

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Почкаева Евгения Игоревна

**Синтез, идентификация и физико-химические свойства аддукта фуллерена
C₆₀ с L-аргинином**

Научная специальность 1.4.15. Химия твердого тела

Диссертация представлена на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:

д-р биол. наук, доцент

Шаройко Владимир Владимирович

Санкт-Петербург

2024

Содержание

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Синтез аддуктов фуллеренов с аминокислотами, пептидами и белками	12
1.2. Физико-химические свойства фуллеренов с аминокислотами и пептидами	34
1.2.1. Термодинамические свойства фуллеренов и их аддуктов	34
1.2.2. Физико-химические свойства водных растворов аддуктов фуллеренов с аминокислотами и пептидами.....	37
1.3. Биомедицинское исследование аддуктов фуллеренов с аминокислотами, пептидами и белками	42
Глава 2. Экспериментальная часть	53
2.1. Материалы и методы исследования	53
2.1.1. Синтез аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином.....	53
2.1.2. Идентификация аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином.....	54
2.1.3. Изучение термодинамических свойств аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином	54
2.1.4. Изучение физико-химических свойств аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином	54
2.1.5. Биосовместимость и биологическая активность аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином	56
2.1.5.1. Цитотоксичность	56
2.1.5.2. Генотоксичность.....	57
2.1.5.3. Связывание с ЧСА.....	57
2.1.5.4. Антирадикальная активность	57
Глава 3. Результаты.....	59
3.1. Идентификация аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином.....	59
3.1.1. Элементный анализ.....	59
3.1.2. ИК-спектроскопия.....	59
3.1.3. ^{13}C ЯМР-спектроскопия.....	60
3.1.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	62

3.1.5. Термогравиметрический анализ	62
3.2. Термодинамические характеристики аддукта лёгкого фуллерена C ₆₀ с L-аргинином.....	63
3.3. Физико-химические свойства водных растворов аддукта лёгкого фуллерена C ₆₀ с L-аргинином	69
3.3.1. Плотности водных растворов аддукта	69
3.3.2. Температурная зависимость вязкости водных растворов аддукта.....	76
3.3.3. Рефракция водных растворов аддукта	84
3.3.4. Размеры частиц в водном растворе и ζ-потенциалы.....	88
3.3.5. Растворимость	92
3.3.6. Описание зависимостей T–x физических свойств.....	93
3.4. Биосовместимость и биологическая активность аддукта лёгкого фуллерена C ₆₀ с L-аргинином	96
3.4.1. Цитотоксичность	96
3.4.2. Генотоксичность.....	97
3.4.3. Связывание с ЧСА.....	99
3.4.4. Антирадикальная активность.....	101
Глава 4. Основные результаты и выводы	105
Перечень сокращений	106
Благодарности.....	109
Список литературы	110

Введение

Перспективность применения фуллеренов в биомедицине стала очевидна практически с момента их открытия [1,2]. Молекула фуллерена обладает высокой реакционной способностью благодаря большому числу двойных связей, к которым могут присоединяться различные радикалы [3,4], способностью проникать через клеточные мембраны [5,6], модулировать транспорт ионов [5,6], преодолевать гематоэнцефалический барьер [7,8]. Таким образом, фуллерены рассматриваются как перспективные скаффолды для получения новых высокотехнологичных наноматериалов и препаратов для медицины.

Изучение физико-химических свойств фуллеренов и их производных является необходимым условием для понимания механизмов их действия, биораспределения и фармакокинетики и т. д. [9]

Основная трудность на пути биомедицинского применения фуллеренов связана с нерастворимостью молекул фуллеренов в воде и водных растворах [5,6]. Способом решения этой проблемы является синтез водорастворимых аддуктов фуллеренов [5,6,10]. Анализ литературы показывает, что наиболее перспективными классами водорастворимых аддуктов фуллеренов являются карбоксилированные и полигидроксилированные аддукты [5,6,11], аддукты фуллеренов с аминокислотами [12], пептидами и белками [13–17].

Установлено, что водорастворимые аддукты фуллеренов проявляют антибактериальную [18], про- и антиоксидантную активность [4,19], а также имеют перспективы применения в качестве скаффолдов для получения противоопухолевых [20,21], нейропротекторных [7,8,22], противовирусных препаратов [23–25]. Более того, водорастворимые аддукты фуллеренов имеют большой потенциал применения для создания микроудобрений из-за их способности осуществлять трансмембранный транспорт макро- и микроэлементов, а также вследствие выраженной антиоксидантной активности [11,26–28].

Согласно данным, представленным в наукометрической базе Scopus, отмечается рост научных публикаций в области получения и применения

водорастворимых аддуктов лёгких фуллеренов с аминокислотами, пептидами и белками (Рис. 1).

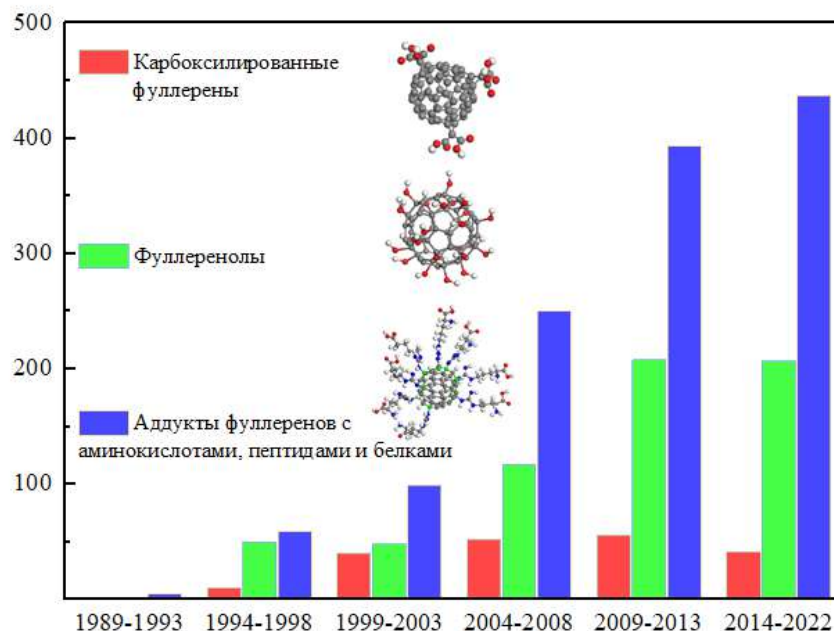


Рис. 1. Число научных публикаций (по годам) в области получения и применения водорастворимых аддуктов лёгких фуллеренов с аминокислотами, пептидами и белками.

Цель и задачи работы

Цель работы — разработка метода синтеза аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, его идентификация, изучение термодинамических свойств, а также физико-химических свойств водных растворов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка метода одностадийного синтеза водорастворимого аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, позволяющая получить продукт с высоким выходом (более 90 %).
2. Проведение идентификации аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином с использованием комплекса физико-химических методов анализа, а именно: элементного анализа, ИК- и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматография (ВЭЖХ), термогравиметрического анализа.

3. Изучение термодинамических свойств аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 13\text{--}326$ К методом адиабатической вакуумной калориметрии.
4. Проведение комплексного изучения физико-химических свойств водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином в широком интервале температур и концентраций (плотности, вязкости, показателя преломления, распределение частиц по размерам, ζ -потенциала).
5. Изучение биосовместимости аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, включающее исследование цито- и генотоксичности, антирадикальной активности и связывание с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА).

Научная новизна

1. Разработан метод получения аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, характеризующийся высоким выходом (более 90 %). Для очистки аддукта впервые был использован диализ.
2. Идентификация синтезированного аддукта с использованием комплекса современных физико-химических методов анализа позволяет заключить, что полученное соединение является аддуктом фуллерена C_{60} с L-аргинином. Метод твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии был использован впервые для характеристики аддуктов фуллеренов с аминокислотами.
3. Впервые изучены термодинамические свойства аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином в широком интервале температур $T = 13\text{--}326$ К методом адиабатической вакуумной калориметрии.
4. Экспериментальные данные по изучению физико-химических свойств растворов синтезированного аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином являются основой для создания материалов биомедицинского назначения.
5. На основании данных по изучению цито- и генотоксичности, показано, что аддукт фуллерена C_{60} с L-аргинином нетоксичен.

Достоверность и апробация результатов исследования

Результаты были опубликованы в четырёх работах в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science и

представлены на десяти международных и всероссийских научных конференциях.

Список публикаций

1. Iurev G.O., Lelet M.I., Pochkaeva E.I., Petrov A.V., Semenov K.N., et. al. Thermodynamic and thermal properties of the C₆₀-L-Arg derivative // *J. Chem. Thermodyn.* — 2018. — Vol.127. — P. 39–44 (Q1, ИФ 2.6).
2. Почкаева Е.И., Ануфриков Ю.А., Фаенкова В.П., Шаройко В.В., Чарыков Н.А., Мурин И.В. Изотермическое калориметрическое титрование человеческого сывороточного альбумина аддуктом C₆₀-L-аргинин // *Журнал общей химии.* — 2019. — Т.89. — №8. — С.1309–1312 (Q4, ИФ 0.9).
3. Pochkaeva E.I., Meshcheriakov A.A., Ageev S.V., Podolsky N.E., Petrov A.V., et. al. Polythermal density and viscosity, nanoparticle size distribution, binding with human serum albumin and radical scavenging activity of the C₆₀-L-arginine (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈) aqueous solutions // *J. Mol. Liquids.* — 2020. — Vol.297. — P.111915 (Q1, ИФ 6.0).
4. Pochkaeva E.I., Podolskiy N.E., Zakusilo D.N., Andrusenko E.V., Petrov A.V. et. al. Fullerene derivatives with amino acids, peptides and proteins: from synthesis to biomedical application // *Prog in Solid State Chem.* — 2020. — Vol.57. — P.100255 (Q1, ИФ 12.0).

Список конференций

1. Материалы LXXIX научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины — 2018» 1–27 апреля 2018. Почкаева Е.И., Мещеряков А.А., Юрьев Г.О., Печникова Н.А. «Исследование гемосовместимости водорастворимых аддуктов лёгких фуллеренов *in vitro*», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2018.
2. Материалы II Всероссийской конференции «Байкальская школа-конференция по химии» 24–28 сентября 2018. Pochkaeva E.I., Meshcheriakov A.A., Yur'ev G.O., Pechnikova N.A., Leonova Y.V., Nurutdinov A.Z. «*In vitro* hemocompatibility and antioxidant properties of water-soluble adducts of light fullerenes with L-arginine», Иркутск, Российская Федерация, 2018.

3. Материалы международной студенческой конференции «Science and Progress — 2018» 12–14 ноября 2018. Почкаева Е. «Antioxidant activity and binding of the C₆₀-Arg derivative with human serum albumin (HSA)», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2018.
4. Материалы LIII Школы ПИЯФ по физике конденсированного состояния 11–16 марта 2019. Почкаева Е.И., Семенов К.Н., Чарыков Н.А., Шаройко В.В. «Биомедицинское исследование производного C₆₀-L-аргинин», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2019.
5. Материалы IX научно-технической конференции студентов, аспирантов, молодых учёных с международным участием «Неделя науки-2019» 1–3 апреля 2019. Почкаева Е.И., Чарыков Н.А., Шаройко В.В. «Исследование физико-химических свойств водных растворов производного фуллерена C₆₀ с L-аргинином (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈)», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2019.
6. Материалы VI международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» 25–26 апреля 2019. Почкаева Е.И., Семенов К.Н., Ануфриков Ю.А., Шаройко В.В. «Изучение взаимодействия C₆₀-L-аргинина с человеческим сывороточным альбумином методом изотермической калориметрии титрования», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2019.
7. Материалы национального медицинского инновационного форума «Алмазовский молодежный медицинский форум — 2019» 16–18 мая 2019. Почкаева Е.И., Печникова Н.А., Семенов К.Н. «Исследование взаимодействия производного C₆₀-L-аргинин (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈) с компонентами крови», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2019.
8. Материалы XII Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» 7–11 октября 2019. Почкаева Е.И., Семенов К.Н., Шаройко В.В., Лелет М.И. «Термодинамическое изучение производного фуллерена C₆₀ с L-аргинином (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈)», Иваново, Российская Федерация, 2019.

9. Материалы XXVI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины — 2020» 26–27 марта 2020. Почкаева Е.И., Семенов К.Н., Васина Л.В., Соловцова И.Л. «Биологическая активность аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином ($C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$)», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2020.

10. Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины — 2021» 25–26 марта 2021. Почкаева Е.И., Мещеряков А.А., Агеев С.В. «Аддукт фуллерена C_{60} с L-аргинином: исследование физико-химических свойств и биологической активности», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2021.

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).

Личный вклад автора заключался в анализе литературных данных, синтезе и идентификации аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином, в изучении физико-химических свойств и биосовместимости полученного аддукта, в обсуждении результатов экспериментов и в подготовке научных публикаций по материалам диссертации.

Структура диссертации: диссертация состоит из списка сокращений, введения, трёх глав, заключения, приложения; в первой главе представлен обзор литературы, во второй главе описаны материалы и методы исследований, в третьей главе представлены результаты по синтезу, идентификации и физико-химическим свойствам индивидуального аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином и его растворов, а также результаты по изучению биосовместимости. Диссертация изложена на 122 страницах, содержит 79 рисунков, 17 таблиц, 130 ссылок на литературные источники.

Основные научные результаты

1. Разработан новый метод получения водорастворимого аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином и проведена его идентификация с использованием комплекса

физико-химических методов анализа: ^{13}C ЯМР-, ИК-спектроскопия, термогравиметрический анализ, элементный анализ и ВЭЖХ. См. работы [122,123] из списка литературы диссертации (в частности, раздел 2.1 в [122] и раздел 2.2 в [123]; личный вклад составляет не менее 80%).

