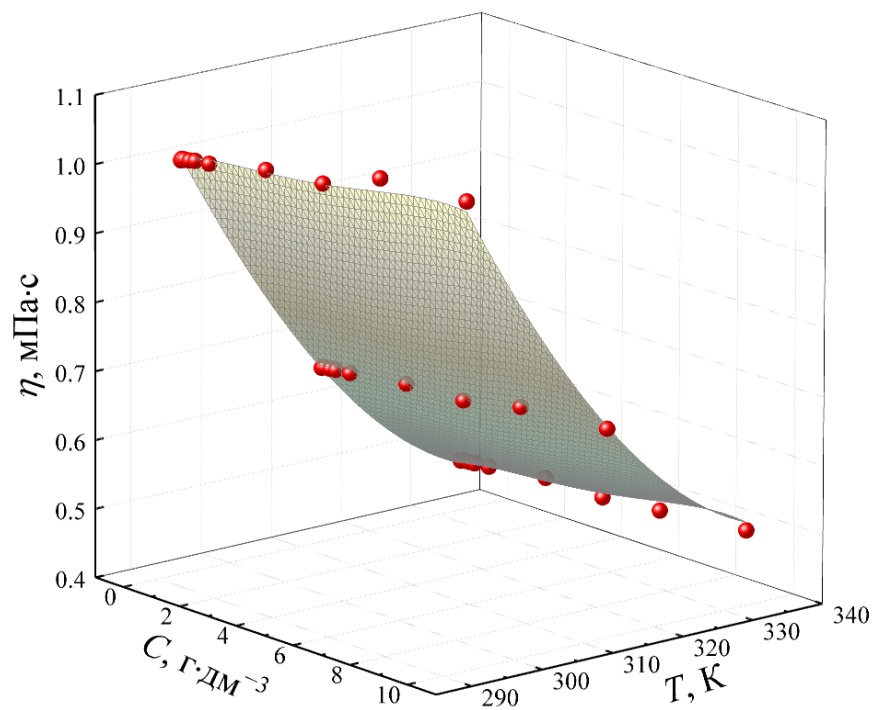


Fig. Temperature (T) and concentration (C) dependence of density (ρ) of aqueous solutions of C_{70} -Lys (a) and C_{70} -Thr (b). Experimental data are red spheres, calculated data are surfaces.

(a)



(b)

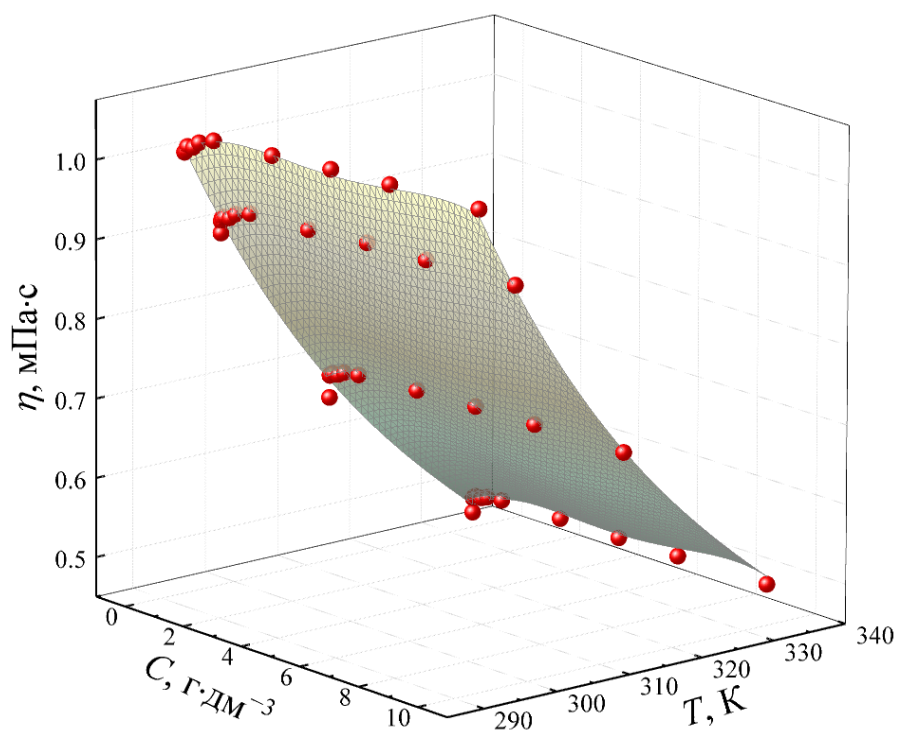


Fig. 46. Temperature (T) and concentration (C) dependence of viscosity (η) of aqueous solutions of C₇₀-Lys (a) and C₇₀-Thr (b). Experimental data are red spheres, calculated data are surfaces.

Tab. 16. Correlation parameters A , b_i ($i = 1-8$) of the polynomial equation (35) describing the temperature and concentration dependences of the densities (ρ) and dynamic viscosities (η) of aqueous solutions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr. R^2 - coefficient of determination.

Solution property	A	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	b_6	b_7	b_8	R^2
C ₇₀ -Lys										
$\rho / \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,761	$6,805\cdot 10^{-4}$	$-1,007\cdot 10^{-4}$	$1,518\cdot 10^{-5}$	$-7,006\cdot 10^{-7}$	0,00185	$-1,231\cdot 10^{-6}$	$-1,607\cdot 10^{-8}$	$2,774\cdot 10^{-11}$	0,99948
$\eta / \text{mPa}\cdot\text{s}$	9,253	0,0109	-0,0035	$6,434\cdot 10^{-4}$	$-3,495\cdot 10^{-5}$	-0,0109	$-7,976\cdot 10^{-5}$	$-1,361\cdot 10^{-7}$	$7,096\cdot 10^{-10}$	0,99902
C ₇₀ -Thr										
$\rho / \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1,052	$6,035\cdot 10^{-4}$	$1,536\cdot 10^{-5}$	$-1,101\cdot 10^{-6}$	$1,151\cdot 10^{-8}$	$-1,621\cdot 10^{-5}$	$-1,187\cdot 10^{-6}$	$2,843\cdot 10^{-9}$	$-2,538\cdot 10^{-12}$	0,99948
$\eta / \text{mPa}\cdot\text{s}$	47,505	0,0283	-0,0103	0,00147	$-6,863\cdot 10^{-5}$	-0,263	$-6,067\cdot 10^{-5}$	$2,455\cdot 10^{-6}$	$-3,533\cdot 10^{-5}$	0,99883

3.3. Biocompatibility of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts

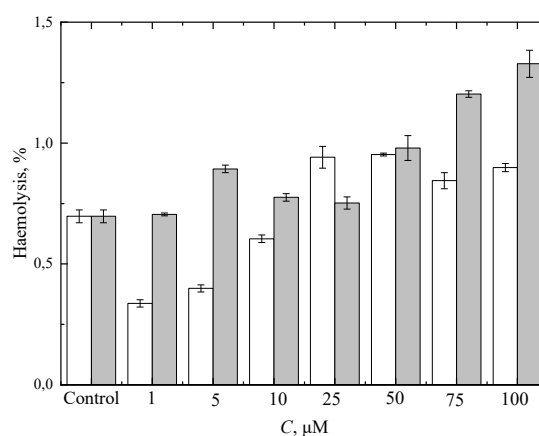
3.3.1. Haemocompatibility

3.3.1.1. Spontaneous haemolysis

To assess the biocompatibility of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts, its effect on haemolysis was studied. In the case of substances compatible with the blood, the erythrocyte membrane remains intact and the contents of the cell are not released. In this case, the toxicity of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr was determined by assessing the released hemoglobin.

The results of percent haemolysis of erythrocytes incubated with C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts are shown in Fig. 47. The amount of haemolysis is less than 5%, which indicates the haemocompatibility of the obtained nanomaterials [169].

(a)



(b)

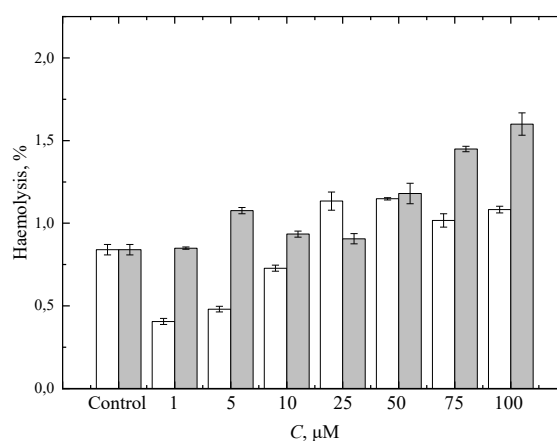


Fig. 47. Effect of adducts C₇₀-Lys (a) и C₇₀-Thr (b) on haemolysis after incubation for □ - 1 h, ■ - 3 h.

3.3.1.2. Platelet aggregation

Results of measurements of the influence of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts on human platelet aggregation in the presence of inducers of platelet aggregation are presented in Tab. 17. The adduct C₇₀-Lys in the concentration range of 1-100 µM showed antiplatelet activity in tests of ADP-, collagen- and adrenaline-induced aggregation. At the same time, the C₇₀-Thr adduct has antiplatelet activity in tests for platelet aggregation induced by ADP and collagen in the concentration range of 1-100 µM. In contrast, epinephrine-induced aggregation has no statistically significant changes in the studied concentration range.

3.3.1.3. Plasma coagulation haemostasis

Results of measurements of the influence of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts on the parameters of plasma coagulation haemostasis are presented in Tab. 18. C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts exhibit anticoagulant properties that are statistically significantly different from control, increasing APTT and PT at all concentrations studied.

Tab. 17. Effect of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr on ADP, collagen, adrenaline-induced platelet aggregation in platelet-rich plasma.

Adduct	Inductor	Control	Amplitude, %				
			C (adduct), μM				
			10	25	50	75	100
C ₇₀ -Lys	ADP	70,2 ± 2,8	66,1 ± 1,5*	66,7 ± 1,3*	70,7 ± 1,4*	62,4 ± 1,8*	66,7 ± 1,0*
	Collagen	87,0 ± 2,1	66,9 ± 2,1*	77,4 ± 2,5*	77,6 ± 4,2*	76,3 ± 1,8*	73,3 ± 2,4*
	Adrenalin	79,8 ± 3,8	82,4 ± 3,9	78,0 ± 5,1	73,8 ± 0,9*	73,2 ± 1,7*	72,5 ± 1,4*
C ₇₀ -Thr	ADP	65,0 ± 1,8	60,3 ± 1,1	55,8 ± 1,3*	53,4 ± 1,9*	47,7 ± 1,3*	45,9 ± 1,3*
	Collagen	74,4 ± 1,7	70,3 ± 2,7	64,6 ± 1,7*	60,2 ± 1,1*	54,1 ± 1,3*	54,0 ± 1,8*
	Adrenalin	71,8 ± 4,9	71,2 ± 4,4	68,8 ± 5,3	69,2 ± 4,5	69,4 ± 5,4	65,4 ± 5,1

* — statistically significant in relation to control ($p < 0,05$)

Tab. 18. Influence of C₇₀-Lys и C₇₀-Thr on parameters of plasma -coagulation haemostasis.

Adduct	Test	Norm	Control	C (adduct), μM					
				1	5	10	50	75	100
				Clotting time, s					
C ₇₀ -Lys	APTT, s	28–40	32,8 ± 1,0	36,8 ± 0,5*	39,5 ± 1,4*	40,3 ± 0,9*	42,5 ± 1,2*	46,8 ± 2,0*	44,9 ± 1,8*
	PV, s	13–18	17,3 ± 1,8	18,9 ± 1,7*	17,4 ± 2,1*	19,0 ± 2,3*	20,6 ± 0,7*	24,7 ± 1,8*	28,6 ± 1,7*
C ₇₀ -Thr	APTT, s	28–40	36,5 ± 0,9	45,6 ± 0,8*	46,0 ± 1,7*	47,3 ± 1,5*	48,3 ± 1,6*	52,6 ± 2,5*	57,8 ± 1,3*
	PV, s	13–18	13,6 ± 1,5	20,1 ± 1,4*	21,3 ± 2,0*	21,0 ± 2,1*	22,1 ± 1,2*	21,1 ± 1,5*	21,2 ± 0,6*

* — statistically significant in relation to control ($p < 0,05$)

3.3.1.4. Association with HSA

HSA has three main ligand binding sites: (1) site I located in subdomain IIA (warfarin binding site); (2) site II located in subdomain IIIA (ibuprofen binding site); (3) Site II located in the IB subdomain (digitonin binding site). Competitive binding experiments were performed in the presence of binding site markers to identify C₇₀-Lys and C₇₀-Thr binding sites with HSA. The Scatchard equation was used to determine the binding constants (K_b) as well as the stoichiometry of the binding reaction (n):

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg Q \quad (38),$$

where F_0 is the fluorescence intensity of HSA in the absence of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr, F is the fluorescence intensity of HSA in the presence of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr, Q is the molar concentration of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr.

Fig. 48 shows HSA binding to C₇₀-Lys and C₇₀-Thr in Hill coordinates ($\lg \frac{F_0 - F}{F}$ from $\lg Q$). It can be seen that in the case of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr, the resulting dependence has an inflection point, which corresponds to the presence of two binding sites. At the same time, in the concentration range $C = 0,3 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ M, binding occurs with the first site, and in the concentration range $C = 6 \cdot 10^{-6} - 24 \cdot 10^{-6}$ M, with the second.

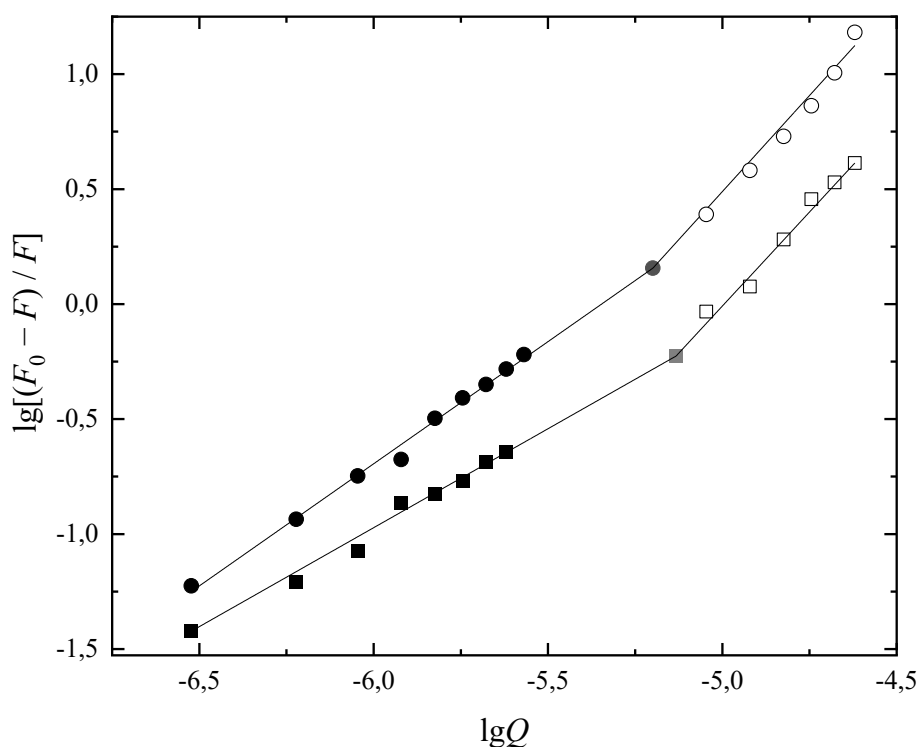


Fig. 48. Dependence of the process of HSA binding to C₇₀-Thr (■) and C₇₀-Lys (●) in Hill's coordinates: ● — the first section; ○ - second section; ● — inflection point.

Binding parameters C₇₀-Lys and C₇₀-Thr (n and $\lg K_b$) with the second FSA site were determined as the difference between the slope coefficients of the straight lines and the values of the segments cut off by the straight lines for two concentration ranges: $C = 6 \cdot 10^{-6} - 24 \cdot 10^{-6}$ M and $C = 0,3 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ M. From the obtained data (Tab. 19) it can be seen that: (1) at the concentration range of $C = 0,3 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ M for C₇₀-Thr, a decrease in $\lg K_b$ and n is observed with the addition of warfarin, for C₇₀-Lys - with the addition of digitonin; (2) in the concentration range $C = 6 \cdot 10^{-6} - 24 \cdot 10^{-6}$ M, a decrease in $\log K_b$ and n is observed for C₇₀-Thr with the addition of digitonin, and for C₇₀-Lys, with the addition of ibuprofen. Based on the values of the binding constants (Tab. 20), it can be concluded that C₇₀-Thr forms a strong complex with HSA in the IIA subdomain and binds weakly in the IB subdomain, C₇₀-Lys forms a strong complex with HSA in the IB subdomain and weakly binds in the IIIA subdomain.

Tab. 19. Logarithms of the binding constants ($\lg K_b$) and stoichiometry of the binding reaction (n) C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with HSA.

Site Marker	$C = 3 \cdot 10^{-7} - 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$				$C = 6 \cdot 10^{-6} - 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$			
	$\lg K_b, \lg M^{-1}$		n		$\lg K_b, \lg M^{-1}$		n	
	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr
W/o markers	4,26 ± 0,03	5,52 ± 0,03	0,84 ± 0,01	1,08 ± 0,06	1,93 ± 0,05	0,36 ± 0,12	0,35 ± 0,08	0,15 ± 0,02
Warfarin	4,24 ± 0,20	2,78 ± 0,07	0,89 ± 0,03	0,50 ± 0,02	2,08 ± 0,18	0,34 ± 0,13	0,37 ± 0,04	0,22 ± 0,05
Ibuprofen	4,85 ± 0,35	5,67 ± 0,11	0,97 ± 0,01	1,14 ± 0,08	1,16 ± 0,11	0,31 ± 0,07	0,22 ± 0,02	—
Digitonin	3,75 ± 0,17	5,07 ± 0,12	0,78 ± 0,02	1,05 ± 0,03	2,11 ± 0,13	0,26 ± 0,02	0,38 ± 0,05	—

Tab. 20. Binding constants (K_b) and number of binding sites (n) C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with HSA.

$T, \text{ K}$	$C = 3 \cdot 10^{-7} - 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$				$C = 6 \cdot 10^{-6} - 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$			
	$K_b \cdot 10^3, M^{-1}$		n		K_b, M^{-1}		n	
	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr	C ₇₀ -Lys	C ₇₀ -Thr
298,15	18,20 ± 0,09	331,13 ± 0,33	0,84 ± 0,01	1,08 ± 0,06	85,88 ± 20,1	6,76 ± 0,08	0,35 ± 0,02	0,15 ± 0,02
303,15	194,98 ± 3,82	14,45 ± 0,79	0,99 ± 0,06	0,83 ± 0,13	67,63 ± 13,3	385,92 ± 0,15	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,06
308,15	1412,54 ± 22,1	7,08 ± 0,23	1,14 ± 0,04	0,78 ± 0,04	51,75 ± 10,7	7815,38 ± 0,9	0,33 ± 0,02	0,25 ± 0,03
313,15	5128,61 ± 17,39	4,47 ± 0,48	1,27 ± 0,03	0,77 ± 0,08	14,57 ± 6,7	10053,1 ± 0,1	0,19 ± 0,03	0,31 ± 0,08

Changes in the enthalpy and entropy of the binding reaction of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with HSA were calculated using the van't Hoff equation, neglecting the effect of temperature (Fig. 49):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (39),$$

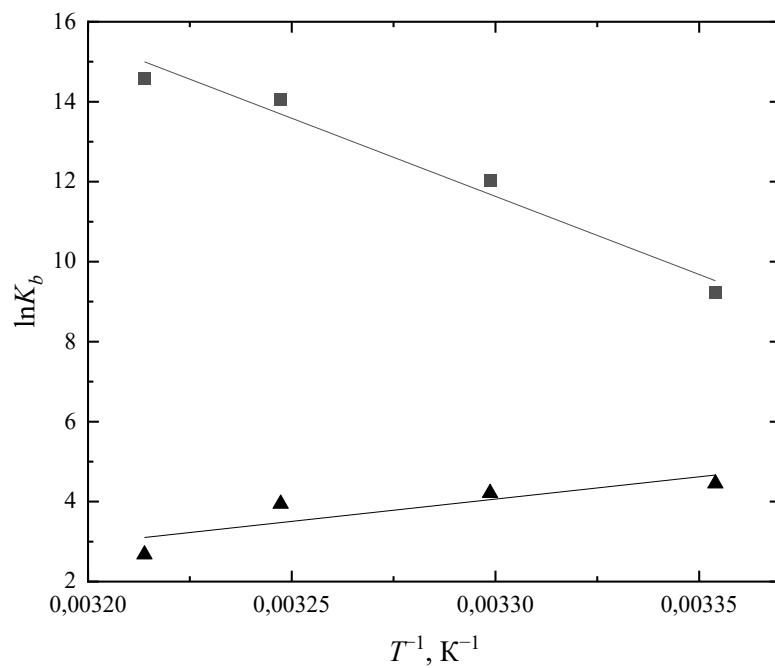
where ΔH and ΔS - is the change in the enthalpy and entropy of the binding reactions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with HSA, R is the universal gas constant, T is the absolute temperature.

Changes in the Gibbs energy (ΔG) of the binding reaction of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with HSA in the temperature range of 303,15–318,15 K were calculated using the formula:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (40).$$

Negative values of ΔG (Tab. 20) in the temperature range of 303.15–318.15 K indicate that the binding of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr to HSA is thermodynamically favorable process. In the first concentration range for C₇₀-Thr and in the second concentration range for C₇₀-Lys ΔH and ΔS have negative values, which is typical for the formation of hydrogen bonds, therefore, the binding of C₇₀-Thr in the subdomain IIA and C₇₀-Lys in subdomain IIIA with HSA occurs at the expense of amino acid residues. In the first concentration range for C₇₀-Lys and in the second concentration range for C₇₀-Thr ΔH and ΔS have positive values, which is characteristic of hydrophobic interaction, therefore, the binding of C₇₀-Thr and C₇₀-Lys subdomain IB with HSA occurs due to the fullerene core.

(a)



(b)

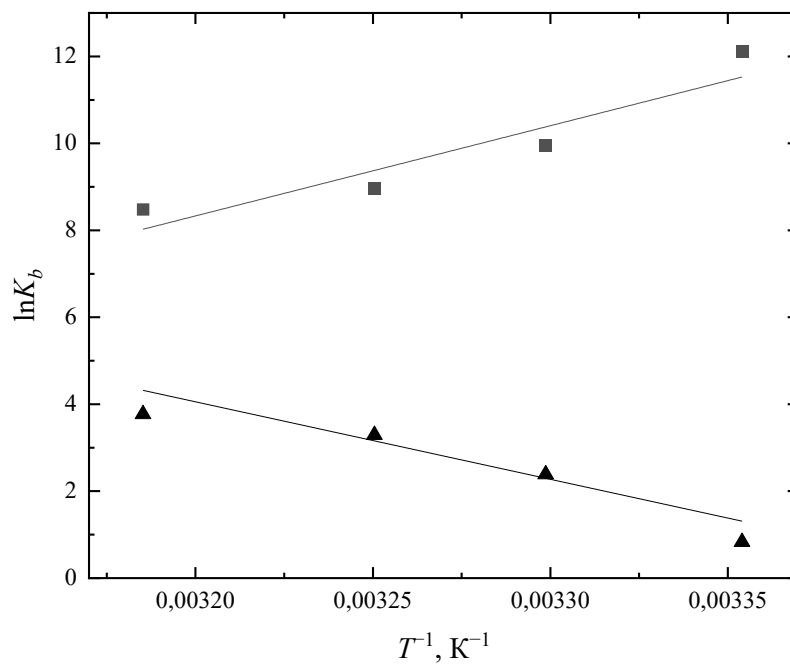


Fig. 49. Dependence $\ln K_b$ C_{70} -Lys (a) и C_{70} -Thr (b) on the inverse temperature (T^{-1}): ■ — the first section; ▲ — the second section.