2. Изучены термодинамические свойства аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином в широком интервале температур $T = 13\text{--}326$ К методом адиабатической вакуумной калориметрии. См. работы [96,122] из списка литературы диссертации (в частности, раздел 3.1 в [96] и раздел 2.2 в [122]; личный вклад составляет не менее 60%).

3. Проведено исследование физико-химических свойств водных растворов аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином: изучены плотности, вязкости, показатели преломления, распределение частиц по размерам и ζ -потенциалы. См. разделы 3.1, 3.2, 3.3 в работе [122] из списка литературы диссертации (личный вклад составляет не менее 80%).

4. Исследована биосовместимость аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином. См. работу [126] из списка литературы диссертации (личный вклад составляет не менее 80%).

5. Изучено взаимодействие аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином со стабильным радикаломДФПГ. См. раздел 3.8 в работе [123] из списка литературы диссертации (личный вклад составляет не менее 70%).

Положения, выносимые на защиту

1. Одностадийный метод синтеза аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, позволяющий получить водорастворимый наноматериал с выходом более 90 %, а также данные по его идентификации.

2. Результаты термодинамического изучения аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 13\text{--}326$ К.

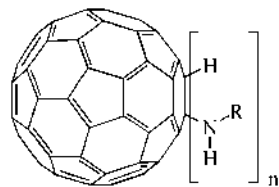
3. Данные по изучению физико-химических свойств водных растворов и фазовых равновесий в бинарных системах аддукт фуллерена C_{60} с L-аргинином-вода.

4. Результаты по изучению биосовместимости аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, включающие исследование цито- и генотоксичности, антирадикальной активности и связывание с ЧСА.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Синтез аддуктов фуллеренов с аминокислотами, пептидами и белками

В первых исследованиях, посвящённых изучению реакционной способности индивидуальных лёгких фуллеренов (C_{60} и C_{70}), было установлено, что фуллерены легко вступают в реакции нуклеофильного присоединения с первичными и вторичными аминами [29,30]. В работах [31–43] с помощью одностадийного синтеза были получены аддукты C_{60} со следующими аминокислотами и пептидами (Рис. 2): глицин, *n*-аминобензойная кислота, ω -аминокапроновая кислота, γ -аминомасляная кислота, L-пролин, L-аланин-N-метил-L-аланин, DL-серин, D-аргинин, L-аргинин, β -аланин, валин, цистин, фенилаланин, фолацин, карнозин и глутатион. Идентификация полученных соединений проводилась с использованием комплекса физико-химических методов (ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопия, элементный анализ, динамическое рассеяние света). Недостатком работ является отсутствие данных по выходам конечных аддуктов.



1. R = CH_2COOH $n = 1$
2. R = pC_6H_4COOH $n = 1$
3. R = $(CH_2)_5COOH$ $n = 1$
4. R = $(CH_2)_5COONa$
5. R = $(CH_2)_3COOH$ $n = 1$
6. R = $(CH_2)_3COONa$
7. R = C_3H_6COOH
8. R = $(CH_2)_2COOH$ $n = 1$
9. R = L,D- $CH(CH_3)COOCH_3$ $n = 1$
10. R = L,D- $C(CH_2OH)COOH$ $n = 1$
11. R = L,D- $C(-NH)NH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$ $n = 1$
12. R = $CH_3-CH(CH_3)CHCOOH$ $n = 1$
13. R = $C_5H_9NO_2S_2COOH$ $n = 1$
14. R = C_8H_8COOH $n = 1$
15. R = $C_8H_5O_2COOH$ $n = 4$
16. R = $C_9H_{10}O_4SCOON$ $n = 3$

Рис. 2. Аддукты C_{60} с аминокислотами и пептидами [31–43].

Халиков с соавт. [44] в результате одностадийной реакции между фуллереном и аминокислотами в щелочной среде получили натриевые соли фуллерена C_{60} с глицином и L-лизином: $C_{60}(Gly-ONa)_6 \cdot 10H_2O$, $C_{60}(Lys-ONa)_4 \cdot 10H_2O$, а также аддукты смешанного состава: $C_{60}[(Gly-ONa)_3(Lys-ONa)_2] \cdot 10H_2O$ и $C_{60}[(Gly-ONa)_3(Asp-ONa)_2Arg-ONa] \cdot 10H_2O$. Идентификация полученных соединений проводилась методами ИК-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии.

В патенте [45] представлен способ получения нового класса соединений — фуллеренполикарбонатовых анионов, имеющих общую формулу $C_{60}H_n[NH(CH_2)_mC(O)O^-]_n$, где $m = 1-5$, $n = 2-12$. Полученные аддукты были охарактеризованы с помощью ЯМР спектроскопии (1H ЯМР и ^{13}C ЯМР). В патенте [46] были получены кристаллогидраты аддуктов C_{60} с аминокислотами с общей формулой $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \cdot xH_2O$, где $n = 5-7$; $x = 8-10$ (Рис. 3).

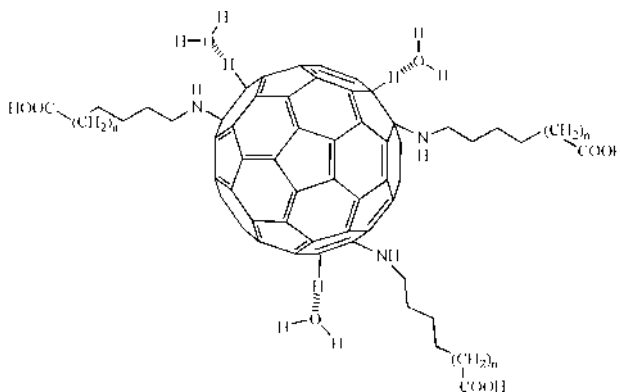


Рис. 3. Общая структурная формула аддуктов C_{60} с аминокислотами [46].

Указанные аддукты были охарактеризованы с использованием методов ИК-спектроскопии, элементного анализа и термогравиметрии. Шей с соавт. [7] синтезировали солевые формы водорастворимых аддуктов фуллерена C_{60} с L-фенилаланином (Рис 4а), L-серином (Рис. 4б), β-аланином (Рис. 4в) и с γ-фенилмасляной кислотой (Рис. 4г). Авторами было установлено, что полученные аддукты содержат пять высокополярных солубилизирующих групп, присоединённых к одной полусфере фуллеренового кока, при этом вторая полусфера остаётся нефункционализированной и сильно гидрофобной. Такая уникальная молекулярная структура отличает эти соединения от большинства других водорастворимых аддуктов фуллерена, придавая соединениям амфифильности приводя к самосборке в полярных растворителях. Полученные аддукты были охарактеризованы методом ЯМР.

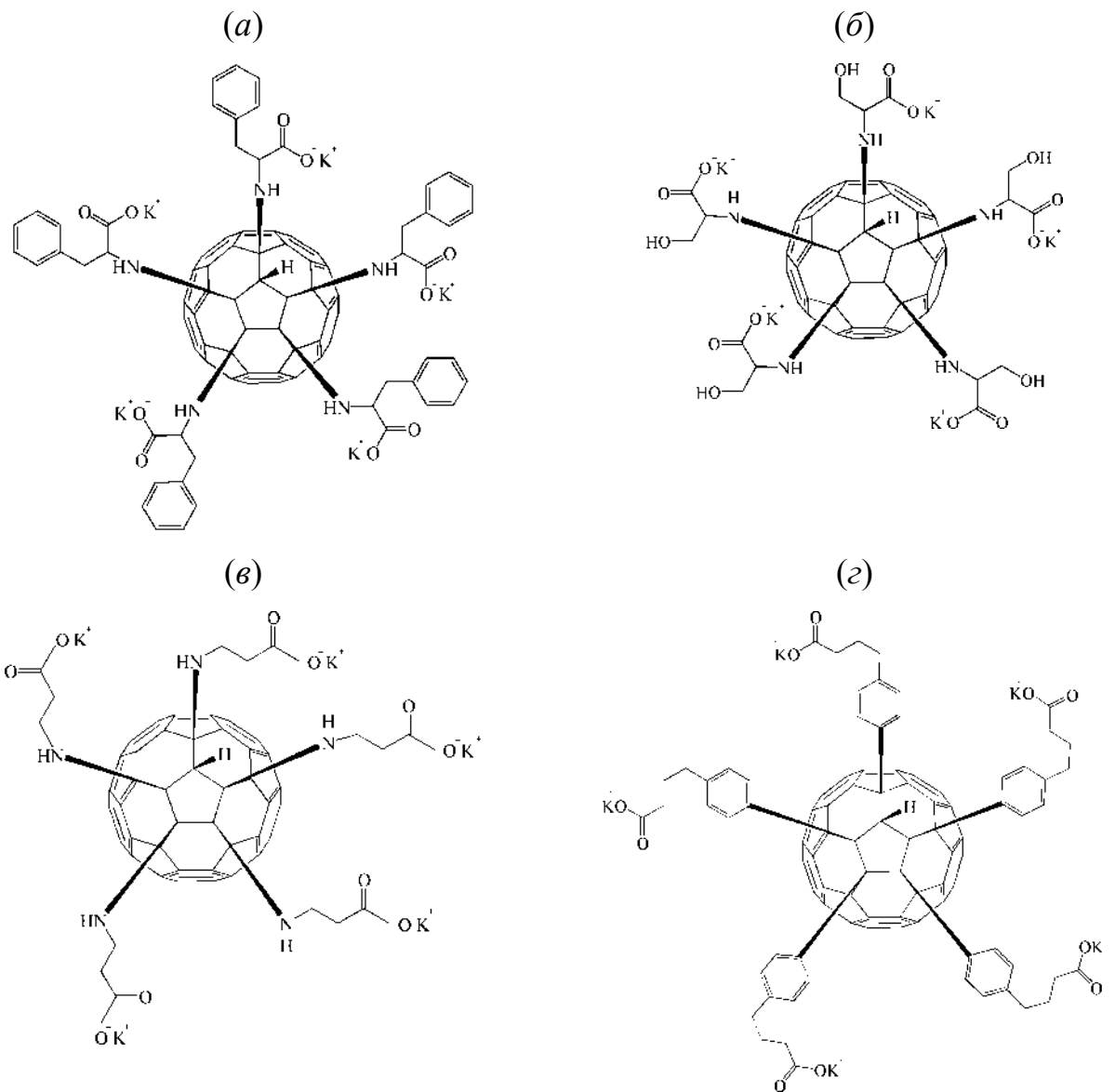


Рис. 4. Водорастворимые аддукты лёгких фуллеренов C_{60} с аминокислотами: L-фенилаланин (a), L-серин (б), β -аланин (в) и γ -фенилмасляная кислота (г) [7].

Маггини с соавт. [47] в результате проведения реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения азометинилидов к фуллерену C_{60} (реакция Прато) получил аддукт фуллеропролина (Рис. 5).

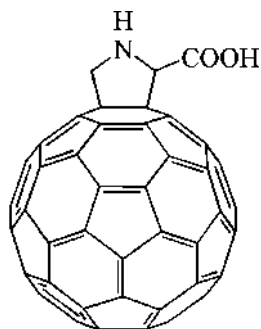


Рис. 5. Аддукт фуллеропролина [47].

Полученный аддукт был охарактеризован с помощью ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР и УФ-спектроскопии. Ватанабе с соавт. [48] предложили способы использования реакции Прато для синтеза аддуктов фуллерена с аминокислотами, содержащими 4–6 метиленовых звена (Рис. 6). Полученные аддукты были охарактеризованы с помощью ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР и масс-спектрометрии.

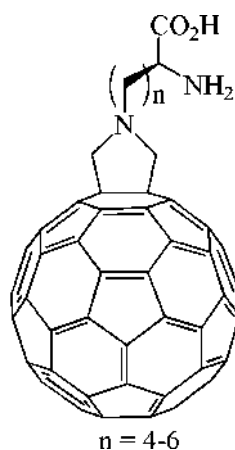


Рис. 6. Аддукт фуллерена с аминокислотами содержащих 4–6 метиленовых звена [48].

Чжан с соавт. [49] была проведена конденсация *N*-замещённого фуллеро-пирролидина с L-аспаргиновой (Рис. 7а) и L-глутаминовой кислотами (Рис 7б), содержащими защищённые α -амино- и α -карбоксигруппы. Выходы продуктов (Рис. 7а) и (Рис. 7б) составили 82 и 83 %, соответственно. Полученные соединения были охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии, УФ, ИК- и ЯМР-спектроскопии.

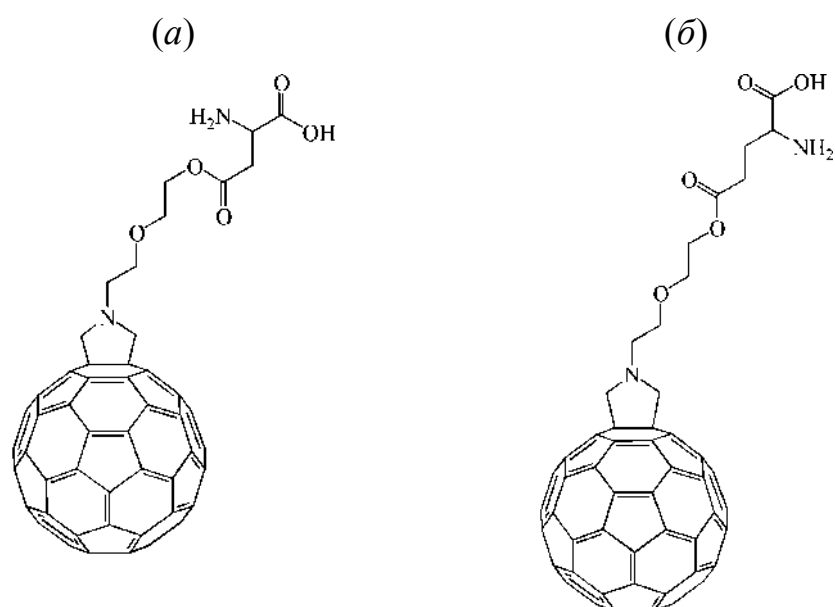


Рис. 7. Аддукты C₆₀ с L-аспаргиновой (а) и L-глутаминовой (б) кислотами [49].