Tab. 21. Thermodynamic parameters of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr binding to HSA. ΔH is the enthalpy change, ΔS is the entropy change, ΔG is the Gibbs energy change.

Adduct	<i>T</i> , K	$C = 3 \cdot 10^{-7} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ M			$C = 6 \cdot 10^{-6} - 2,4 \cdot 10^{-5}$ M		
		ΔH , kJ mol ⁻¹	ΔS , J mol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG , kJ mol ⁻¹	ΔH , kJ mol ⁻¹	ΔS , J mol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG , kJ mol ⁻¹
C ₇₀ -Lys	298,15			-23,6 ± 8,1			-11,6 ± 3,7
	303,15	324 ± 48	1168 ± 156	-29,4 ± 5,2	-92,7 ± 21	-272 ± 15	-10,2 ± 4,7
	308,15			-35,3 ± 6,1			-8,8 ± 5,7
	313,15			-41,1 ± 5,0			-7,5 ± 2,7
C ₇₀ -Thr	298,15			-28,8 ± 11,7			-3,2 ± 0,7
	303,15	-172 ± 54	-482 ± 17	-26,4 ± 8,2	148 ± 35	507 ± 11	-5,8 ± 0,5
	308,15			-24,0 ± 10,1			-8,3 ± 0,3
	313,15			-21,6 ± 11,9			-10,9 ± 2,7

3.3.1.3. Esterase activity

To determine the rate constant of NPA hydrolysis, the first order reaction equation was used:

$$\ln\left(1 - \frac{A_t - A_0}{1.86}\right) = -kt \quad (41),$$

where 1,86 is the optical density of a *p*-nitrophenol solution with a concentration of 100 μM ; A_t is the optical density of the reaction mixture at time t ; A_0 is the optical density of the reaction mixture at the initial moment of time; k is the reaction rate constant, min^{-1} ; t is the time since the beginning of the reaction, min.

To determine the rate constant (k) dependences $\ln\left(1 - \frac{A_t - A_0}{1.86}\right)$ on t were plotted. As an example in Fig. 50 shows data for the hydrolysis of NPA with albumin in the absence and presence of 24 μM C₇₀-Lys and 24 μM C₇₀-Thr.

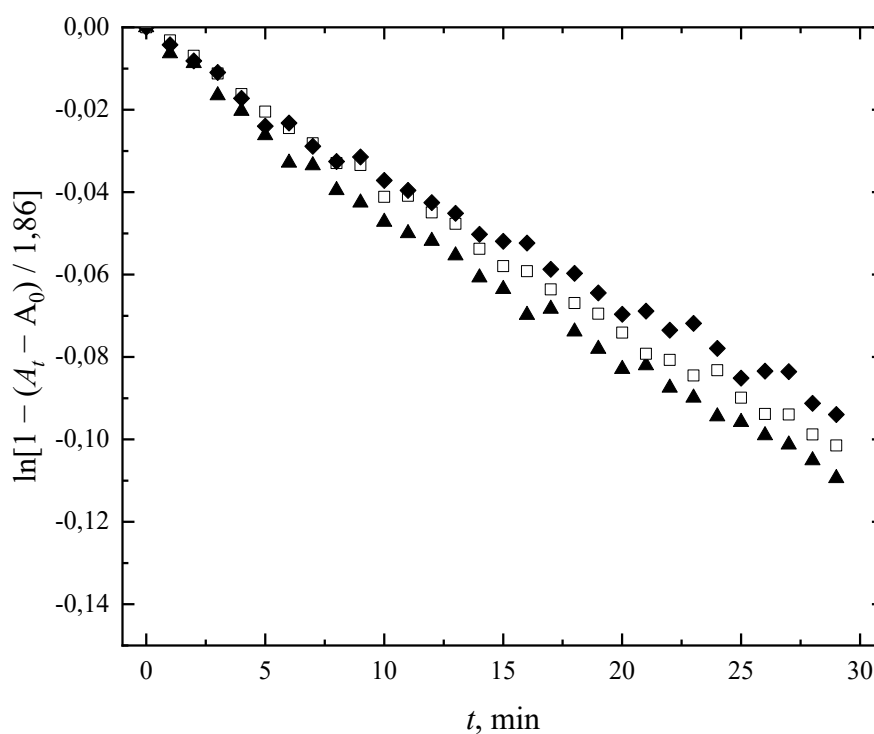


Fig. 50. Kinetic dependences $\ln\left(1 - \frac{A_t - A_0}{1.86}\right)$ of the hydrolysis reaction of NPA with albumin in the absence (▲) and in the presence of 24 μM of C₇₀-Lys (□) and 24 μM C₇₀-Thr (◆).

Then, the values of the reaction rate constants were obtained from the graphs (Fig. 51). Fig. 51 shows that C_{70} -Lys and C_{70} -Thr in the entire studied concentration range slightly reduce the esterase activity of HSA.

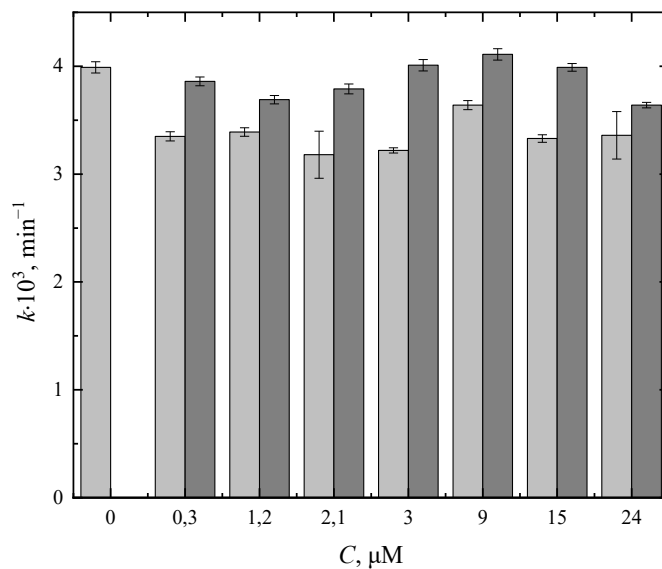


Fig. 51. Values of the rate constants of the hydrolysis reaction of NFA HSA in the absence and presence of C_{70} -Lys (light gray) and C_{70} -Thr (dark gray).

3.3.2. Antiradical activity

The reaction mechanism of DPPH with C_{70} fullerene amino acid adducts includes two stages: the fast stage is the transfer of hydrogen from the amino acid residue to the DPPH radical; the slow stage is the nucleophilic attack of the radical on the C=C bond of the fullerene core. The proposed reaction mechanism for the example of the C_{70} -Thr adduct is shown in Fig. 52.

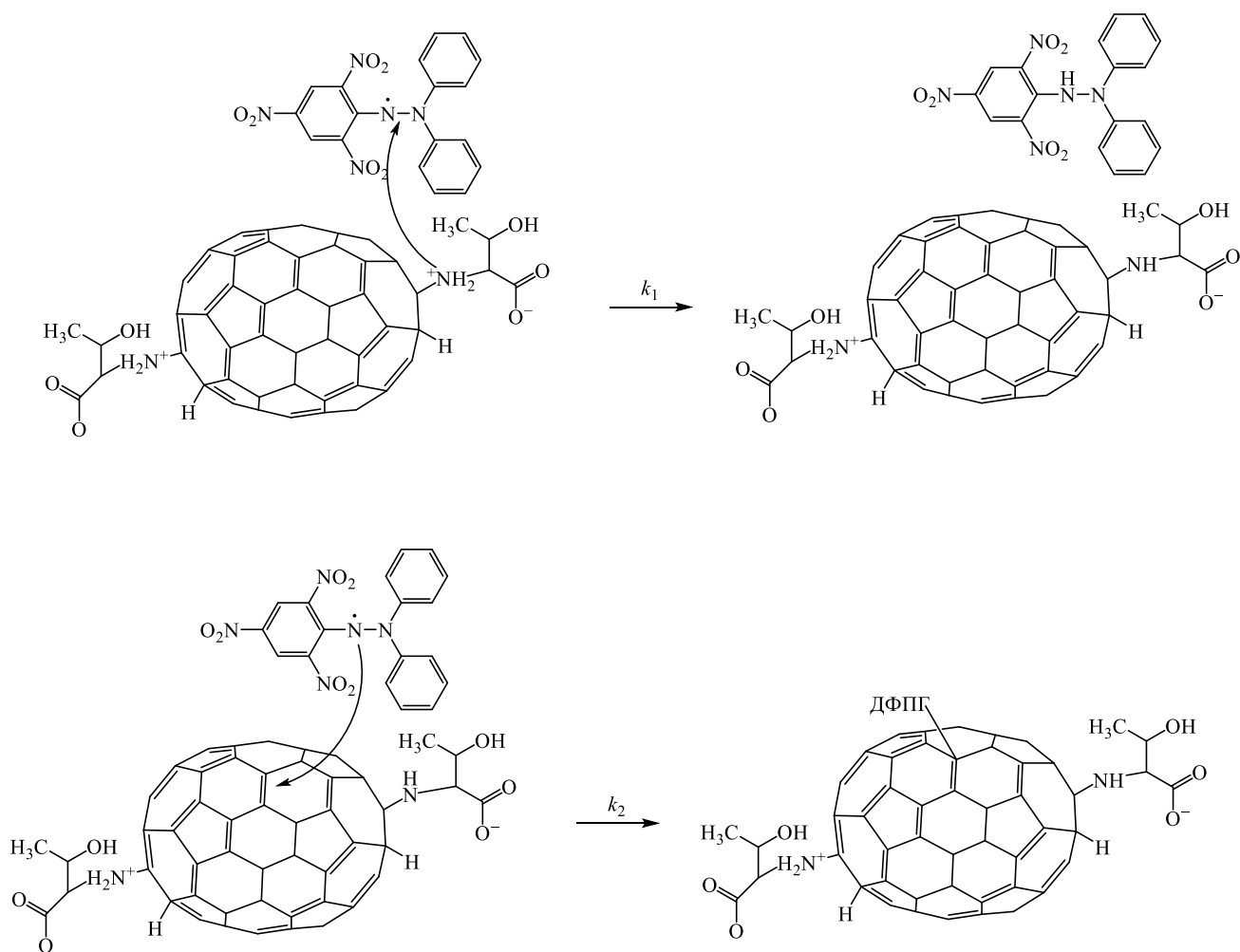


Fig. 52. Proposed mechanism of interaction of the C₇₀-Thr adduct with DPPH.

To quantify the rate of the reaction between the fullerene adduct and DPPH, a two-stage pseudo-first-order kinetic model was used, represented by the equation:

$$\ln \frac{(A_{\infty} - A_t)}{(A_{\infty} - A_0)} = -kt \quad (42),$$

where A_{∞} , A_t , A_0 are the optical densities of the solution after "infinity" (six days after the start of the experiment), at time t and at the initial time, respectively. The time dependence

$\ln \frac{(A_{\infty} - A_t)}{(A_{\infty} - A_0)}$ is shown in Fig. 53.

Apparent rate constants were calculated from the slopes of the two segments of the kinetic curves (Tab. 22). It can be seen that the C₇₀-Lys adduct has a higher antiradical activity than C₇₀-Thr. An analysis of the literature [170,171] showed that the values of the rate constants of the first and second stages are comparable with other fullerene adducts.