В настоящее время существует два метода синтеза аддуктов фуллерена C₆₀ с пептидами. Простейшим методом является функционализация фуллерена с предварительно синтезированным пептидом. Более сложным методом является синтез пептидов с введением C₆₀-пептида в аминокислотную последовательность.

Романова с соавт. [32] впервые провели прямую реакцию функционализации фуллереном C₆₀ с пептидом. Механизмом реакции взаимодействия C₆₀ с различными дипептидами (L-Ala-L-Ala, D,L-Ala-D,L-Ala, и Gly-L-Val) является нуклеофильное присоединение (Рис. 8). Полученные соединения были охарактеризованы методом ЯМР-спектроскопии.

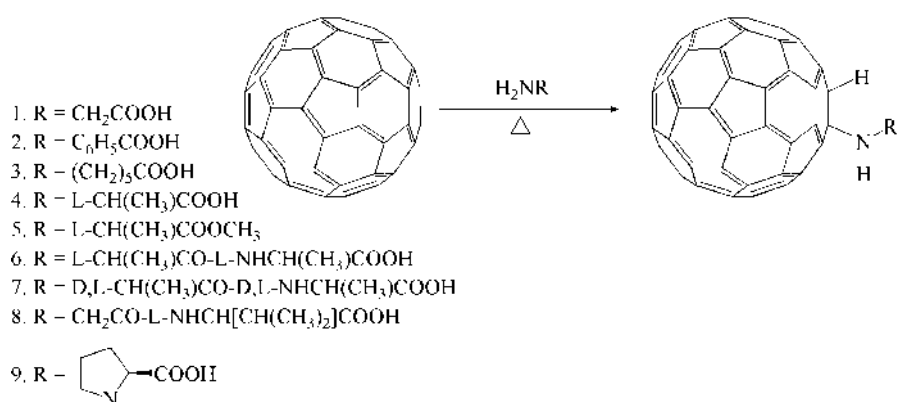


Рис. 8. Схема получения аддуктов на основе C₆₀ с пептидами [32].

Ван с соавт. [50] получили аддукт C₆₀ с метиловым эфиром глицилглицина (Рис. 9) в результате взаимодействия водного раствора метилглицилглици-

ната с C_{60} в щелочной среде при нагревании. Идентификация полученного аддукта проводилась с помощью методов ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии.

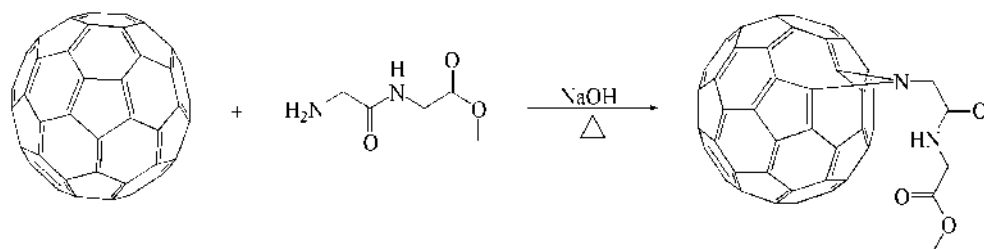


Рис. 9. Схема получения аддукта C_{60} с метиловым эфиром глицилглицина с фуллереном C_{60} [50].

Фуллеренопептид (Рис. 10) был синтезирован в результате реакции присоединения *N*-конца пентапептида с чередующейся –Ala-Aib-последовательностью к метанофуллерену [51].

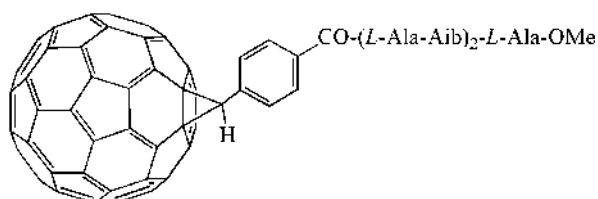


Рис. 10. Фуллеренопептид [51].

Идентификация полученного соединения проводилась с помощью методов УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии.

Тониоло с соавт. [14] описали двухстадийный синтез водорастворимого олигопептида (Рис. 11). Вначале авторами была получена метанофуллеренкарбоновая кислота, которая затем связывалась стандартным методом (с использованием DCC/NOBt [52]) с α -аминогруппой пептида-Т. Идентификация полученного соединения проводилась методами УФ-, ЯМР-спектроскопии.

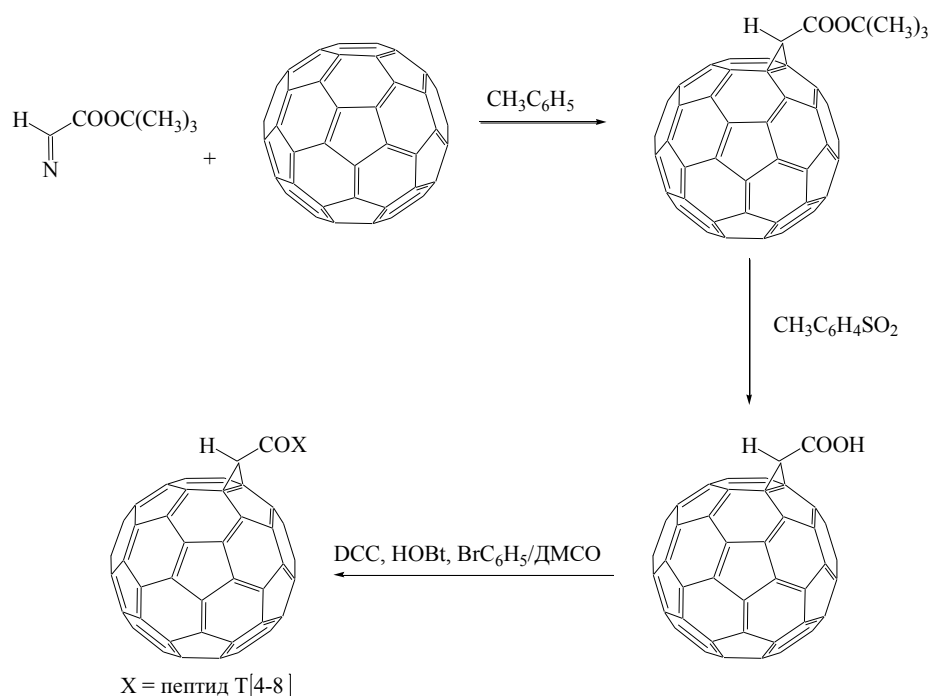


Рис. 11. Схема синтеза аддукта C_{60} с пептидом Т [14].

В патенте [53] описан метод получения фуллеренсодержащего гликопептида GlcNac-MurNac-Ala-DiGln[Lys- ϵ -CO(CH₂)₅NHC₆₀-H] из аддукта фуллерена с ϵ -аминокапроновой кислотой и Lys-содержащего гликопептида. Формула конечного продукта представлена на Рис. 12. Идентификация полученного соединения проводилась с использованием ЯМР-спектроскопии.

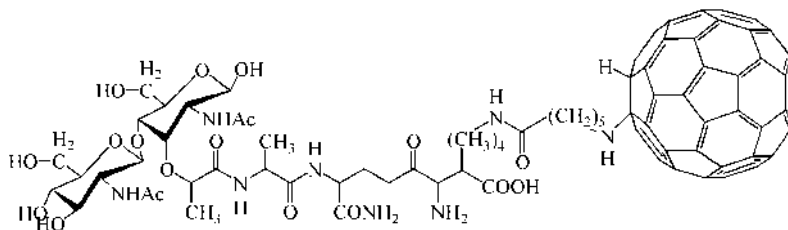


Рис. 12. Фуллеренсодержащий гликопептид [53].

Полезе с соавт. [54] описали синтез и фотофизические свойства комплекса $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ -гексапептид- C_{60} ($bpy = 2,2'$ -бипиридин) (Рис. 13).

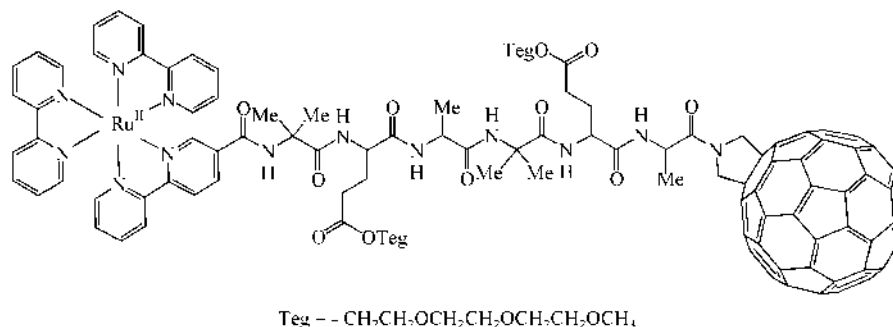


Рис. 13. $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ -гексапептид- C_{60} ($bpy = 2,2'$ -бипиридин) [54].

Синтез аддукта проводили в несколько стадий: (1) получение незамещённого фуллеропирролидина по реакции Прато; (2) проведение реакции взаимодействия незамещённого фуллеропирролидина с Вос-защищённым аланином; (3) снятие защиты и проведение реакции с бипиридин-пентапептидом; (4) проведение реакции полученного аддукта с рутений-бипиридиновым комплексом. Идентификация полученного соединения проводилась с помощью методов ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии.

Усака с соавт. [55] получили аддукты C_{60} с *N*-Вос-защищёнными гексапептидами L-Leu-Aib-L-Leu₂-Aib-Gly (Рис. 14а) и D-Leu-Aib-D-Leu₂-Aib-Gly (Рис. 14б).

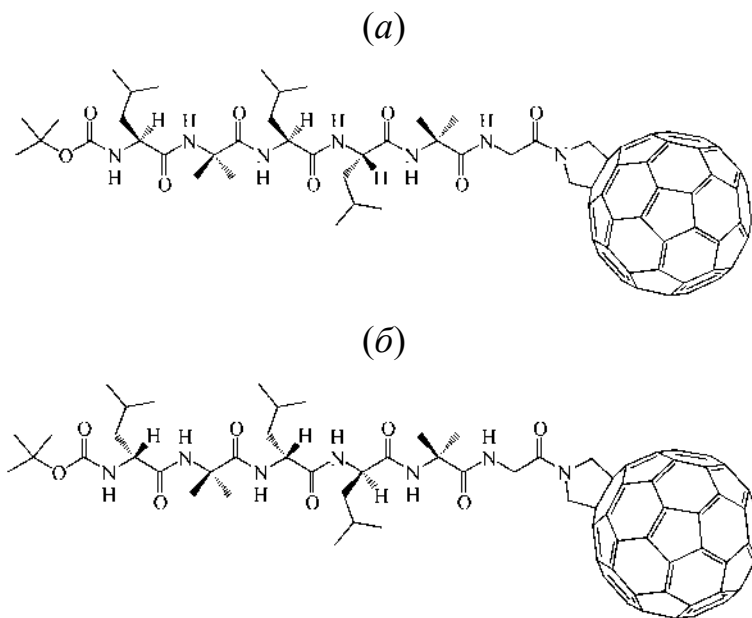


Рис. 14. Аддукты C_{60} с *N*-Вос-защищёнными гексапептидами L-Leu-Aib-L-Leu₂-Aib-Gly (а) и D-Leu-Aib-D-Leu₂-Aib-Gly (б) [55].

Затем энантиомерные аддукты (Рис. 14а) и (Рис.14б) инкапсулировали в спиральную полость синдиотактического полиметилметакрилата (st-PMMA) (Рис. 15) с получением уникальных оптически активных супрамолекулярных комплексов типа «спираль-в-спирали». Далее комплексы были охарактеризованы с использованием комплекса физико-химических методов: ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма, рентгеноструктурного анализа, а также с помощью дифференцирующей сканирующей калориметрии.

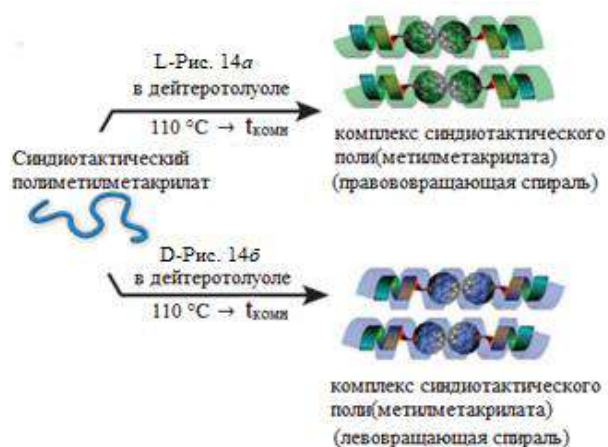


Рис. 15. Схема инкапсулирования аддуктов C_{60} с *N*-Вос-защищёнными гексапептидами *N*-Вос-L-Leu-Aib-L-Leu₂-Aib-Gly и *N*-Вос-D-Leu-Aib-D-Leu₂-Aib-Gly в спиральную полость st-PMMA [55].

Маццони с соавт. [56] синтезировали конъюгат фуллеропирролидин-нитроксид, в котором радикал TEMPO (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил и фуллеропирролидин соединены через пептидный спейсер — Z (карбобензоксигруппа)-Asp-Aib-Ala-TOAC-Ala-OtBu (Рис. 16).

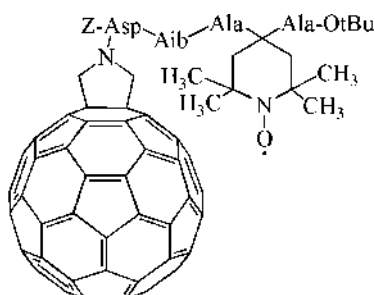


Рис. 16. Конъюгат фуллеропирролидин-ТЕМРО.

Курц с соавт. [57] синтезировали цистеинсодержащий редокс-белок (мутант азурина S118C), меченный тиолселективным реагентом на основе C_{60} . Для этого *N*-(трифенилметил)-3,4-фуллеропирролидин подвергали взаимодействию с 3-малеимидопропионилхлоридом с получением тиолселективного фуллере-номалеимида [58]. Далее полученное соединение смешивали с раствором азурина S118C в буфере HEPES при pH 7 (Рис. 17). Контроль за протеканием реакции проводили с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле.

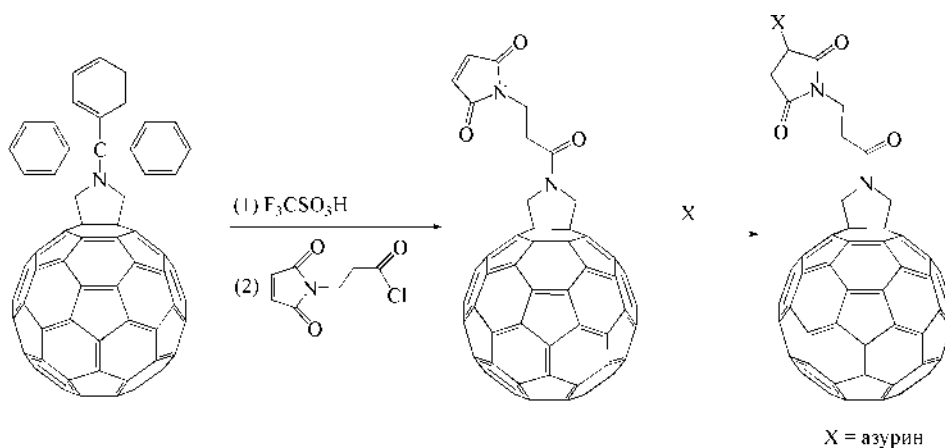


Рис. 17. Схема получения цистеинсодержащего редокс-белка, меченного тиол-селективным реагентом на основе C_{60} [57].

Авторы работ [59,60] синтезировали комплексы C_{60} со стабильным тетрамером COP (C_{60} -organising peptide), содержащим следующую последовательность из 30 аминокислот — AEAESALEYAQQALEKAQLALQAARQALKA) (Рис. 18).

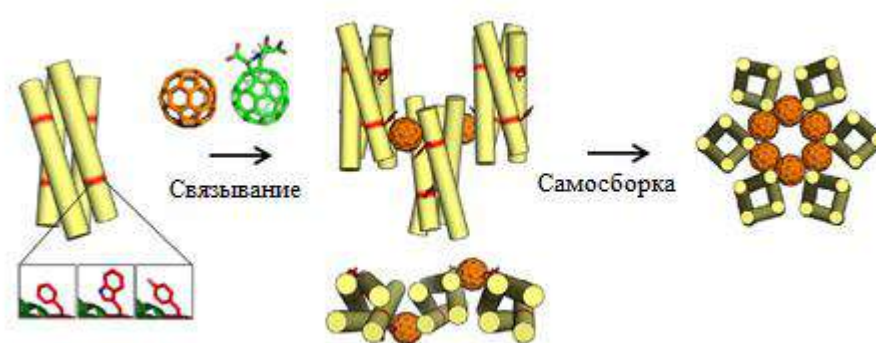


Рис. 18. Схема сборки комплекса C_{60} -COP [59].

Как показано на Рис. 18, тетрамер COP взаимодействует с индивидуальной молекулой C_{60} , а также с фуллереновым кором фуллерен-пирролидиновой кислоты (Рис. 19) посредством поверхностно связывающего сайта, содержащего остатки Тур (фуллереновый кор взаимодействует с ароматическими фрагментами аминокислоты) и далее происходит процесс организации совместной с фуллереном кристаллической структуры с получением C_{60} -COP.

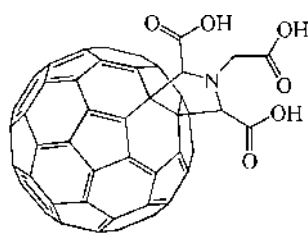


Рис. 19. Фуллерен-пирролидиновая кислота [59].

Для синтезированных структур авторы, провели рентгено-дифракционный анализ с помощью программы PHASER.

Сюй с соавт. [61] получили водную дисперсию аддукта C_{60} -GluEG (Рис. 20) в результате проведения тиоловой клик-реакции в присутствии *N*-карбоксиянгидрида GluEG и последующей полимеризации с раскрытием цикла.

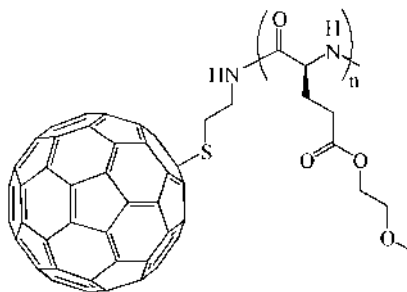
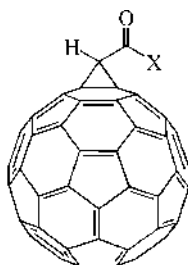


Рис. 20. Аддукт C_{60} -GluEG [61].

Полученное соединение было охарактеризовано с помощью методов ИК-, ЯМР-спектроскопии, термического анализа. Авторами было установлено, что размер частиц синтезированного аддукта составляет около $4,0 \pm 1,2$ нм; аддукт обладает высокой диспергируемостью в воде, интенсивной флуоресценцией и высокой фотостабильностью в растворе.

Юнг с соавт. [62] провели синтез аддукта C_{60} с аламетицином (Рис. 21).



X – Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl

Рис. 21. Аддукт C_{60} с аламетицином [62].

Для проведения синтеза сукцинимидильный эфир фуллеренкарбоновой кислоты подвергали взаимодействию с пептидом в хлористом метиле, далее продукты осаждали *n*-гексаном и очищали флэш-хроматографией. Полученные соединения были охарактеризованы с помощью методов ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Авторами работ [63] в результате трёхстадийного синтеза, включающего реакцию Прато, ацилирование ангидридами или хлорангидридами кислот и конъюгацию с использованием (EDC·HCl, HOAt, H-L-Ala-OEt) была получена смесь двух диастереомерных дипептидов (Рис. 22). Идентификация полученных соединений проводилась с помощью методов УФ- и ЯМР-спектроскопии.

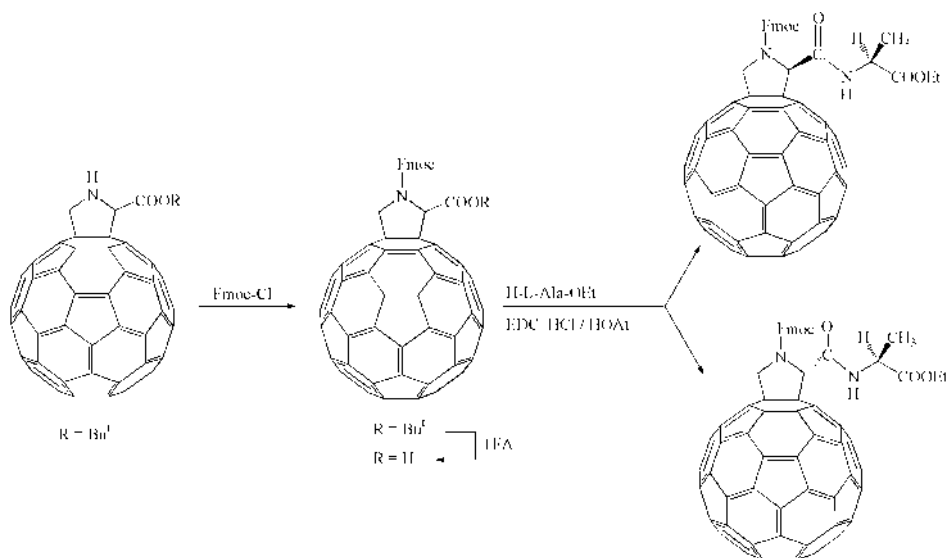


Рис. 22. Схема получения диастереомерных дипептидов [63].

Пелларини с соавт. [64] впервые провели твердофазный пептидный синтез. Для проведения реакции аддукт C_{60} , содержащий свободную аминогруппу, конденсировали с α -*tert*-бутиловым эфиром *N*-Fmoc-L-глутаминовой кислоты с получением фуллеропептида Fgu-(Gly-Orn)₆-Gly-NH₂, где Fgu — фуллеропирролидино-глутаминовая кислота (Рис. 23). Полученное соединение было охарактеризовано с помощью масс-спектрометрии и УФ-спектроскопии.

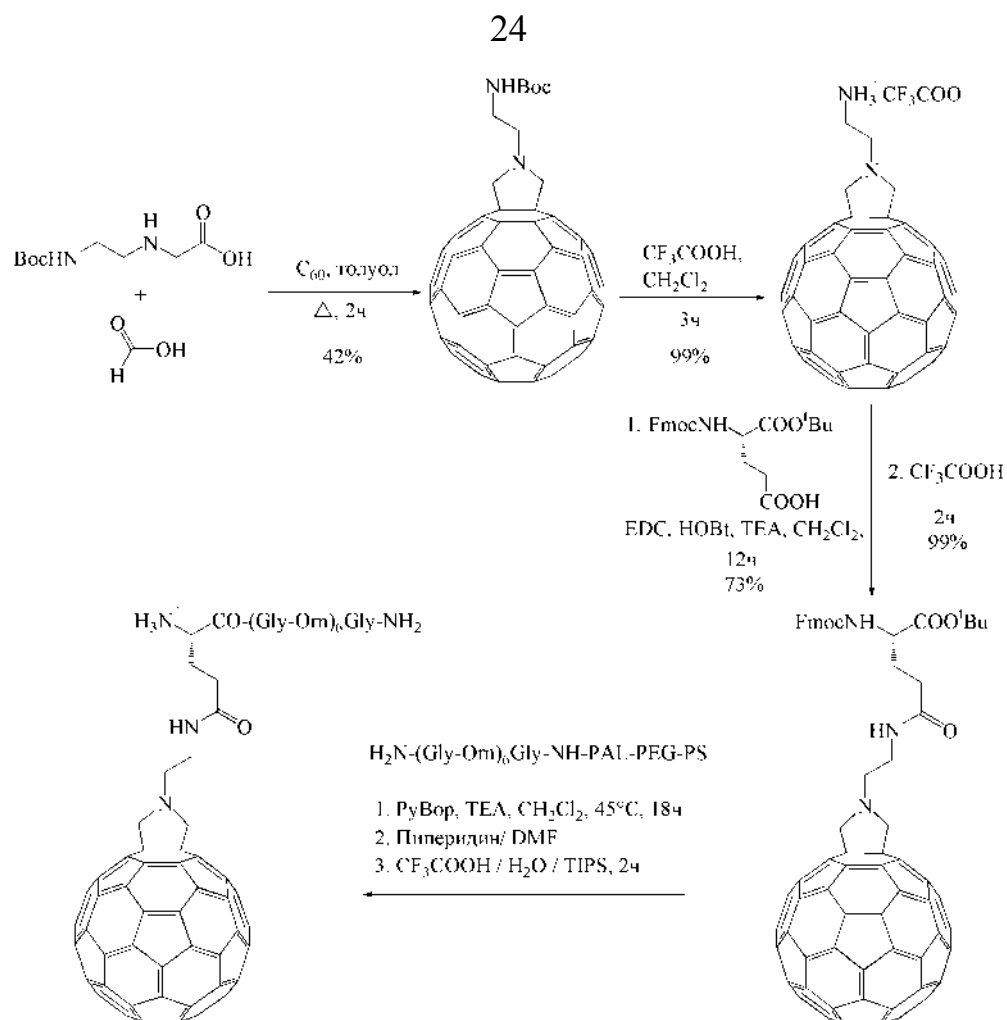


Рис. 23. Схема получения Fgu-(Gly-Orn)₆-Gly-NH₂ [64].

Пантаротто с соавт. [65] провели систематическое изучение твердофазного синтеза двух классов фуллеренсодержащих пептидов на основе Fgu кислоты (Рис. 24).

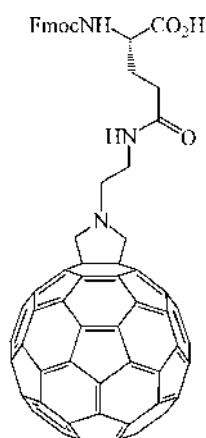


Рис. 24. Fgu кислота [65].

Реакции синтеза пептидов проводились с использованием различных смол для анализа роли твёрдой подложки на выход реакции (Табл. 1). Первый класс пептидов (1–3) состоял из аналогов природного опиоидного пептида

Leu⁵-Enkephalin (H-Tyr-(Gly)₂-Phe-Leu-NH₂ и H-Tyr-(Gly)₂-Phe-Leu-OH). Как видно из Табл. 1, в пептидах (1–3) авторы заменяли гидрофобные остатки Tyr¹ и Phe⁴ кислотой Fgu. Второй класс пептидов (4–6) включал катионные пептиды различной длины, в которых остаток Fgu кислоты был введён либо в положение N-концевой группы, либо в середину последовательности, для оценки влияния положения фуллеренового кора на биологическую активность фуллеренсодержащих пептидов. Полученные соединения были охарактеризованы с помощью методов масс-спектрометрии.