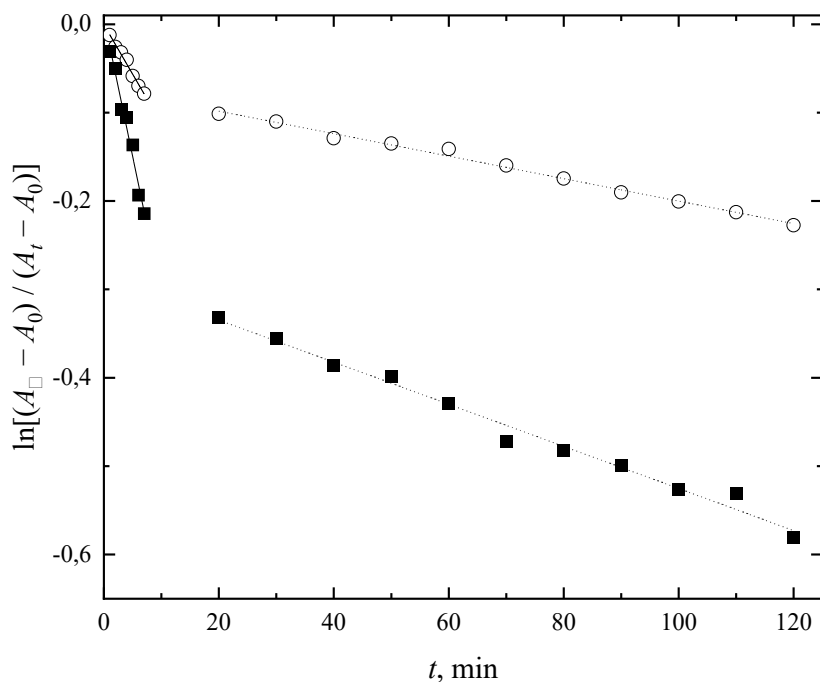


Fig. 53. Kinetic dependence of DPPH reduction with adducts C₇₀-Lys (■) and C₇₀-Thr (○) at a temperature of 298,15 K.

Tab. 22. Rate constants of DPPH reduction by C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts in comparison with literature data.

Substance	k_1, min^{-1}	k_2, min^{-1}
C ₇₀ -Lys	$0,0313 \pm 0,0021$	$0,00238 \pm 0,00009$
C ₇₀ -Thr	$0,0112 \pm 0,0006$	$0,00127 \pm 0,00004$
C ₆₀ -Gly [171]	0,0352	0,00112
C ₆₀ -Hyp [171]	0,0835	0,00131
C ₆₀ -Met [171]	0,0301	0,00112
C ₆₀ -Cys [171]	0,0931	0,00105
C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₃ [171]	0,0311	0,00100
C ₆₀ (OH) ₃₀ [170]	0,0063	0,0014
C ₆₀ ($C = 100 \text{ mM}$) [170]	-	0,0007

3.3.3. Proliferation and cytotoxicity

3.3.3.1. Proliferation

Analysis of the obtained data showed that in the studied concentration range ($C = 0.1$ – $100 \mu\text{M}$) the adduct C_{70} -Lys causes a greater decrease in the proliferative activity of HEK293 cells compared to C_{70} -Thr (Fig. 54).

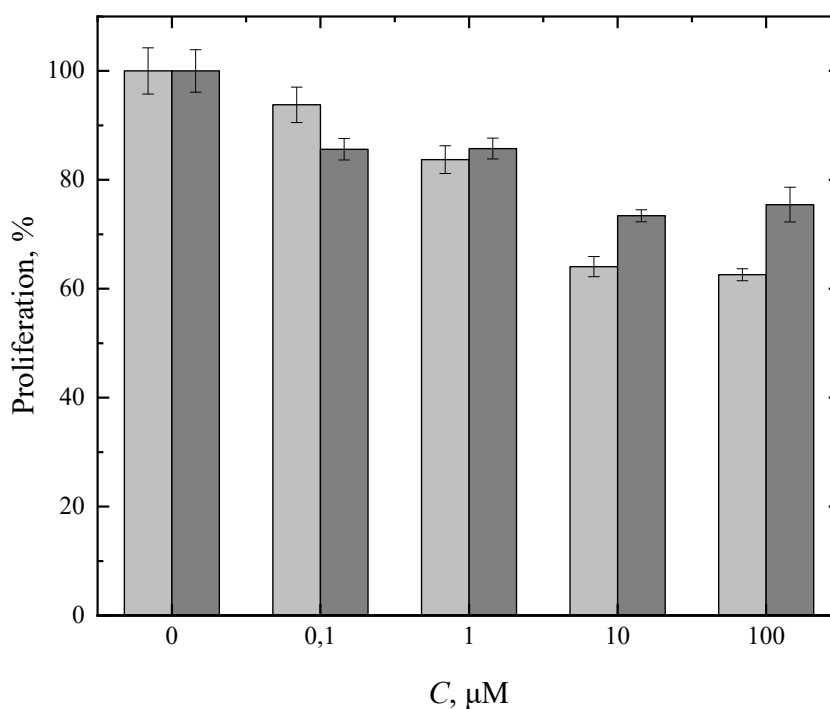


Fig. 54. Dependence of cell proliferation on the concentration of C_{70} -Lys (light gray) and C_{70} -Thr (dark gray).

3.3.3.2. Cytotoxicity

The cytotoxic effect of C_{70} -Lys and C_{70} -Thr adducts ($C = 0,1$ – $100 \mu\text{M}$) on HEK293 cells was measured using the MTT reagent, which is used to assess the metabolic activity of cells. NADP-H-dependent oxidoreductase enzymes that react with the MTT reagent reflect the number of viable cells under the action of a cytotoxic agent (Fig. 55). Combined with the proliferation data (Fig. 54), it can be concluded that C_{70} -Thr is a less toxic adduct compared to C_{70} -Lys for the HEK293 cell line.

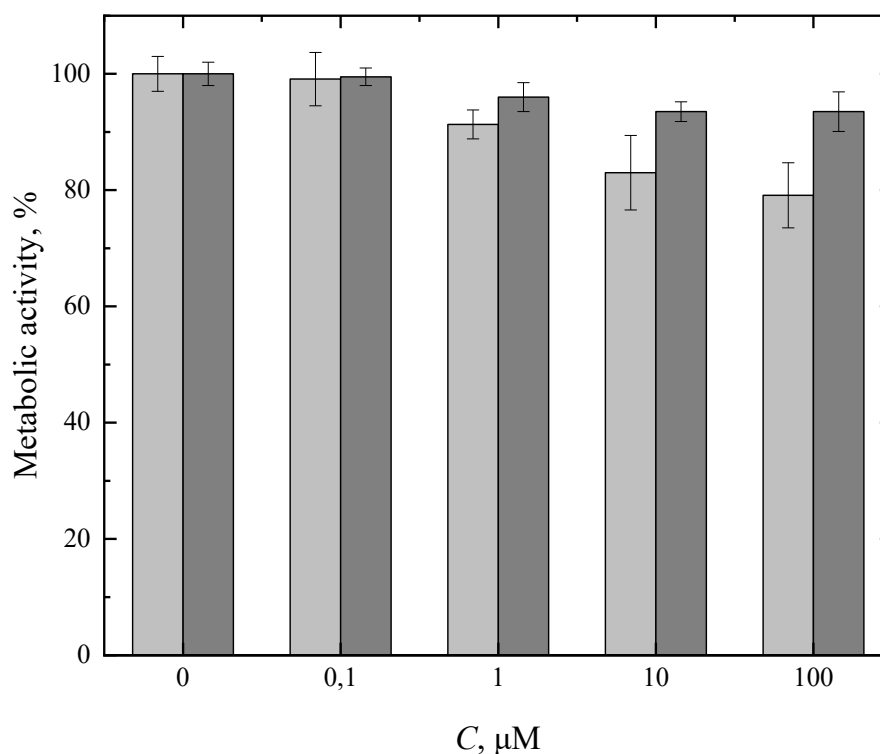


Fig. 55. Dependence of the metabolic activity of cells on the concentration of C₇₀-Lys (light gray) and C₇₀-Thr (dark gray).

3.3.4. Interaction on DNA

3.3.4.1. Binding to DNA

The absorption spectra of DNA in the presence of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr are shown in Fig. 56.

To study the C₇₀-Lys and C₇₀-Thr binding to DNA, the method of electron absorption spectroscopy was used. From Fig. 56 it can be seen that a strong hyperchromic effect is observed when C₇₀-Lys and C₇₀-Thr are added to DNA (Fig. 57), while there is no noticeable change in the DNA absorption band. Hyperchromism is explained by the presence of non-covalent interactions of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with DNA: external contact due to the formation of hydrogen bonds and binding on the surface of grooves outside the DNA helix. The absence of bathochromic or hypsochromic shifts indicates that there is a groove binding of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts to DNA.

The binding constant (K_b) was calculated using the Wolfe-Shimmer equation:

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (43),$$

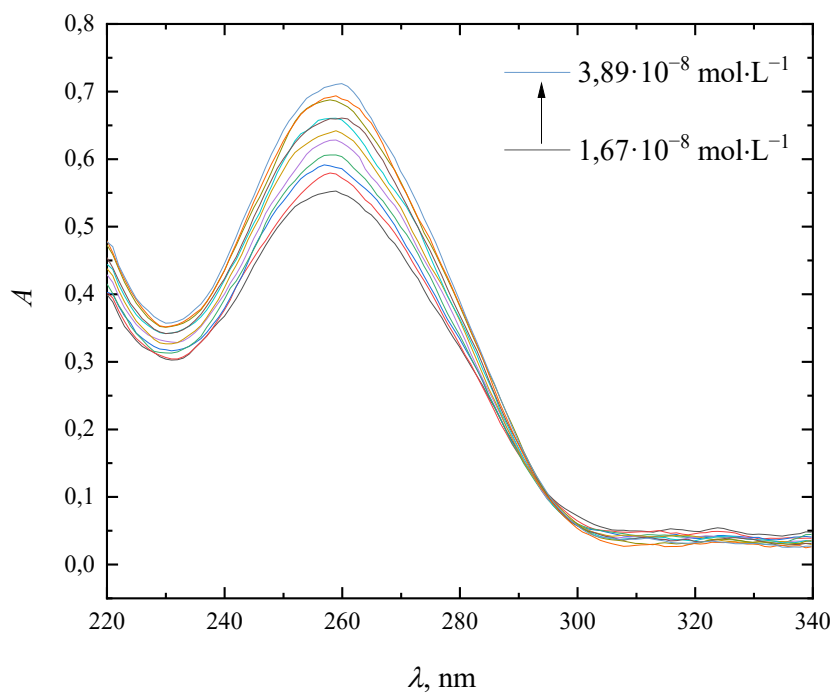
where [DNA] is the concentration of DNA, ε_a , ε_f , ε_b are the apparent extinction coefficient, the extinction coefficient for adducts, and the extinction coefficient for adducts in bound form, respectively. The value of ε_f for C₇₀-Lys is $10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, for C₇₀-Thr it is $3\cdot 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

The binding constant (K_b) was obtained from the relationship $[\text{DNA}] / (\varepsilon_a - \varepsilon_f) - [\text{DNA}]$ (Fig. 58). Next, the values of the changes in the Gibbs energy of the interaction of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with DNA were calculated using Eq. 44:

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (44).$$

The value of the binding constants and changes in the Gibbs energy of the interaction of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with DNA are presented in Tab. 23.

(a)



(b)

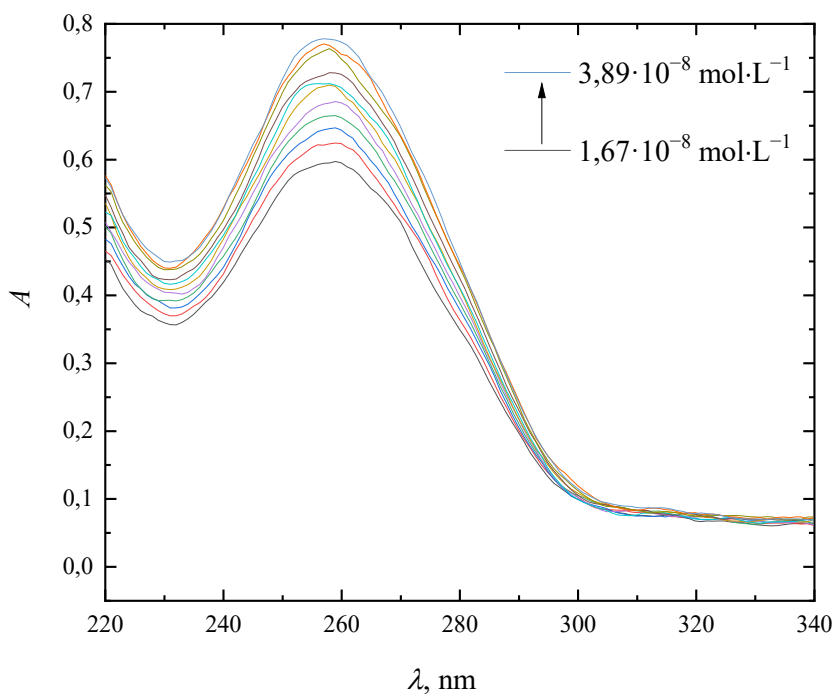


Fig. 56. Absorption spectra of DNA ($C = 1,67 \cdot 10^{-8} - 3,89 \cdot 10^{-8}$ M) in the presence of C₇₀-Lys (a) and C₇₀-Thr (b) ($C = 4 \cdot 10^{-8}$ M).

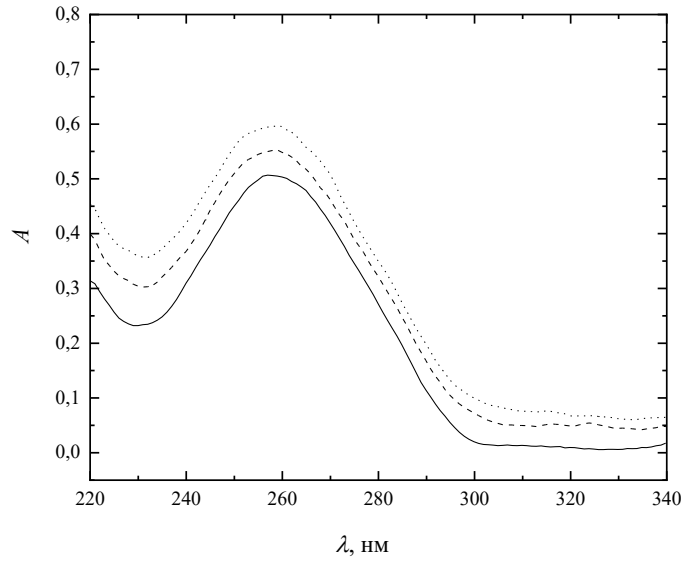


Fig. 57. Absorption spectra of solutions: $1,67 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA (-); $1,67 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA in the presence of $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C₇₀-Lys (- -); $1,67 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA in the presence of $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C₇₀-Thr (· · · ·).

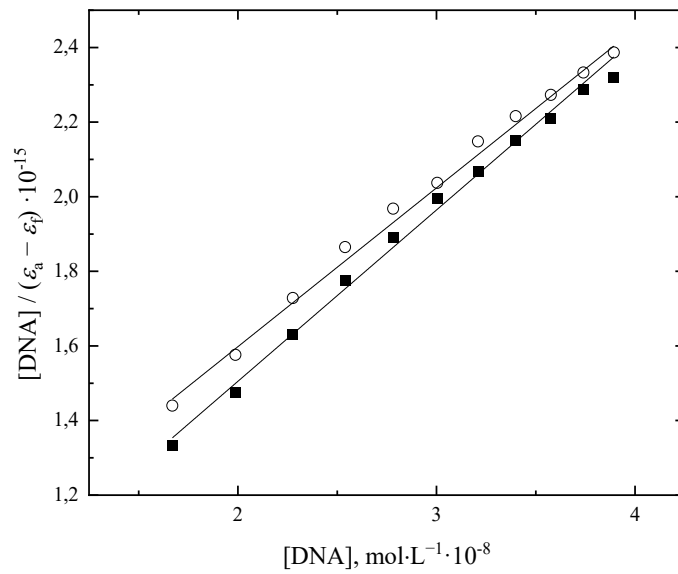


Fig. 58. Dependence of $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ on $[\text{DNA}]$ interaction of C₇₀-Lys (■) and C₇₀-Thr (○) with DNA.

Tab. 2 3. Values of binding constants (K_b) and changes in the Gibbs energy of the interaction of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr with DNA.

Substance	$K_b \cdot 10^7, \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta G, \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
C ₇₀ -Lys	$7,83 \pm 0,74$	$-45,1 \pm 4,0$
C ₇₀ -Thr	$5,70 \pm 0,49$	$-44,3 \pm 3,8$

3.3.4.2. Genotoxicity

Average values of % tail DNA, tail length and tail moment observed from human PBMC in the presence of H₂O₂ (100 μM, positive control) and adducts C₇₀-Lys and C₇₀-Thr are presented in Tab. 23. The amount of DNA damage in human PBMCs in the presence of H₂O₂ is significantly greater than in control cells (negative control). C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts at the highest concentration studied (100 μM) showed a low difference in % tail DNA, tail length and tail moment compared to control. The results show that C₇₀-Lys and C₇₀-Thr dose-dependently damage human PBMC DNA. As an example, Fig. 50 shows photographs of DNA comets in the presence of H₂O₂ (positive control), PBS (negative control) and C₇₀-Thr.

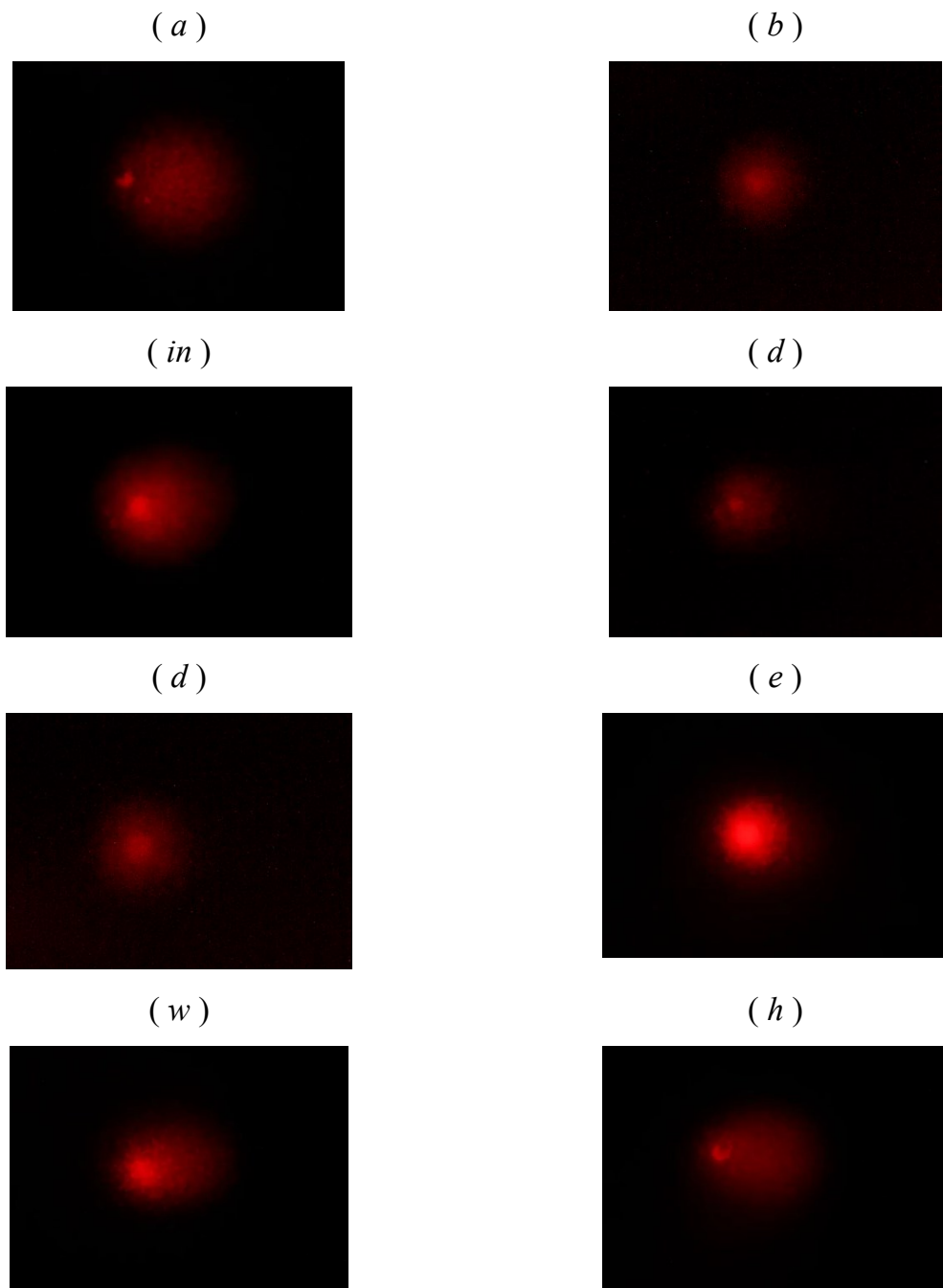


Fig. 59. DNA comets after cell electrophoresis in microgel: (a) positive control (H_2O_2), (b) negative control (PBS), (c – h) - C_{70} -Thr ($C = 1-100 \mu M$).

Tab. 24. Effect of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adduct on % tail DNA, tail length and tail moment.

Characteristic under study	Negative control (PBS)	Positive control (H ₂ O ₂ , 100 μM)	Концентрация, μM				
			1,0	5,0	10,0	25,0	100,0
C ₇₀ -Lys							
DNA tail, %	25,46 ± 2,74	155,87 ± 5,22	23,44 ± 2,37	29,56 ± 3,11	47,93 ± 4,23	60,74 ± 5,26	83,77 ± 13,56
Tail length	90,41 ± 14,11	189,56 ± 23,73	94,59 ± 11,28	101,13 ± 17,66	134,19 ± 19,01	157,7 ± 24,34	177,2 ± 25,6
Tail moment	23,02 ± 0,39	295,47 ± 1,24	22,17 ± 0,27	29,89 ± 0,55	64,32 ± 0,80	95,79 ± 1,28	148,44 ± 3,47
C ₇₀ -Thr							
DNA tail, %	14,39 ± 2,74	75,64 ± 5,22	10,34 ± 2,24	17,73 ± 2,85	15,64 ± 2,86	24,23 ± 4,40	42,87 ± 11,92
Tail length	70,29 ± 13,20	117,31 ± 36,94	71,57 ± 10,33	80,87 ± 15,24	95,51 ± 4,08	105,7 ± 16,12	157,9 ± 21,0
Tail moment	10,11 ± 0,36	88,73 ± 1,93	7,40 ± 0,23	14,34 ± 0,43	14,94 ± 0,12	25,61 ± 0,71	67,67 ± 2,50