Табл. 1. Fgu-содержащие пептиды, синтезированные с использованием различных смол [65].

№	Синтезированные пептиды	Смола ^a	Выход продукта
1	H-Tyr-(Gly) ₂ - Fgu -Leu-NH ₂	PAL-PEG-PS	<25 %
2	H-Tyr-(Gly) ₂ - Fgu -Leu-OH	NovaSyn-HMP POEPOP HMP	<25 %
3	H- Fgu -(Gly) ₂ -Phe-Leu-NH ₂	PAL-PEG-PS POEPOP HMP	48 %
4	H- Fgu -(Nle) ₂ -Gln-Orn-Nle-Gly-(Orn) ₂ -Nle-(Orn) ₂ -Nle-Gly-(Orn) ₂ -Nle-Gly-Tyr-NH ₂	PAL-PEG-PS	88 %
5	H-Gly-(Nle) ₂ -Gln-Orn-Nle-Gly-(Orn) ₂ - Fgu -(Orn) ₂ -Nle-Gly-(Orn) ₂ -Nle-Gly-Tyr-NH ₂	PAL-PEG-PS	46 %
6	H-Gly-Orn-Gly- Fgu -Gly-Orn-Gly-NH ₂	PAL-PEG-PS POEPOP HMP	49 %

^aТип смолы, использованной для твердофазного синтеза пептида.

Бьянко с соавт. [17] описали метод твердофазного синтеза аналога белка гистона H3, содержащего L-фуллеропирролидино-глутаминовую кислоту. Для получения соединения авторы заменили фрагмент Glu68 на Fgu (Рис. 25). Полученное соединение было охарактеризовано с помощью УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии.

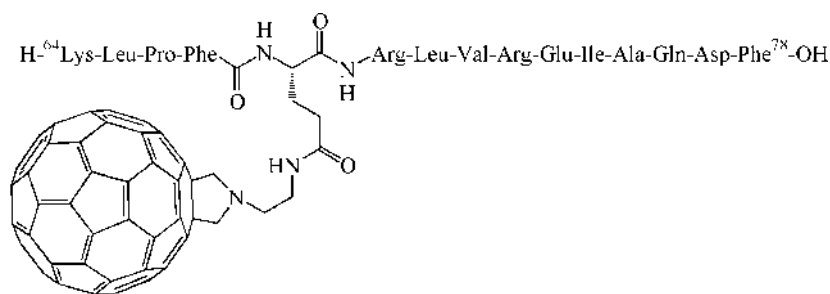


Рис. 25. Аналог гистона Н3, содержащий L-фуллеропирролидино-глутаминовую кислоту [17].

Сюй с соавт. [66] получили аддукты фуллерена C_{60} с тафтсином (Thr-Lys-Pro-Arg). Актуальность данного исследования связана с изучением влияния фуллеренового кора на иммуномодулирующее действие исследуемого тетрапептида. В зависимости от условий проведения реакции получали два конъюгата: NH_2 -Thr-Lys-Pro-Arg- C_{60} (Рис. 26а) и C_{60} -Thr-Lys-Pro-Arg-COOH (Рис. 26б). Полученные соединения были охарактеризованы с использованием масс-спектрометрии.

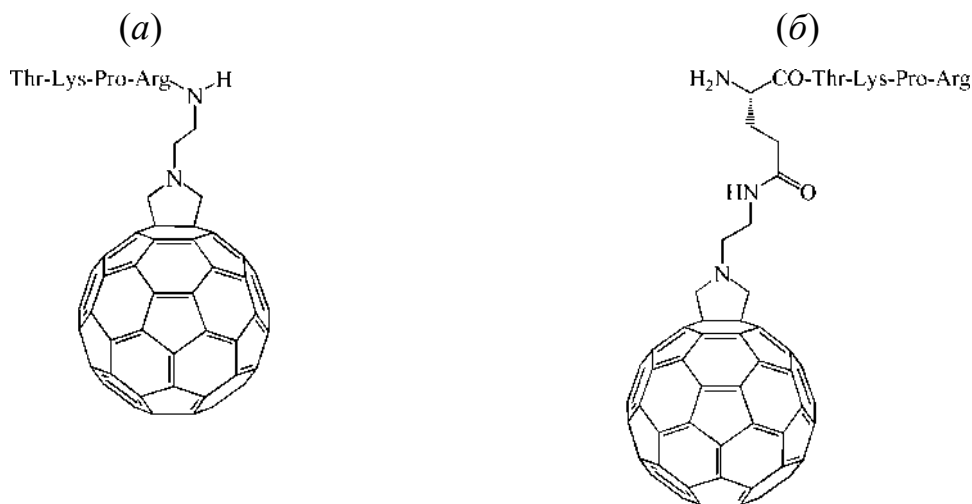


Рис. 26. Аддукты NH_2 -Thr-Lys-Pro-Arg- C_{60} (а) и C_{60} -Thr-Lys-Pro-Arg-COOH (б).

Досталова с соавт. [67] синтезировали шесть модификаций пептида максимина Н5 посредством замещения остатка L-аспарагиновой кислоты следующими аминокислотами: L-гистидином, L-тирозином, L-аланином, глицином или L-валином. Далее авторы провели конъюгирование полученных соединений с карбоксилированным фуллереном C_{60} . Для связывания пептидов поверхность фуллерена C_{60} активировалась азотной или тримезиновой кислотами. Было установлено, что модификация фуллерена тримезиновой кислотой приводит к

образованию большего числа карбоксильных групп на поверхности фуллерена C_{60} , что позволяет увеличить количество связанного с фуллереном пептида. Авторы провели физико-химическое изучение водных растворов, синтезированных конъюгатов и получили концентрационные зависимости распределения частиц по размерам и значения дзета-потенциалов.

Дженепалли с соавт. [68] синтезировали фуллеренилдигидропиррольные пептиды (Рис. 27 *a–e*) из моно- и бис[60]фуллеренидигидропирролкарбоновых пептидов. Соединения были охарактеризованы методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

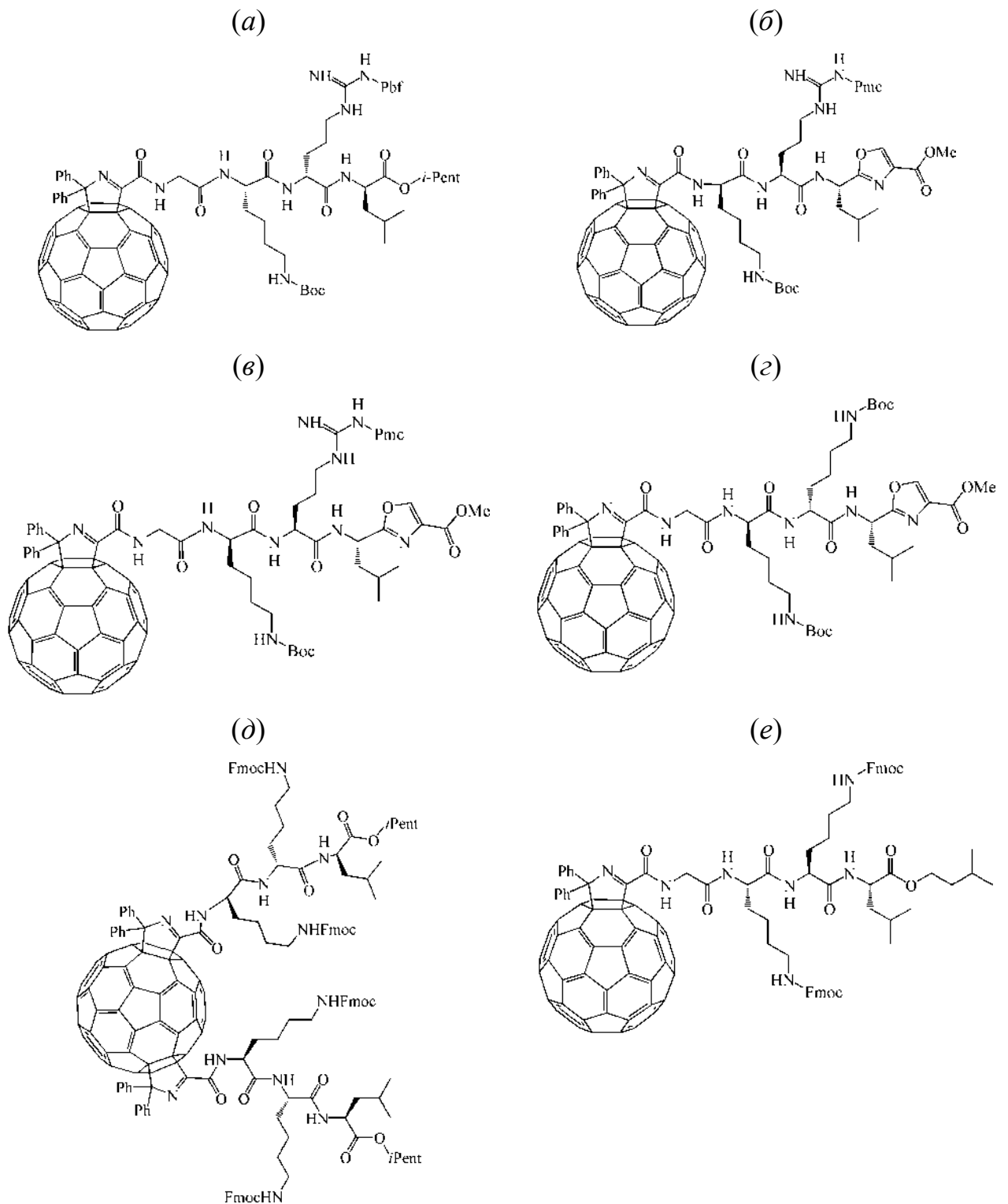


Рис. 27. Фуллеренилдигидропиррольные пептиды из моно- и бис[60]фуллерендигидропирролкарбоновых пептидов: защищённые фуллеренильные пептиды (a–c), дипептид (d) и пептид (e).

Софоу с соавт. [16] в результате четырёхстадийного синтеза получили фуллеренпептид, обогащённый Pro (Рис. 28). Соединение было охарактеризовано методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

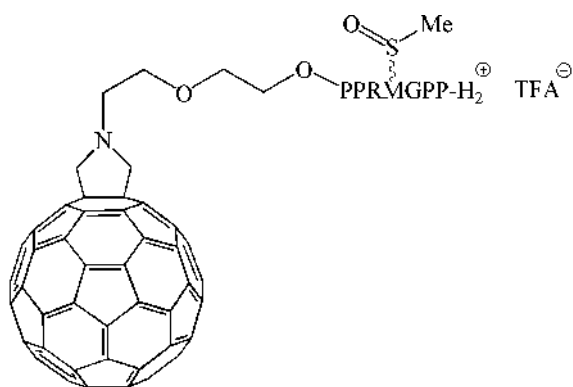


Рис. 28. Фуллеренпептид, обогащенный Pro [16].

Аруа с соавт. [69] в результате проведения реакции Прато с последующим снятием *tert*-бутильной защиты получили аддукт фуллеропирролидина (Рис. 29) и на его основе был синтезирован фуллеродипептид (Рис. 30).

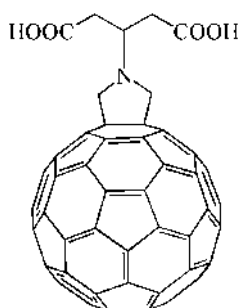


Рис. 29. Аддукт фуллеропирролидина [69].

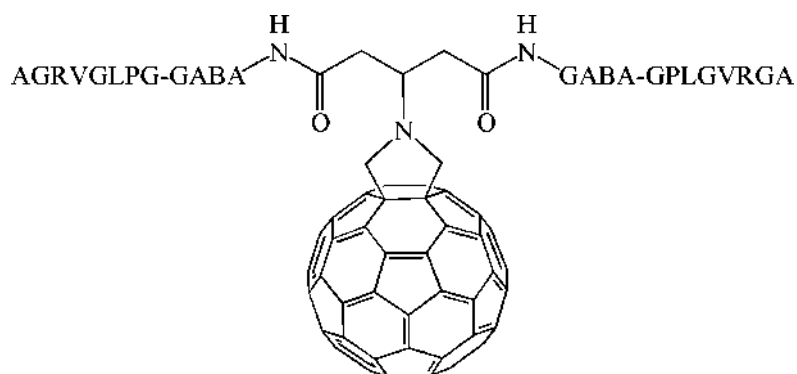


Рис. 30. Фуллеродипептид [69].

Полученное соединение (Рис. 30) было охарактеризовано с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Стром с соавт. [70] получили два *N*-Boc- и *N*-Fmoc защищённых аза- и азиридино-аддуктов фуллерена с L-лизином и L-фенилаланином при взаимодействии фуллерена C₆₀ с азидными производными L-лизина и L-фенилаланина. После снятия защиты с аза-производного L-фенилаланина была получена *аза*-

C_{60} -Phe кислота (Рис. 31), которую подвергали взаимодействию с *трет*-бутиловым эфиром глицина с образованием дипептида (Рис. 32).

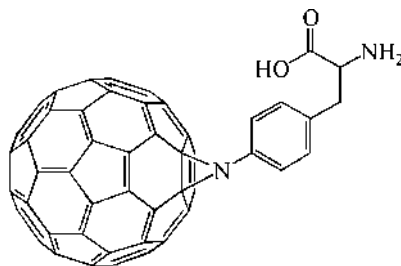


Рис. 31. Аза- C_{60} -Phe кислота [70].