Main results and conclusions

1. Scalable single-stage synthesis procedures with a yield of more than 85% for water-soluble C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine have been developed. The obtained compounds were identified using a complex of physicochemical methods of analysis: ¹³C NMR, IR, UV spectroscopy, thermogravimetric analysis, elemental analysis and HPLC.
2. A physicochemical study of C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine was carried out: densities, viscosities, refractive indices, electrical conductivity, surface properties, excess thermodynamic functions, nanoparticle size distribution, and ζ-potentials were studied. It was found that C₇₀ fullerene adducts with L-lysine and L-threonine have large negative values of partial molar volumes in aqueous solutions, which indicates a strong structuring of solutions. It has been determined that aqueous solutions of fullerene derivatives are associated. The size of associates varies from 30 nm to 6 μm depending on the concentration. Fulfillment of the rule of additivity of specific and molar refractions of aqueous solutions of substances is established. The values of dissociation constants demonstrate that the studied adducts are weak electrolytes.
3. Using the VD - AS model, the concentration of adducts corresponding to the loss of stability against phase separation by C₇₀-Lys and C₇₀-Thr aqueous solutions of ($x_{C_{70}\text{-Lys}}^{\text{inst.}} = 6,0 \cdot 10^{-5}$ and $x_{C_{70}\text{-Thr}}^{\text{inst.}} = 4,7 \cdot 10^{-5}$) was determined.
4. Interaction of C₇₀ fullerene adducts with the stable DPPH radical was studied. The reaction rate constants obtained for the constants showed that the adducts under study have antiradical activity, which is comparable to such water-soluble C₆₀ fullerene adducts as fullerenols, carboxylated fullerenes, and C₆₀ derivatives with L-amino acids.
5. C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts biocompatibility was studied, namely: haemocompatibility (spontaneous haemolysis, platelet aggregation, plasma coagulation haemostasis, binding to human serum albumin and its esterase activity), effect on cell lines (cytotoxicity, proliferation), as well as effects on DNA (binding to DNA and genotoxicity). It has been shown that the synthesized adducts have antiaggregant and anticoagulant activity; experiments on the binding of C₇₀ adducts with human serum albumin indicate that the values of affinity constants are optimal for the transport function of albumin in the bloodstream: C₇₀-Thr forms a strong complex in the IIA subdomain and weakly binds to the IB subdomain ; C₇₀-Lys forms a strong complex with the IB subdomain and weakly binds to the IIIA subdomain. Moderate cyto- and genotoxicity of adducts C₇₀-Lys and C₇₀-Thr were demonstrated.

Acknowledgments

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 organizing scientific work at the department and discussing the results obtained.

Identification and physicochemical study of C₇₀-Lys and C₇₀-Thr adducts were carried out using the equipment of the resource centers "Innovative technologies of composite nanomaterials", "Magnetic resonance research methods", "Chemical analysis and materials research centre", Interdisciplinary resource center in the direction "Nanotechnologies", "Thermogravimetric and calorimetric research methods", "Center for Diagnostics of Functional Materials for Medicine, Pharmacology and Nanoelectronics" of the Research 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 St. Petersburg State Medical University acad. I. P. Pavlova.

List of cited literature

- [1] V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, N.E. Podolsky, 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>.
- [2] E.I. Pochkaeva, N.E. Podolsky, 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, *Progress in Solid State Chemistry.* 57 (2020) 100255. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2019.100255>.
- [3] A. V. Elets'kii, B.M. Smirnov, Fullerenes and carbon structures, *Physics-Uspekhi.* 38 (1995) 935–964. <https://doi.org/10.1070/PU1995V038N09ABEH000103>.
- [4] Z.Z. Latypov, L.N. Gall, FULLERENES AND CARBON NANOCCLUSERS, *Scientific Instrumentation.* 15 (2005) 82–87.
- [5] 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, *Progress in Solid State Chemistry.* 44 (2016) 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.04.002>.
- [6] 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, *Progress in Solid State Chemistry.* 47–48 (2017) 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2017.09.001>.
- [7] V.N. Bezmel'nitsyn, A. V. Elets'kii, M. V. Okun', Fullerenes in solutions, *Physics-Uspekhi.* 41 (1998) 1091–1114. <https://doi.org/10.1070/PU1998V041N11ABEH000502>.
- [8] D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama, F. Shahidi, *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*, Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences. (2013). <https://doi.org/10.1002/9781118451915>.
- [9] K. Matsubayashi, K. Kokubo, H. Tategaki, S. Kawahama, T. Oshima, One-step Synthesis of Water-soluble Fullerenols Bearing Nitrogen-containing Substituents, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 17 (2009) 440–456. <https://doi.org/10.1080/01490450903039263>.
- [10] X.L. Yang, C.H. Fan, H.S. Zhu, Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C60]fullerene derivatives and its mechanism, *Toxicology in Vitro.* 16 (2002) 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00102-3).

- [11] 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 Khimioter.* 49 (2004) 13–20.
- [12] 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>.
- [13] R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, J.A. Castoro, C. Wilkins, S.H. Friedman, D.L. DeCamp, G.L. Kenyon, Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes, *J Am Chem Soc.* 115 (1993) 6510–6512. <https://doi.org/10.1021/ja00068a006>.
- [14] 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>.
- [15] 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, *The Journal of Medicinal Chemistry.* 42 (1999) 4614–4620. <https://doi.org/10.1021/jm990144s>.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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>.
- [19] B. Vilenı, 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>.
- [20] 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, *Physics of the Solid State.* 44 (2002) 683–685. <https://doi.org/10.1134/1.1470559>.
- [21] L.B. Piotrovskii, Fullerenes in the drug design, *Nanotechnol Russ.* 4 (2009) 541–555. <https://doi.org/10.1134/S1995078009090018>.

- [22] R.A. Kotelnikova, A.I. Kotelnikov, G.N. Bogdanov, V.S. Romanova, E.F. Kuleshova, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin, Membranotropic properties of the water soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene C₆₀, *FEBS Lett.* 389 (1996) 111–114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00537-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00537-6).
- [23] K. Hedberg, L. Hedberg, D.S. Bethune, C.A. Brown, H.C. Dorn, R.D. Johnson, M. De Vries, Bond lengths in free molecules of buckminsterfullerene, C₆₀, from gas-phase electron diffraction, *Science* (1979). 254 (1991) 410–412. <https://doi.org/10.1126/science.254.5030.410>.
- [24] J.M. Hawkins, A. Meyer, T.A. Lewis, S. Loren, F.J. Hollander, Crystal structure of osmylated C₆₀: Confirmation of the soccer ball framework, *Science* (1979). 252 (1991) 312–313. <https://doi.org/10.1126/science.252.5003.312>.
- [25] J.M. Schulman, R.L. Disch, M.A. Miller, R.C. Peck, Symmetrical clusters of carbon atoms: The C₂₄ and C₆₀ molecules, *Chem Phys Lett.* 141 (1987) 45–48. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(87\)80089-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(87)80089-1).
- [26] K. Raghavachari, C.M. Rohlfing, Imperfect fullerene structures: Isomers of C₆₀, *J Phys Chem.* 96 (1992) 2463–2466. <https://doi.org/10.1021/j100185a014>.
- [27] P.A. Troshin, R.N. Lyubovskaya, Organic chemistry of fullerenes: the major reactions, types of fullerene derivatives and prospects for practical use, *Russian Chemical Reviews.* 77 (2008) 323–369. <https://doi.org/10.1070/RC2008v077n04ABEH003770>.
- [28] 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).
- [29] D.R. McKenzie, C.A. Davis, D.J.H. Cockayne, D.A. Muller, A.M. Vassallo, The structure of the C₇₀ molecule, *Nature* 1992 355:6361. 355 (1992) 622–624. <https://doi.org/10.1038/355622a0>.
- [30] H. Li, H. Zhang, The isolated-pentagon rule and nice substructures in fullerenes, *Ars Mathematica Contemporanea.* 15 (2018) 487–497. <https://doi.org/10.26493/1855-3974.1359.b33>.
- [31] P.W. Fowler, Carbon cylinders: A class of closed-shell clusters, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions.* 86 (1990) 2073. <https://doi.org/10.1039/ft9908602073>.
- [32] T.G. Schmalz, W.A. Seitz, D.J. Klein, G.E. Hite, Elemental carbon cages, *J Am Chem Soc.* 110 (1988) 1113–1127. <https://doi.org/10.1021/ja00212a020>.

- [33] A. Hirsch, Q. Li, F. Wudl, Globe-trotting hydrogens on the surface of the fullerene compound $C_{60}H_6(N(CH_2CH_2)_2O)_6$, *Angewandte Chemie International Edition in English*. 30 (1991) 1309–1310. <https://doi.org/10.1002/anie.199113091>.
- [34] Z. Hu, C. Zhang, Y. Huang, S. Sun, W. Guan, Y. Yao, Photodynamic anticancer activities of water-soluble C_{60} 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>.
- [35] V.S. Romanova, V.A. Tsyryapkin, Yu.I. Lyakhovetskii, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin, ChemInform Abstract: Addition of Amino Acids and Dipeptides (I) to Fullerene C_{60} Giving Rise to Monoadducts., *ChemInform*. 26 (2010) no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.199506117>.
- [36] Z. Li, L.-L. Pan, F.-L. Zhang, Z. Wang, Y.-Y. Shen, Z.-Z. Zhang, Preparation and Characterization of Fullerene (C_{60}) Amino Acid Nanoparticles for Liver Cancer Cell Treatment, *J Nanosci Nanotechnol*. 14 (2014) 4513–4518. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8242>.
- [37] Z. Hu, S. Liu, Y. Wei, E. Tong, F. Cao, W. Guan, Synthesis of glutathione C_{60} derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells, *Neurosci Lett*. 429 (2007) 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.09.063>.
- [38] Z. Hu, W. Guan, W. Wang, L. Huang, X. Tang, H. Xu, Z. Zhu, X. Xie, H. Xing, Synthesis of amphiphilic amino acid C_{60} derivatives and their protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells, *Carbon N Y*. 46 (2008) 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.10.041>.
- [39] Z. Hu, W. Guan, W. Wang, L. Huang, H. Xing, Z. Zhu, Synthesis of β -alanine C_{60} derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells, *Cell Biol Int*. 31 (2007) 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.01.013>.
- [40] Z. Hu, Y. Huang, W. Guan, J. Zhang, F. Wang, L. Zhao, The protective activities of water-soluble C_{60} derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells, *Biomaterials*. 31 (2010) 8872–8881. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.025>.
- [41] M.E. Vol'pin, Z.N. Parnes, V.S. Romanova, Amino acid and peptide derivatives of fullerene, *Russian Chemical Bulletin*. 47 (1998) 1021–1025. <https://doi.org/10.1007/BF02498177>.
- [42] R.A. Kotelnikova, G.N. Bogdanov, E.C. Frog, A.I. Kotelnikov, V.N. Shtolko, V.S. Romanova, S.M. Andreev, A.A. Kushch, N.E. Fedorova, A.A. Medzhidova, G.G. Miller, Nanobionics of Pharmacologically Active Derivatives of Fullerene C_{60} , *Journal of Nanoparticle Research*. 5 (2003) 561–566. <https://doi.org/10.1023/B:NANO.0000006070.61144.93>.

- [43] R.A. Kotel'nikova, I.I. Faingol'd, D.A. Poletaeva, D. V. Mishchenko, V.S. Romanova, V.N. Shtol'ko, G.N. Bogdanov, A.Yu. Rybkin, E.S. Frog, A. V. Smolina, A.A. Kushch, N.E. Fedorova, A.I. Kotel'nikov, Antioxidant properties of water-soluble amino acid derivatives of fullerenes and their role in the inhibition of herpes virus infection, *Russian Chemical Bulletin*. 60 (2011) 1172–1176. <https://doi.org/10.1007/s11172-011-0184-x>.
- [44] E.M. Belavtseva, E. V. Kichenko, V.S. Romanova, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin, Investigation of structures of micelles of a fullerene derivative of alanine in aqueous solutions by tunneling scanning microscopy, *Russian Chemical Bulletin*. 45 (1996) 831–833. <https://doi.org/10.1007/BF01431307/METRICS>.
- [45] 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>.
- [46] Sh.Kh. Khalikov, D. Sharipova, S.Z. Zafarov, M. Umarchon, S. V. Alieva, Synthesis and characterization of fullero-C₆₀ α -amino acids with antiviral properties, *Chem Nat Compd*. 53 (2017) 121–127. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-1924-4>.
- [47] L.D. Rasnetsov, Hydrated n-fullerene-amino acid derivatives, method for preparing them and based pharmaceutical compositions, RU2458046C1, 2012.
- [48] A.B. Kornev, E.A. Khakina, S.I. Troyanov, A.A. Kushch, A. Peregudov, A. Vasilchenko, D.G. Deryabin, V.M. Martynenko, P.A. Troshin, Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60]fullerene using chlorofullerene C₆₀Cl₆ as a precursor, *Chemical Communications*. 48 (2012) 5461–5463. <https://doi.org/10.1039/C2CC00071G>.
- [49] 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>.
- [50] M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato, Addition of azomethine ylides to C₆₀: Synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines, *J Am Chem Soc*. 115 (1993) 9798–9799. <https://doi.org/10.1021/ja00074a056>.
- [51] L.A. Watanabe, M.P.I. Bhuiyan, B. Jose, T. Kato, N. Nishino, Synthesis of novel fullerene amino acids and their multifullerene peptides, *Tetrahedron Lett*. 45 (2004) 7137–7140. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2004.07.088>.

- [52] J. Zhang, L. Yuan, Y.D. Zhang, Synthesis of fullerene-acid conjugates, *Adv Mat Res.* 463–464 (2012) 538–542. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.463-464.538>.
- [53] P. Minois, J. Bayardon, R. Meunier-Prest, S. Jugé, [60] Fullerene l-amino acids and peptides: Synthesis under phase-transfer catalysis using a phosphine-borane linker. Electrochemical behavior, *J Org Chem.* 82 (2017) 11358–11369. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01737>.
- [54] B. V. Lebedev, K.B. Zhogova, T.A. Bykova, B.S. Keverin, V.L. Karnatsevick, M.A. Lopatin, Thermodynamics of C₆₀ fullerene in the 0-340 K range, *Russian Chemical Bulletin.* 45 (1996) 2113–2117. <https://doi.org/10.1007/BF01430721/METRICS>.
- [55] J. de Bruijn, A. Dworkin, H. Szwarc, J. Godard, R. Céolin, C. Fabre, A. Rassat, Thermodynamic properties of a single crystal of fullerene C₆₀: A DSC study, *Europhysics Letters (EPL).* 24 (1993) 551–556. <https://doi.org/10.1209/0295-5075/24/7/008>.
- [56] 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 C₇₀, *Fullerene Science and Technology.* 1 (1993) 101–109. <https://doi.org/10.1080/15363839308015519>.
- [57] 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, *Physica 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).
- [58] 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>.
- [59] 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).
- [60] V. V. Diky, G.Y. Kabo, Thermodynamic properties of C₆₀ and C₇₀ fullerenes, *Usp Khim.* 69 (2000) 107–117. <https://doi.org/10.1070/RC2000V069N02ABEH000535/XML>.
- [61] K.B. Zhogova, B. V. Lebedev, Thermodynamics of C₇₀ fullerene in the 0-390 K temperature range, *Russian Chemical Bulletin.* 47 (1998) 625–628. <https://doi.org/10.1007/BF02495966/METRICS>.
- [62] H.P. Diogo, M.E. Minas Da Piedade, A.D. Darwish, T.J.S. Dennis, Enthalpy of formation of C₇₀, *Journal of Physics and Chemistry of 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).

- [63] 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>.
- [64] 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>.
- [65] 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>.
- [66] 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/METRICS>.
- [67] G. Gigli, G. Balducci, V.Yu. 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>.
- [68] 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>.
- [69] M. V. Korobov, L.N. Sidorov, Thermodynamic properties of fullerenes, *J Chem Thermodyn.* 26 (1994) 61–73. <https://doi.org/10.1006/JCHT.1994.1021>.
- [70] V.P. Kolesov, S.M. Pimenova, V.K. Pavlovich, N.B. Tamm, A.A. Kurskaya, Enthalpies of combustion and formation of fullerene C_{60} , *J Chem Thermodyn.* 28 (1996) 1121–1125. <https://doi.org/10.1006/JCHT.1996.0098>.
- [71] S.M. Pimenova, S. V. Melkhanova, V.P. Kolesov, Thermochemical determination of the enthalpies of combustion and formation of fullerene C_{70} , *J Chem Thermodyn.* 35 (2003) 189–193. [https://doi.org/10.1016/S0021-9614\(02\)00350-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9614(02)00350-6).
- [72] A. Rojas-Aguilar, Enthalpies of combustion and formation of fullerene C_{70} by isoperibolic combustion calorimetry, *J Chem Thermodyn.* 36 (2004) 519–523. <https://doi.org/10.1016/J.JCT.2004.03.008>.

- [73] 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) 105898. <https://doi.org/10.1016/J.JCT.2019.105898>.
- [74] 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/SUPPL_FILE/IE8B01075_SI_001.PDF.
- [75] 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>.
- [76] 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>.
- [77] 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>.
- [78] N. Ahmadian, M.D. Ganji, G. Valizadeh, Theoretical Investigation of the Interaction Between Al-Decorated C_{60} ; Fullerene and Glycine Amino Acid: Density Functional Calculations, *J Comput Theor Nanosci.* 9 (2012) 884–888. <https://doi.org/10.1166/jctn.2012.2111>.
- [79] N.A. Andreeva, V. V. Chaban, Electronic and thermodynamic properties of the amino- and carboxamido-functionalized C_{60} -based fullerenes: Towards non-volatile carbon dioxide scavengers, *J Chem Thermodyn.* 116 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.08.019>.
- [80] V.A. Basiuk, E. González-Luciano, Noncovalent interactions of amino acids with fullerene C_{60} : A dispersion-corrected DFT study, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 24 (2016) 371–379. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2016.1163687>.
- [81] T.Yu. Dolinina, V.B. Luzhkov, Quantum chemical calculations of the molecular structures of hybrid amino acid derivatives of fullerene C_{60} , *Russian Chemical Bulletin.* 61 (2012) 1631–1634. <https://doi.org/10.1007/s11172-012-0218-z>.

- [82] M.D. Ganji, H. Yazdani, Interaction between B-Doped C₆₀ Fullerene and Glycine Amino Acid from First-Principles Simulation, *Chinese Physics Letters*. 27 (2010) 043102. <https://doi.org/10.1088/0256-307X/27/4/043102>.
- [83] A.F. Jalbout, Ameliorating the formation of fullerene complexes with amino acids: a theoretical study, *Int J Mod Phys B*. 25 (2011) 4667–4678. <https://doi.org/10.1142/S0217979211039975>.
- [84] B. Lal, Computational study of enantioselective interaction between C₆₀ fullerene and its derivatives with L-histidine, *J Mol Model*. 13 (2007) 531–536. <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0179-6>.
- [85] V.B. Luzhkov, V.S. Romanova, A.I. Kotelnikov, Quantum chemical calculations of the dissociation constants pK_a for L-Ala-C₆₀H (an amino acid derivative of fullerene) in water, *Russian Chemical Bulletin*. 63 (2014) 567–571. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0474-1>.
- [86] Vladimir A. Basiuk, M. Bassiuk, Interaction of Short Homopeptides of Glycine and L-Alanine with Fullerene C₆₀, *J Comput Theor Nanosci*. 8 (2011) 243–252. <https://doi.org/10.1166/jctn.2011.1685>.
- [87] F. Naderi, S. Rostamian, B. Naderi, A study on the electronic and structural properties of fullerene C₃₆ and its interaction with amino acid, *International Journal of Physical Sciences*. 7 (2012) 2006–2009. <https://doi.org/10.5897/IJPS11.1349>.
- [88] C. MacIel, E.E. Fileti, R. Rivelino, Assessing the solvation mechanism of C₆₀(OH)₂₄ in aqueous solution, *Chem Phys Lett*. 507 (2011) 244–247. <https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2011.03.080>.
- [89] A. Dawid, K. Górný, Z. Gburski, The influence of distribution of hydroxyl groups on vibrational spectra of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ isomers: DFT study, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 136 (2015) 1993–1997. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2014.08.023>.
- [90] Z. Wang, S. Wang, Z. Lu, X. Gao, Syntheses, Structures and Antioxidant Activities of Fullerenols: Knowledge Learned at the Atomistic Level, *J Clust Sci*. 26 (2015) 375–388. <https://doi.org/10.1007/S10876-015-0855-0/FIGURES/6>.
- [91] X.J. Li, X.H. Yang, L.M. Song, H.J. Ren, T.Z. Tao, A DFT study on structure, stability, and optical property of fullerenols, *Struct Chem*. 24 (2013) 1185–1192. <https://doi.org/10.1007/S11224-012-0137-5/FIGURES/5>.
- [92] A. Pitek, A. Dawid, Z. Gburski, The properties of small fulleranol cluster (C₆₀(OH)₂₄)₇: Computer simulation, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 79 (2011) 819–823. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2010.08.059>.

- [93] B.C. Wang, H.W. Wang, H.C. Tso, T.L. Chen, Y.M. Chou, Theoretical studies of $C_{70}(OH)_n$ ($n=14, 16, 18$ and 20) fullerenols, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM.* 581 (2002) 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(01\)00756-4](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(01)00756-4).
- [94] H. He, L. Zheng, P. Jin, M. Yang, The structural stability of polyhydroxylated $C_{60}(OH)_{24}$: Density functional theory characterizations, *Comput Theor Chem.* 974 (2011) 16–20. <https://doi.org/10.1016/J.COMPTC.2011.07.005>.
- [95] A. Dawid, K. Górný, Z. Gburski, Water Solvent Effect on Infrared and Raman Spectra of $C_{60}(OH)_{24}$ Fullerene Isomers: DFT Study, *Journal of Physical Chemistry C.* 121 (2017) 2303–2315. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.6B06484/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JP-2016-06484U_0021.GIF.
- [96] G.I. Timofeeva, V.S. Romanova, L.A. Lopanova, Molecular characteristics of water-soluble fullerene derivatives of amino acids and peptides, *Russian Chemical Bulletin.* 45 (1996) 834–837. <https://doi.org/10.1007/BF01431308>.
- [97] K.N. Semenov, N.M. Ivanova, N.A. Charykov, V.A. Keskinov, S.S. Kalacheva, N.N. Duryagina, P. V. Garamova, N.A. Kulenova, A. Nabieva, Volume properties and refraction of aqueous solutions of bisadducts of light fullerene C_{60} and essential amino acids lysine, threonine, and oxyproline ($C_{60}(C_6H_{13}N_2O_2)_2$, $C_{60}(C_4H_8NO_3)_2$, and $C_{60}(C_5H_9NO_2)_2$) at $25^\circ C$, *Russian Journal of Physical Chemistry A.* 91 (2017) 315–322. <https://doi.org/10.1134/S0036024417020261/METRICS>.
- [98] 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 C_{60} -L-lysine water solutions, *J Mol Liq.* 225 (2017) 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.11.003>.
- [99] B.A. Noskov, K.A. Timoshen, A. V. Akentiev, N.A. Charykov, G. Loglio, R. Miller, K.N. Semenov, Dynamic surface properties of C_{60} -arginine and C_{60} -L-lysine aqueous solutions, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 529 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.05.055>.
- [100] 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 C_{60} -L-hydroxyproline water solutions, *RSC Adv.* 7 (2017) 15189–15200. <https://doi.org/10.1039/C6RA26621E>.