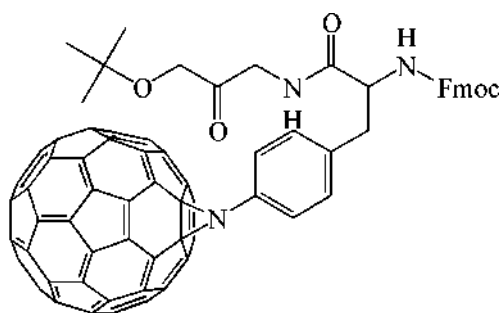


Рис. 32. Конъюгат азиридинофуллерена с дипептидом, содержащим защитные группы [70].

Полученные производные были охарактеризованы с помощью ЦВ и УФ-спектроскопии.

Цумото с соавт. [71] описали синтез эфиров *N*-гидроксисукцинимидов C_{60} из метанофуллеренкарбоновых кислот. В случае использования катализатора ДМАР такие эфиры избирательно реагируют с амино- или гидроксигруппами аминокислоты, или пептида с получением различных аддуктов (Рис. 33). Полученные соединения были охарактеризованы с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.



R = H, n=0, Gly/Gly-Gly-Gly/Z-Lys/Bz-Gly-Lys/Gly-Gly-Tyr-Arg/Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
 R = C₆H₅, Gly/Gly-Gly-Gly/Z-Lys/Bz-Gly-Lys/Gly-Gly-Tyr-Arg/Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
 R = C₆D₅, n=3, Gly
 R = C₆H₄Br, n=3, Gly

Z и Bz - защитные группы карбаматного типа

Рис. 33. Аддукты *N*-гидроксисукцинимида C₆₀, полученные из метанофуллерен-карбоновых кислот [71].

Рейриз с соавт. [72] разработали метод синтеза пептидных нанотрубок двух типов из α,γ -циклических октапептидов, связанных с метанофуллереном. Для этого гидрофильные аминокислоты вводили в реакцию твердофазного пептидного синтеза с использованием смолы Ванга. Далее полученные циклические октапептиды участвовали в сборке нанотрубок. Авторами было показано, что фуллереновые фрагменты могут располагаться на одной стороне трубки (модель *a*) или на двух (модель *б*) (Рис. 34). Полученные соединения были охарактеризованы с помощью методов АСМ, СТМ и ПЭМ. Было установлено, что синтезированные аддукты имеют перспективы применения при создании оптических и электронных устройств.

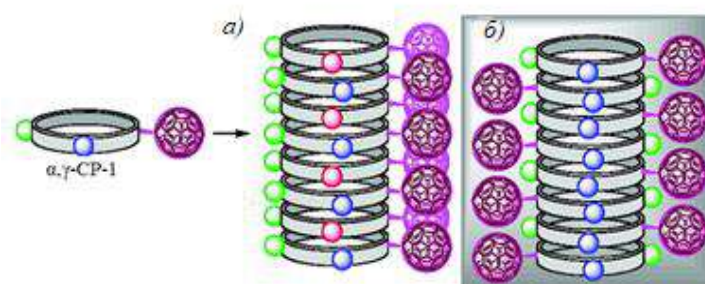


Рис. 34. Модель образования пептидной нанотрубки. Процесс самосборки может контролироваться ионными взаимодействиями между молекулами аминокислот (красные и синие шары) (*a*), а также индуцироваться поверхностными свойствами молекул фуллеренов (*б*) [72].

Гарбуйо с соавт. [73] описали твердофазный синтез двух типов 3_{10} -спиральных фуллеренпептидов, содержащих внутримолекулярные водородные связи $C-O \cdots H-N$ и нитроксильный радикал (Рис. 35).

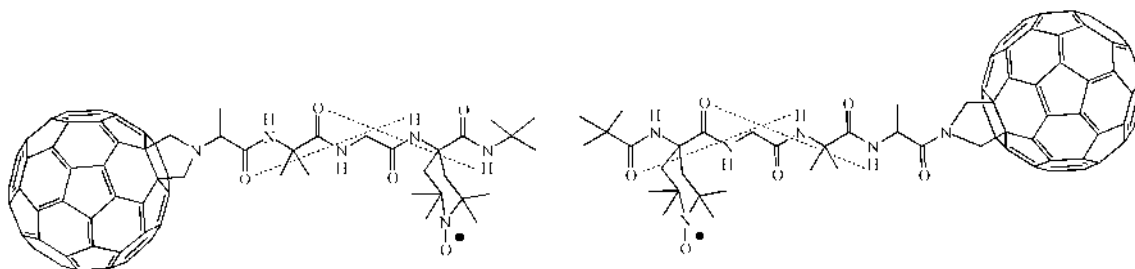


Рис. 35. Спиральные фуллеренпептиды [73].

Полученные пептиды были охарактеризованы с помощью методов ИК-, ЯМР- и ЭПР-спектроскопии.

Фуджи с соавт. [74,75] описали жидкофазный синтез двух циклических фуллеропептидов с полиэтиленгликолевой цепью: (cyclo8-C₆₀+PEG) (Рис. 36а) и (C₆₀+PEG) (Рис. 36б).

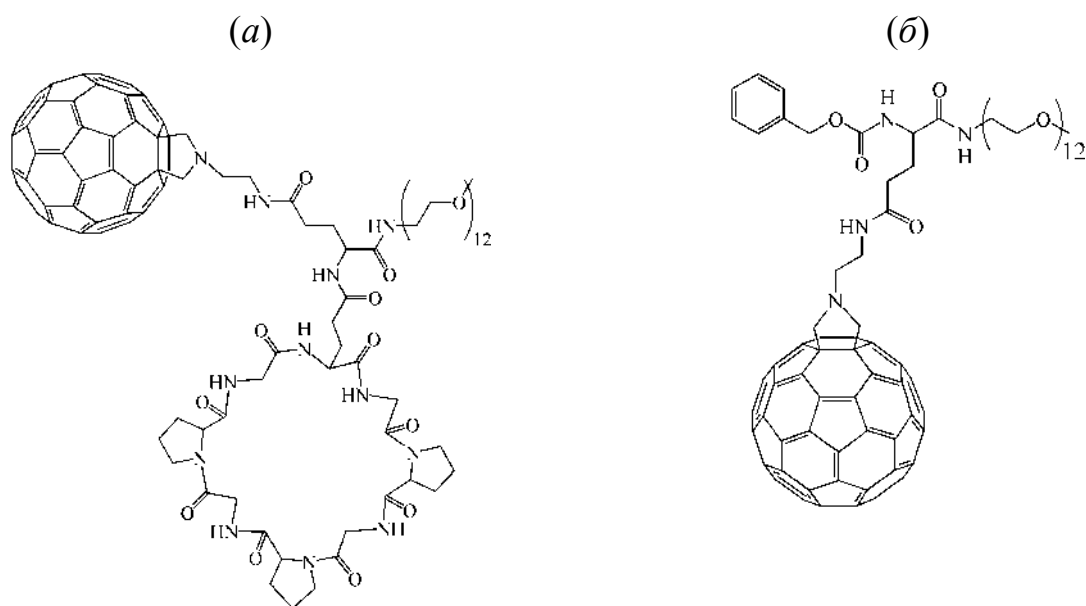


Рис. 36. Фуллеропептиды с полиэтиленгликолевой цепью: (cyclo8-C₆₀+PEG) (а) и (C₆₀+PEG) (б) [74,75].

В результате связывания C₆₀-пирролидиновой *трис*-кислоты с *N*-концом пептида, содержащим гексагистидины, был получен пептид H₂NGSGA₃GLSH₆ (Рис. 37) [76]. Полученное соединение было охарактеризовано с использованием ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

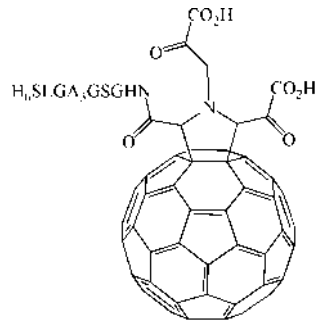


Рис. 37. Пептид $H_2NGSGA_3GLSH_6$ [76].

Минуа с соавт. [77] предложили новый способ получения аминокислотных и пептидных аддуктов фуллеренов путем гидрофосфинирования с использованием вторичного фосфин-борана в качестве сшивающего агента (Рис. 38). Полученные соединения были охарактеризованы методом ЯМР-спектроскопии. Дополнительно были изучены электрохимические свойства полученных аддуктов.

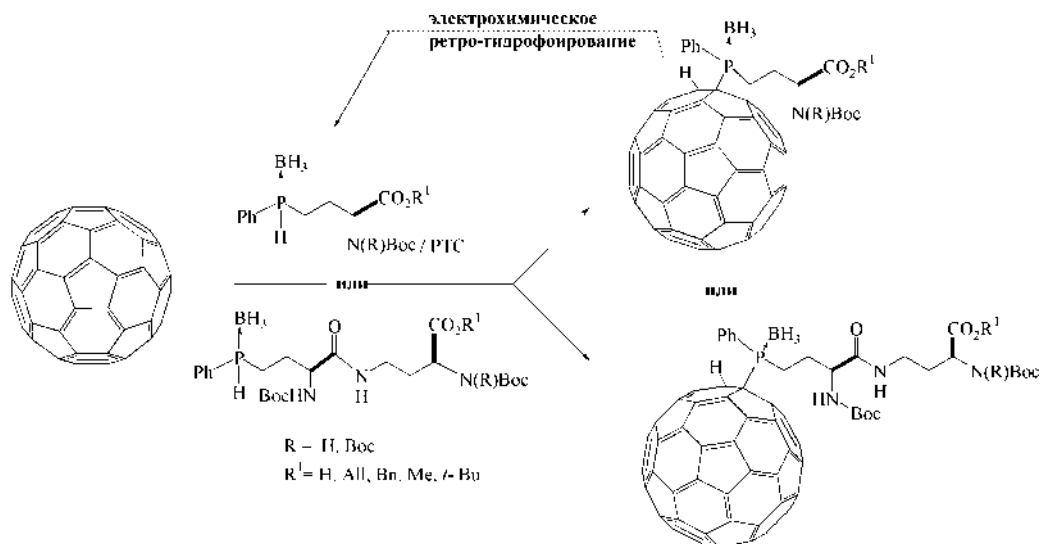


Рис. 38. Схема получения аминокислотного и пептидного аддуктов C_{60} с использованием реакции гидрофосфинирования [77].

Съеппи с соавт. [78] разработали метод получения наночастиц C_{60} , модифицированных лизоцимом, выделенным из куриного яичного белка курицы (HEWL), а также лизоцимом, в котором цистеиновые группы были проалкилированы 3-бромпропиламином, в результате чего были введены восемь дополнительных положительных зарядов. Авторы провели физико-химическое изучение полученных наночастиц и их водных дисперсий методами АСМ, ПЭМ, ДРС и УФ-спектроскопии, также были рассчитаны значения ζ -потенциалов. В

результате проведённых исследований, были найдены эффективные солюбилизирующие агенты, позволяющие без использования ароматических растворителей, полимеров или поверхностно-активных веществ создавать биологически активные дисперсии фуллеренов.

Чен с соавт. [79] получили конъюгат фуллерена с бычьим тиреоглобулином (Рис. 39). Полученный конъюгат был охарактеризован с помощью УФ-спектроскопии.

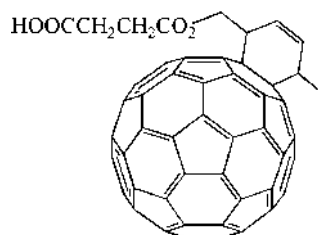


Рис. 39. Конъюгат фуллерена с бычьим тиреоглобулином [79].

Беньямини с соавт. [80] провели исследования взаимодействия фуллерена C₆₀ и C₃-изомера C₆₀-трисмалоновой кислоты с четырьмя белками: протеазой ВИЧ, фуллерен-специфическим антителом, ЧСА и бычьим сывороточным альбумином с использованием алгоритма PatchDock. Методом MultiBind авторами была установлена корреляция между физико-химическими свойствами и геометрией поверхности для сайтов связывания фуллерена с протеазой ВИЧ, ЧСА и бычьим сывороточными альбуминами.

1.2. Физико-химические свойства фуллеренов с аминокислотами и пептидами

1.2.1. Термодинамические свойства фуллеренов и их аддуктов

Изучение термодинамических свойств фуллеренов представляет собой весьма актуальную задачу, так как они являются фундаментальными характеристиками вещества и необходимы для решения разного рода теплофизических и технологических задач. Рассмотрим основные термодинамические свойства фуллерена C₆₀. Значения энтальпий сгорания ($\Delta_c H^\circ$, кДж·моль⁻¹) и образования ($\Delta_f H^\circ$ кДж·моль⁻¹) фуллерена C₆₀ при 298,15 К и стандартном давлении, а также значения энтропии ($\Delta_f S^\circ$, Дж·моль⁻¹·К⁻¹), энергии Гиббса ($\Delta_f G^\circ$, кДж·моль⁻¹) и

логарифма константы равновесия ($\lg K_f^0$) реакции образования фуллерена C_{60} из графита приведены в Табл. 2.

Табл. 2. Значения энтальпий сгорания и образования фуллерена C_{60} при 298,15 К и стандартном давлении, а также энтропия, энергия Гиббса и логарифм константы равновесия реакции образования фуллерена C_{60} из графита [81].

$\Delta_c H^\circ,$ кДж·моль ⁻¹	$\Delta_f H^\circ,$ кДж·моль ⁻¹	$\Delta_f S^\circ,$ Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	$\Delta_f G^\circ,$ кДж·моль ⁻¹	$\lg K_f^0$
-25937±17	2327±16	420,8±1,2	2202±17	0,306

На Рис. 40 представлена температурная зависимость изобарной теплоёмкости фуллерена C_{60} .

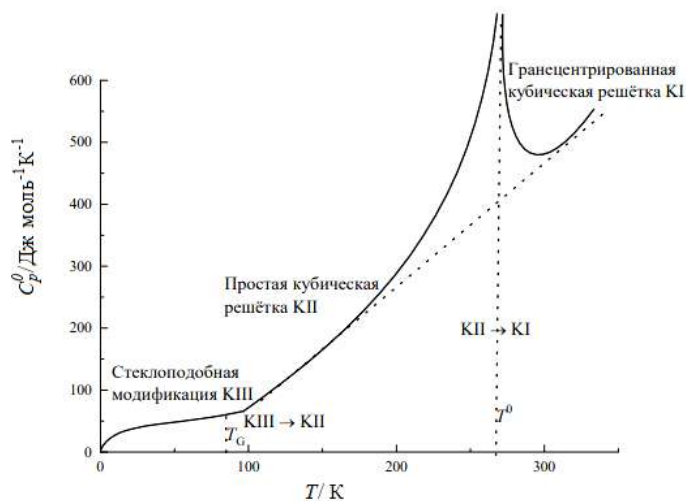


Рис. 40. Температурная зависимость изобарной теплоёмкости фуллерена C_{60} .

Анализ Рис. 40 позволяет сделать вывод о том, что в зависимости от температуры фуллерен C_{60} существует в трех физических состояниях: (i) в форме пластических кристаллов (KI), имеющих гранецентрированную кубическую решётку, в узлах которой молекулы C_{60} совершают практически свободное вращение; (ii) в форме кристаллов (KII), обладающих простой кубической решёткой и характеризующиеся ориентационным упорядочением молекул C_{60} ; (iii) в форме стеклоподобных кристаллов (KIII). Установлено, что в температурном диапазоне 0–340 К наблюдается два фазовых перехода: фазовый переход второго рода KIII→KII (при 86 К) и фазовый переход первого рода KII→KI (при 260,7 К).

К настоящему времени в литературе представлено не так много данных о термодинамических свойствах аддуктов фуллеренов. Остановимся на основных результатах. В работе [82] авторы изучили температурную зависимость теплоёмкости C_p^o гидрофуллерена $C_{60}H_{36}$ в области 4,8–340 К. Было установлено, что зависимость C_p^o от T не имеет каких-либо аномалий. В работах [83–85] представлены результаты термодинамического изучения аддуктов лёгких фуллеренов с L-лизинном, а также водорастворимых фуллеренолов $C_{60}(OH)_{40}$ и $C_{70}(OH)_{12}$ в широком диапазоне температур. На основании экспериментальных данных по температурной зависимости изобарной теплоёмкости были рассчитаны стандартные термодинамические функции соединений (энтропия $S_m^o(T)$, энтальпия $[H_m^o(T) - H_m^o(0)]$ и энергия Гиббса $[\Phi_m^o(T) - \Phi_m^o(0)]$).

В качестве примера на Рис. 41 представлена температурная зависимость изобарной теплоёмкости фуллеренола $C_{60}(OH)_{40}$, а также температурные зависимости изобарной теплоёмкости изомеров $C_{60}(OH)_{40}$ с равномерным распределением гидроксильных групп, и изомера, в котором гидроксильные группы расположены в экваториальной области («Saturn-like»), рассчитанные методом DFT. Видно, что в отличие от фуллерена C_{60} , на температурной зависимости изобарной теплоёмкости не наблюдается фазовых переходов.

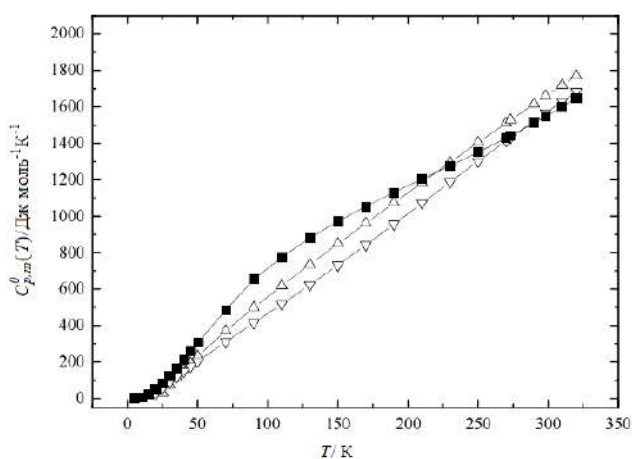


Рис. 41. Температурная зависимость изобарной теплоёмкости $C_{60}(\text{OH})_{40}$ в интервале температур $T = 5\text{--}326$ К. ■ — экспериментальные данные, ∇ — расчёт методом DFT для фуллеренола с равномерным распределением гидроксильных групп; \square — расчёт методом DFT для фуллеренола, в котором гидроксильные группы расположены в экваториальной области («Saturn-like»).

1.2.2. Физико-химические свойства водных растворов аддуктов фуллеренов с аминокислотами и пептидами

Анализ литературы показывает ограниченное число работ, посвящённых физико-химическому изучению водных растворов аддуктов лёгких фуллеренов с аминокислотами и пептидами, а также изучению фазовых равновесий в системах, содержащих указанные аддукты. Кратко остановимся на основных полученных результатах.

В работах [86–88] проведено изучение степени ассоциации аддуктов фуллеренов в зависимости от концентрации и природы заместителя для водных растворов следующих аддуктов фуллеренов: аддуктов C_{60} с аминокислотами (глицин, L-аланин) и пептидами (глицил-глицин, глицил-L-аланин, глицил-L-валин и L-аланил-L-аланин), содержащих свободную карбоксильную группу [89]; метиловых эфиров пептидсодержащих малеимидофуллеренов (*N*-малеимидофуллеренил-L-валил-L-валин, *N*-малеимидофуллеренил-L-аланил-L-лейцин, *N*-малеимидофуллеренил-DL-аланил-DL-аланин, *N*-малеимидофуллеренилглицил-L-валин, *N*-малеимидофуллеренил-L-валил-L-валил-L-валин) [87]; моно- и дивалентных аддуктов C_{60} с пропионовой, γ -аминомасляной и ε -

аминокапроновой кислотами (натриевая соль *N*-моногидрофуллеренил- ω -аминокапроновой кислоты, *N*-моногидрофуллере-нил- γ -аминобутират натрия, *L-N*-моногидрофуллеренилпропионат натрия, *N-2*-гидроксиэтилфуллеренил- ω -аминокапроат натрия, метил-*N-2*-гидроксиэтилфуллере-нил- ω -аминокапроат, *N-2*-гидроксиэтилфуллеренил- γ -аминобутират натрия, мет-ил-*L-N-2*-гидроксиэтилфуллеренилпропионат, метил-*L-N-2*-нитроксиэтилфуллерен-илпро-пионат, 2-нитроксиэтил-*L-N-2*-нитроксиэтилфуллеренпропионат, 2-нитрокс-иэтил-*L-N-2*-гидроксиэтилфуллеренилпропионат) [88].

Тимофеева с соавт. [89] провели изучение степени ассоциации аддуктов C_{60} с аминокислотами и пептидами (*N*-моногидрофуллеренил-DL-серин, *N*-моногидро-фуллеренил-L-аргинин, *N*-моногидрофуллеренил-DL-аланил-DL-аланин и *N*-моно-гидроф-уллеренил-L-аланин) в водных растворах в зависимости от рН, ионной силы и концентрации.

Отдельного внимания заслуживает термодинамический подход, предложенный профессором СПбГТИ (ТУ) Н. А. Чарыковым для расчёта избыточных термодинамических функций и концентрационной границы термодинамической устойчивости растворов водорастворимых аддуктов фуллеренов относительного фазового разделения, в том числе аддуктов лёгких фуллеренов с аминокислотами. Указанный подход основан на использовании полуэмпирической модели VD-AS (Virial Decomposition Asymmetric Model), основанной на вириальном разложении избыточной молярной энергии Гиббса раствора по мольным долям компонентов:

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

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

тированы 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.

Авторами работы [90] были получены следующие уравнения для расчёта коэффициентов активности аддуктов фуллеренов (нижний индекс l) и растворителя (нижний индекс 2) в «асимметричной» шкале нормировки:

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

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

где $\Lambda_i(T) = \sum_{j=1} \lambda_{ij}$.

На основе уравнений 2, 3 может быть получено условие устойчивости растворов аддуктов фуллеренов относительно фазового разделения (расслаивания):

$$g_{11}^{mix} = \frac{\partial^2 \left(\frac{G^{mix}}{RT} \right)}{\partial x_1^2} = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1 = 0 \quad (4).$$

Уравнение 4 является кубическим уравнением, которое можно разрешить относительно x_1 по формуле Кардано. На Рис. 42, в качестве, примера представлены концентрационные зависимости коэффициентов активности водных растворов аддуктов фуллеренов с L-гидроксипролином ($C_{60}(C_5H_9NO_3)_2$) и L-лизинном ($C_{60}(C_6H_{14}N_2O_2)_2$, $C_{70}(C_6H_{14}N_2O_2)_3$). На Рис. 43 представлены концентрационные зависимости функции $F(x_1) = 12\Lambda_4 x_1^3 + 6\Lambda_3 x_1^2 + 2\Lambda_2 x_1 + 1 = 0$ для бинар-

ных систем $C_{60}(C_5H_9NO_3)_2-H_2O$, $C_{60}(C_6H_{14}N_2O_2)_2-H_2O$ и $C_{70}(C_6H_{14}N_2O_2)_3-H_2O$ при 273,15 К.

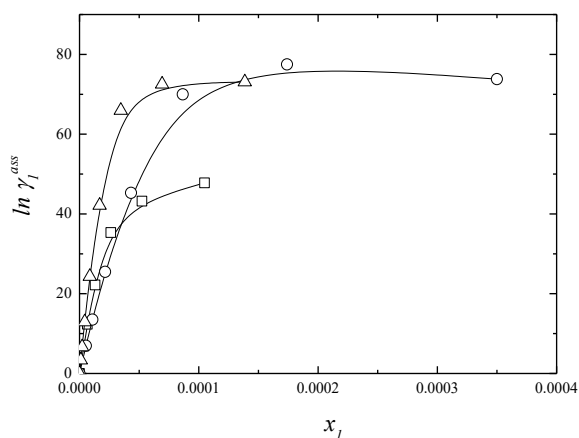


Рис. 42. Концентрационные зависимости функций $\ln \gamma_1^{ass}$ для бинарных систем $C_{60}(C_5H_9NO_3)_2-H_2O$ (\square), $C_{60}(C_6H_{14}N_2O_2)_2-H_2O$ (\circ), $C_{70}(C_6H_{14}N_2O_2)_3-H_2O$ (Δ) [90,91].

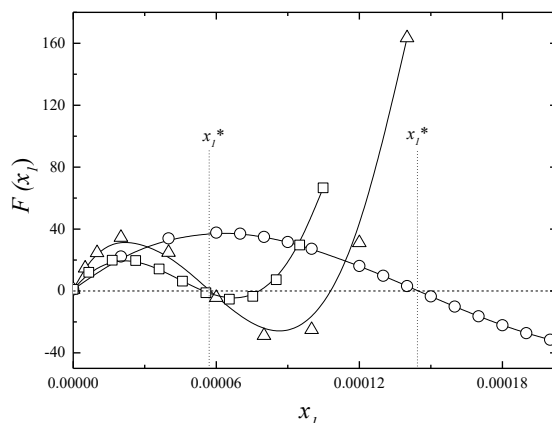


Рис. 43. Концентрационные зависимости функций $F(x_1) = 12A_4x_1^3 + 6A_3x_1^2 + 2A_2x_1 + 1 = 0$ для бинарных систем $C_{60}(C_5H_9NO_3)_2-H_2O$ (\square), $C_{60}(C_6H_{14}N_2O_2)_2-H_2O$ (\circ), $C_{70}(C_6H_{14}N_2O_2)_3-H_2O$ (Δ). x_1^* соответствует потере термодинамической устойчивости растворами аддуктов фуллеренов по отношению к разделению фаз [90,91].

На Рис. 43 хорошо видно пересечение функции $F(x_1)$ с осью абсцисс, точка пересечения (x_1^*) соответствует потере термодинамической устойчивости (расслаиванию раствора). При сравнении данных по динамическому светорассеянию с данными, полученными из независимых криометрических измерений,

можно с определённой уверенностью утверждать, что в указанных системах присутствуют три концентрационные зоны:

- (1) при $x_1 < x_1^*$ $x_1 \approx (0,8-1,5) \cdot 10^{-4}$ в растворах присутствуют только ассоциаты 1-го порядка с линейными размерами десятки нм и, возможно, в очень малых количествах мономерные гидратированные молекулы нанокластеров. Растворы являются термодинамически устойчивыми;
- (2) при сопоставимых значениях $x_1 \approx x_1^*$ в растворах помимо ассоциатов 1-го порядка появляются ассоциаты 2-го порядка с линейными размерами сотни нм, и растворы начинают терять устойчивость по отношению к фазовому разделению, иными словами растворы начинают предраслаиваться;
- (3) наконец, при $x_1 > x_1^*$ в растворах появляются ассоциаты 3-го порядка с линейными размерами единицы мкм и растворы начинают расслаиваться.

Анализ литературы показывает ограниченное число данных, посвящённых физико-химическим свойствам растворов водорастворимых аддуктов фуллеренов. Авторы работ [83–85,91–97] исследовали физико-химические свойства фуллеренолов, карбоксилированных фуллеренов, аддуктов фуллеренов с L-аминокислотами и получили экспериментальные данные по концентрационным зависимостям теплоёмкости, плотности, показателя преломления, электропроводности, константы диссоциации, кажущейся степени диссоциации, распределения частиц по размерам, коэффициентов диффузии, вязкости и др., а также изучили диаграммы растворимости в бинарных и тройных системах, содержащих водорастворимые аддукты фуллеренов. Авторы работ [98–105] изучили растворимость фуллеренолов $C_{60}(OH)_{22-24}$ и $C_{70}(OH)_{12}$ в воде в интервале температур 293–353 К, а также в тройных системах фуллеренол $C_{60}(OH)_{22-24}$ –неорганическая соль ($Pr(NO_3)_3$, YCl_3 , $CuCl_2$, UO_2SO_4)–вода. В качестве примера на Рис. 44 представлены экспериментальные данные по растворимости в бинарных системах фуллеренол-вода.