- [101] G.I. Timofeeva, A.A. Tepanov, V.A. Lopanov, V.S. Romanova, A study of the behavior of disubstituted methyl esters of peptide derivatives of fullerene C₆₀ in aqueous solutions, *Russian Chemical Bulletin*. 61 (2012) 1635–1637. <https://doi.org/10.1007/s11172-012-0219-y>.
- [102] G.I. Timofeeva, V.S. Romanova, Dependence of the degree of association of mono- and disubstituted biologically active derivatives of fullerene C₆₀ in aqueous solutions on the concentration and nature of substituents, *Russian Chemical Bulletin*. 56 (2007) 2389–2393. <https://doi.org/10.1007/s11172-007-0380-x>.
- [103] G.I. Timofeeva, E.F. Kuleshova, V.S. Romanova, Dependence of the degree of association of water-soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene[60] on pH and the ionic strength of a solution, *Russian Chemical Bulletin*. 46 (1997) 472–475. <https://doi.org/10.1007/BF02495397>.
- [104] A.N. Danilenko, V.S. Romanova, E.F. Kuleshova, Z.N. Parnes, E.E. Braudo, Heat capacities of aqueous solutions of amino acid and dipeptide derivatives of fullerene, *Russian Chemical Bulletin*. 47 (1998) 2134–2136. <https://doi.org/10.1007/BF02494267>.
- [105] 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>.
- [106] 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>.
- [107] M.Yu. Matuzenko, A.A. Shestopalova, K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.A. Keskinov, Cryometry and excess functions of the adduct of light fullerene C₆₀ and arginine – C₆₀(C₆H₁₂NaN₄O₂)₈H₈ aqueous solutions, *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. (2015) 715–725. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2015-6-5-715-725>.
- [108] K.N. Semenov, N.A. Charykov, Solubility Diagram of a Fullerenol-d-NaCl-H₂O System at 25°C, *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 86 (2012) 1636–1638. <https://doi.org/10.1134/S0036024412100226/METRICS>.
- [109] 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>.

- [110] F. Moussa, P. Chretie, 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, *Fullerene Science and Technology*. 3 (1995) 333–342. <https://doi.org/10.1080/153638X9508543788>.
- [111] 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., *Fullerene Science and Technology*. 4 (1996) 21–29. <https://doi.org/10.1080/10641229608001534>.
- [112] 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 Intra-gastrical Administrations to Rats, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 23 (2015) 658–668. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2014.949695>.
- [113] 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>.
- [114] 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, *Toxicological Sciences*. 91 (2006) 173–183. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj127>.
- [115] 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, *Toxicology in Vitro*. 25 (2011) 2105–2112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.013>.
- [116] 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>.
- [117] 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>.
- [118] 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 A Polym Chem*. 50 (2012) 119–126. <https://doi.org/10.1002/pola.24995>.

- [119] 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>.
- [120] J.D. Fortner, D.-I. Kim, A.M. Boyd, J.C. Falkner, S. Moran, V.L. Colvin, J.B. Hughes, J.-H. Kim, Reaction of Water-Stable C₆₀ Aggregates with Ozone, *Environ Sci Technol.* 41 (2007) 7497–7502. <https://doi.org/10.1021/es0708058>.
- [121] 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>.
- [122] 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>.
- [123] 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>.
- [124] D.A. Navarro, R.S. Kookana, M.J. McLaughlin, J.K. Kirby, Fate of radiolabeled C₆₀ fullerenes in aged soils, *Environmental Pollution.* 221 (2017) 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.077>.
- [125] K. Bhattacharya, S.P. Mukherjee, A. Gallud, S.C. Burkert, S. Bistarelli, S. Bellucci, M. Bottini, A. Star, B. Fadeel, Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation, *Nanomedicine.* 12 (2016) 333–351. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2015.11.011>.
- [126] 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>.
- [127] 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>.
- [128] 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, *Chemical Engineering Journal.* 334 (2018) 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.062>.
- [129] Y. Yamakoshi, S. Sueyoshi, N. Miyata, Biological activity of photoexcited fullerene, *Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* (1999) 50–60.

- [130] Y. Ma, Y. Li, M. Guan, C₈₄-carboxyfullerenes as efficient photosensitizers against cancer cells, *Nanomedicine*. 14 (2018) 1818. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.216>.
- [131] 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>.
- [132] 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>.
- [133] 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>.
- [134] 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>.
- [135] 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*. 186 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.027>.
- [136] 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>.
- [137] V.A. Volkov, M.V. Voronkov, N.N. Sazhina, D.V. Kurilov, D.V. Vokhmyanina, O.V. Yamskova, Y.T. Martirosyan, D.L. Atroshenko, L.Y. Martirosyan, V.S. Romanova, The mechanism of antioxidant action and the relationship between the structure and activity of N-monosubstituted amino acid derivatives of C₆₀ fullerene, *Kinetics and Catalysis*. 62 (2021) 343–353. <https://doi.org/10.31857/S0453881121030096>.
- [138] 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>.

- [139] 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 fullereneol 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>.
- [140] R. Injac, M. Perse, M. Boskovic, V. Djordjevic-Milic, A. Djordjevic, A. Hvala, A. Cerar, B. Strukelj, Cardioprotective Effects of Fullereneol 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>.
- [141] V. Djordjević-Milić, A. Djordjević, S. Dobrić, R. Injac, D. Vučković, K. Stankov, V. Dragojević-Simić, Lj. Suvajdžić, Influence of Fullereneol C₆₀(OH)₂₄; on Doxorubicin Induced Cardiotoxicity in Rats, *Materials Science Forum*. 518 (2006) 525–530. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.518.525>.
- [142] R. Injac, N. Radic, B. Govedarica, M. Perse, A. Cerar, A. Djordjevic, B. Strukelj, Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress, *Pharmacological Reports*. 61 (2009) 335–342. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70041-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70041-6).
- [143] R. Injac, M. Perse, N. Obermajer, V. Djordjevic-Milic, M. Prijatelj, A. Djordjevic, A. Cerar, B. Strukelj, Potential hepatoprotective effects of fullereneol 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>.
- [144] R.R. Panchuk, S. V. Prylutska, V. V. Chumak, N.R. Skorokhyd, L. V. Lehka, M.P. Evstigneev, Y.I. Prylutsky, W. Berger, P. Heffeter, P. Scharff, U. Ritter, R.S. Stoika, Application of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment in vitro and in vivo, *J Biomed Nanotechnol*. 11 (2015) 1139–1152. <https://doi.org/10.1166/JBN.2015.2058>.
- [145] L.-H. Lu, Y.-T. Lee, H.-W. Chen, L.Y. Chiang, H.-C. Huang, The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fullereneol, polyhydroxylated C₆₀, on vascular smooth muscle cells, *Br J Pharmacol*. 123 (1998) 1097–1102. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701722>.
- [146] M.C. Tsai, Y.H. Chen, L.Y. Chiang, Polyhydroxylated C₆₀, fullereneol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro, *J Pharm Pharmacol*. 49 (1997) 438–445. <https://doi.org/10.1111/J.2042-7158.1997.TB06821.X>.

- [147] S. Trajković, S. Dobrić, V. Jaćević, V. Dragojević-Simić, Z. Milovanović, A. Đorđević, Tissue-protective effects of fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$ and amifostine in irradiated rats, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 58 (2007) 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.005>.
- [148] J. Grebowski, P. Kazmierska, G. Litwinienko, A. Lankoff, M. Wolszczak, A. Krokosz, Fulleranol $C_{60}(OH)_{36}$ protects human erythrocyte membrane against high-energy electrons, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1860 (2018) 1528–1536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.005>.
- [149] 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*. 102 (2011) 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.09.006>.
- [150] 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 [C_{60}] Fullerene Complex, *Bioconjug Chem*. 16 (2005) 1058–1062. <https://doi.org/10.1021/bc050103c>.
- [151] H. Benyamini, A. Shulman-Peleg, H.J. Wolfson, B. Belgorodsky, L. Fadeev, M. Gozin, Interaction of C_{60} -Fullerene and Carboxyfullerene with Proteins: Docking and Binding Site Alignment, *Bioconjug Chem*. 17 (2006) 378–386. <https://doi.org/10.1021/bc050299g>.
- [152] 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 Surf B Biointerfaces*. 157 (2017) 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.065>.
- [153] V. V. Sharoyko, E.B. Serebriakov, S. V. Ageev, A. V. Petrov, A.A. Meshcheriakov, N.A. Charykov, I. V. Murin, D.N. Maistrenko, O.E. Molchanov, K.N. Semenov, Biocompatibility and biological activity of C_{70} fullerene adduct with L-threonine ($C_{70}(C_4H_9NO_3)_2$), *Biochem Biophys Res Commun*. 636 (2022) 50–56. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.10.054>.
- [154] 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 $C_{60}[C(COOH)_2]_3$, *Toxicology in Vitro*. 62 (2020) 104683. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104683>.

- [155] P.L. Olive, J.P. Banáth, R.E. Durand, Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay, *Radiat Res.* 122 (1990) 86–94. <https://doi.org/10.2307/3577587>.
- [156] G.G. Panova, E.B. Serebryakov, K.N. Semenov, N.A. Charykov, O.S. Shemchuk, E. V. Andrusenko, E. V. Kanash, Y. V. Khomyakov, A.M. Shpanev, L.L. Dulneva, N.E. Podolsky, V. V. Sharoyko, Bioactivity study of the C₆₀-L-threonine derivative for potential application in agriculture, *J Nanomater.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/2306518>.
- [157] Y.I. Frenkel, *Kinetic Theory of Liquids*, Oxford University Press, Oxford, 1946.
- [158] O.S. Manyakina, K.N. Semenov, N.A. Charykov, N.M. Ivanova, V.A. Keskinov, V. V. Sharoyko, D.G. Letenko, V.A. Nikitin, V. V. Klepikov, I. V. Murin, Physico-chemical properties of the water-soluble C₇₀-tris-malonic solutions, *J Mol Liq.* 211 (2015) 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.06.071>.
- [159] 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>.
- [160] K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.N. Keskinov, Fullerenol synthesis and identification. Properties of the fullerenol water solutions, *J Chem Eng Data.* 56 (2011) 230–239. <https://doi.org/10.1021/je100755v>.
- [161] 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>.
- [162] 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>.
- [163] 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>.
- [164] 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>.

- [165] M.Yu. Matuzenko, A.A. Shestopalova, K.N. Semenov, N.A. Charykov, V.A. Keskinov, Cryometry and excess functions of the adduct of light fullerene C₆₀ and arginine — C₆₀(C₆H₁₂NaN₄O₂)₈H₈ aqueous solutions, *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. (2015) 715–725. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2015-6-5-715-725>.
- [166] 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>.
- [167] N.M. Safyannikov, N.A. Charykov, P. V Garamova, K.N. Semenov, V.A. Keskinov, A. V Kurilenko, I.A. Cherepcova, D.P. Tyurin, V. V Klepikov, M.Y. Matuzenko, N.A. Kulenova, A.A. Zolotarev, Cryometry data in the binary systems bis-adduct of C₆₀ and indispensable aminoacids-lysine, threonine, oxyproline, *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. 9 (2018) 46–48. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2018-9-1-46-48>.
- [168] N.A. Charykov, K.N. Semenov, A. V. Kurilenko, V.A. Keskinov, D.G. Letenko, N.A. Kulenova, A.A. Zolotarev, V. V. Klepikov, Modeling of systems with aqueous solutions of UO₂²⁺ salts. Asymmetric model of excess thermodynamic functions, based on virial expansion of the Gibbs free energy of the solution, *VD-AS, Radiochemistry*. 59 (2017) 134–142. <https://doi.org/10.1134/S1066362217020059>.
- [169] P.L. Olive, J.P. Banáth, R.E. Durand, J.P. Banath, Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay, *Radiat Res*. 122 (1990) 86. <https://doi.org/10.2307/3577587>.
- [170] 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>.
- [171] A.A. Meshcheriakov, Functionalisation of fullerene C₆₀ for obtaining materials for biomedical purposes, PhD Thesis, Saint Petersburg State University, 2023.