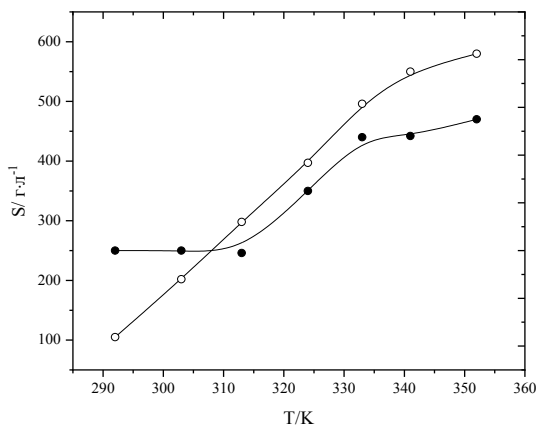


Рис. 44. Температурные зависимости растворимости фуллеренолов ($C_{60}(\text{OH})_{22-24}$ (●), $C_{70}(\text{OH})_{12}$ (○)) в воде. S — объёмная концентрация фуллеренолов в насыщенном растворе.

Из Рис. 44 следует, что растворимость фуллеренолов монотонно увеличивается с ростом температуры, при этом формы кривых $S(T)$ имеют сигмоидный характер сложными. Данный экспериментальный факт не является удивительным, так как аналогичные зависимости были получены для бинарных систем C_{70} -*o*-ксилол (на ветви кристаллизации C_{70}) и C_{60} - α -хлор(бром)нафталин (ветвь кристаллизации сольватированного фуллерена) [106,107].

В работе [108] методом изотермического насыщения в ампулах изучена растворимость *бис*-аддуктов лёгкого фуллерена C_{60} и незаменимых аминокислот: лизина, треонина и оксипролина — $C_{60}(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2)_2$, $C_{60}(\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}_3)_2$, $C_{60}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2)_2$ в воде в интервале температур 20–80 °С. Политермы растворимости содержат по одной нонвариантной точке, отвечающей насыщению сразу двумя твёрдыми фазами — кристаллогидратом и безводным *бис*-аддуктом.

1.3. Биомедицинское исследование аддуктов фуллеренов с аминокислотами, пептидами и белками

Кратко остановимся на описании биологической активности аддуктов фуллеренов с аминокислотами и пептидами [96].

Котельникова с соавт. [34] изучили ингибирующее действие аддукта фуллерена C_{60} - ϵ -аминокапроат натрия (Рис. 2) в отношении протеазы ВИЧ в экспе-

риментах *in vitro*. Было установлено, что аддукт C₆₀-ε-аминокапроат натрия ингибирует протеазу ВИЧ.

Стром с соавт. [109] изучили ингибирующее действие трипептидов (Рис. 45а–в): Fmoc-Phe(4-аза-C₆₀)-Lys₃-OH, Fmoc-Phe(4-аза-C₆₀)-Pro-Нур-Lys-OH, Fmoc-Phe(4-аза-C₆₀)-Нур-Нур-Lys-OH в отношении протеазы ВИЧ-1 (Рис. 45).

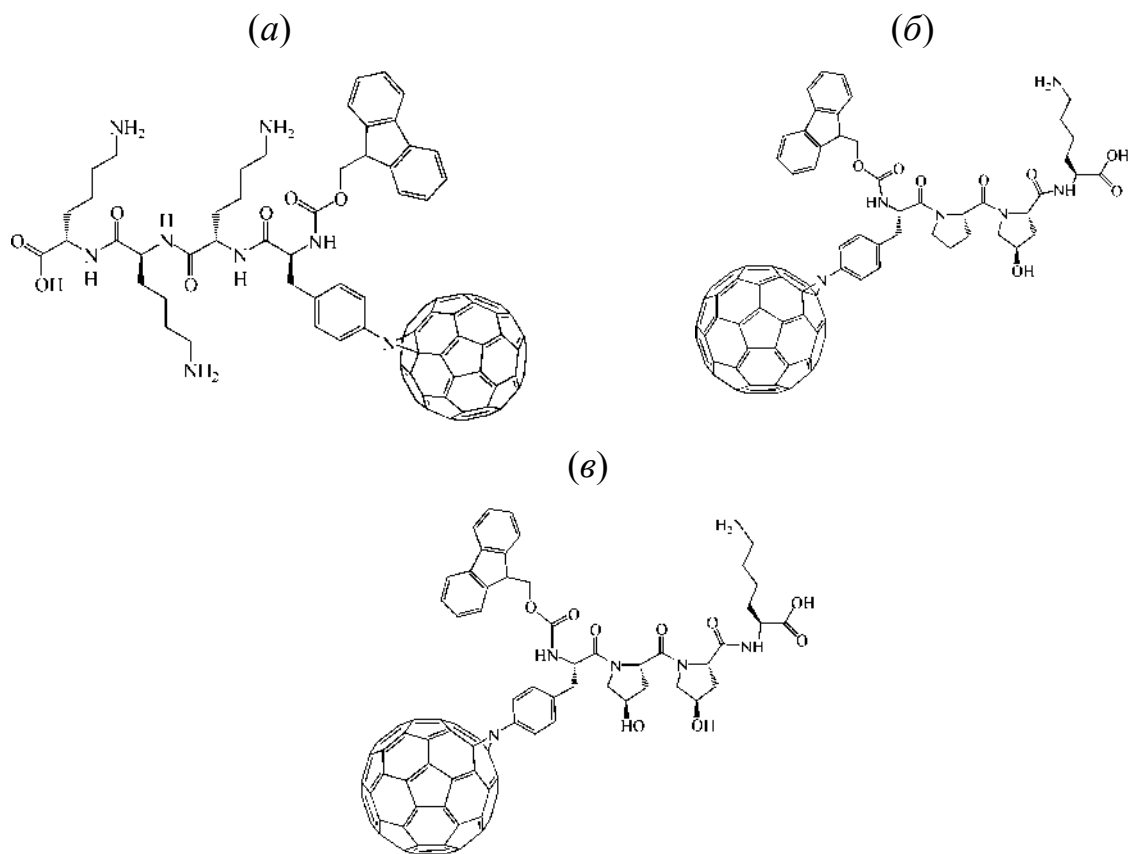


Рис. 45. Структурные формулы аддуктов: Fmoc-Phe(4-аза-C₆₀)-Lys₃-OH Fmoc-Phe(4-аза-C₆₀)-Lys₃-OH (а), Fmoc-Phe(4-аза-C₆₀)-Pro-Нур-Lys-OH (б) и Fmoc-Phe(4-аза-C₆₀)-Нур-Нур-Lys-OH (в) [109].

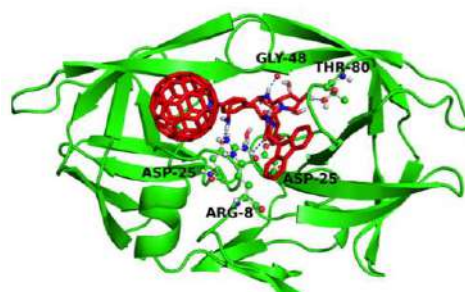


Рис. 46. Кристаллическая структура протеазы ВИЧ-1, содержащая Fmoc-Phe (4-аза-C₆₀)-Lys₃-OH (Рис. 45а) в активном центре фермента [109].

Было установлено, что аддукты представленные на Рис. 45а–в вызывают подавление активности протеазы ВИЧ-1. Наибольшее ингибирующее действие ($K_i = 76 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) показал аддукт Fmoc-Phe(4-аза- C_{60})-Нур-Нур-Lys-ОН (Рис. 45в) за счёт наличия в его аминокислотной последовательности наибольшего числа остатков Нур. Кроме этого, было показано, что аддукты (Рис. 45а–в) обладают более высокой величиной константы ингибирования (K_i (Рис. 45а) = $85 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$; K_i (Рис. 45б) = $120 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$; K_i (Рис. 45в) = $76 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) по сравнению с традиционно используемыми ингибиторами протеазы — ритонавиром (K_i ритонавира = $4,8 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$), саквинавиром (K_i саквинавира = $24 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) и атазанавиром (K_i атазанавира = $2,66 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) [110]. В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования, направленные на создание аддуктов C_{60} с пептидами, имеющими большую аффинность к протеазе ВИЧ-1.

В патенте [46] авторами было установлено, что гидратированные аддукты фуллерена C_{60} с кислотами с общей формулой $C_{60}(H)_3 \{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \cdot xH_2O$, где $n = 5-7$; $x = 8-10$, обладают противовирусной активностью в отношении ВПГ, вирусов гриппа различной природы, ВИЧ, а также противоопухолевой и противопсориазической активностью.

Машино с соавт. [23] изучили ингибирующее действие различных аддуктов фуллерена: C_{60} -дималоновая кислота; регио-изомеры C_{60} -бис(N,N -диметилпирролидиниум иодид) (Рис. 47а–в); смесь регио-изомеров C_{60} -бис(2-алкил- N,N -диметилпирролидиниум иодид) (Рис. 47г,д); смесь стерео-изомеров пролин-фуллерена (Рис. 47е,ж); в отношении обратной транскриптазы ВИЧ, а также провели сравнение биологической активности данных аддуктов с ингибитором невирапином, который активно применяется в клинической практике.

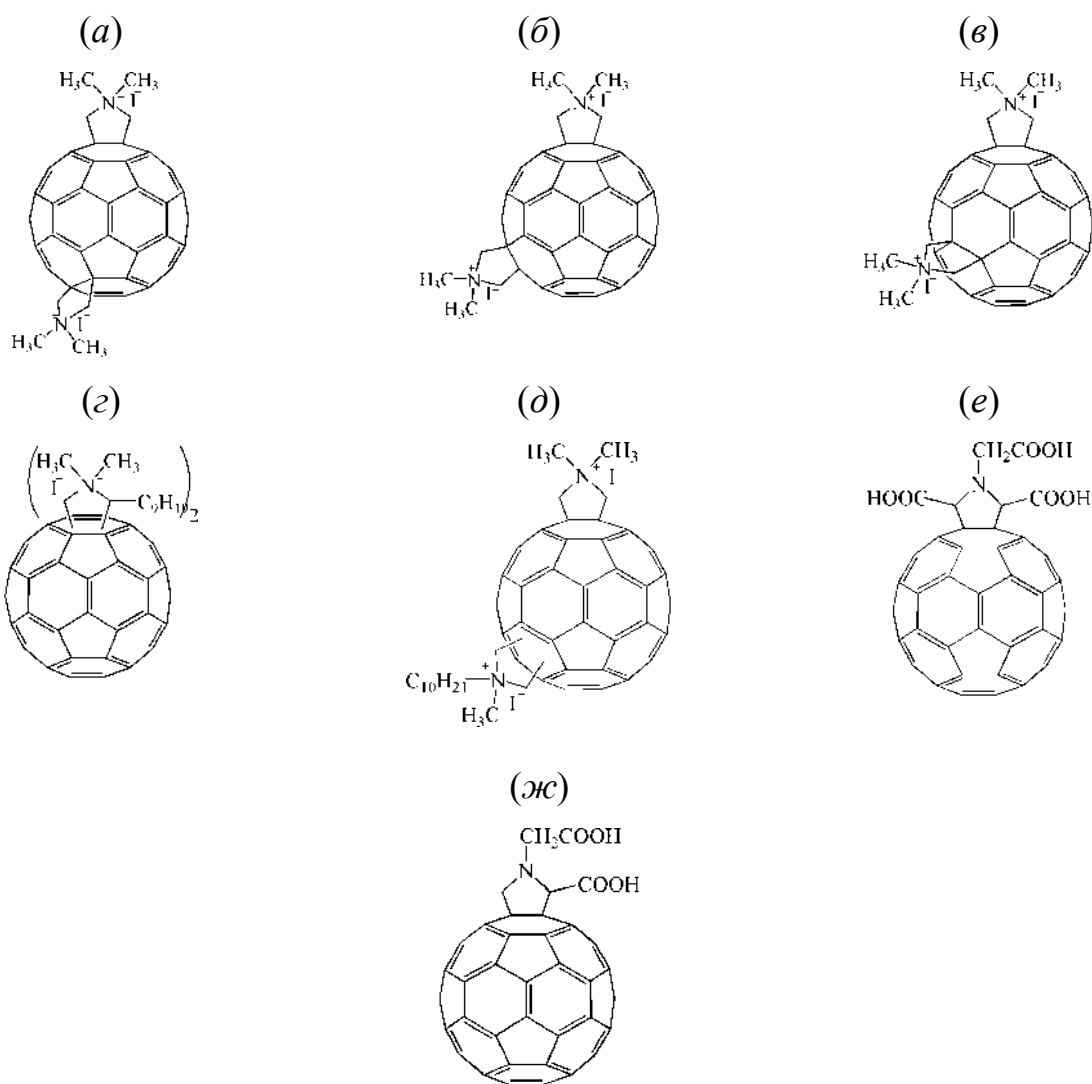


Рис. 47. Регио-изомеры C_{60} -бис(N,N -диметилпирролидиниум йодид) (а–в); смесь регио-изомеров C_{60} -бис(2-алкил- N,N -диметилпирролидиниум йодид) (г, д); смесь стерео-изомеров пролин-фуллерен (е, ж) [23].

Было установлено, что все аддукты фуллерена обладают ингибирующим действием, по сравнению с ненуклеозидным аналогом ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ невирапином. Наиболее высокую ингибирующую активность ($IC_{50} = 0,029$ мкМ) показал аддукт фуллерена с L-пролином (Рис. 47д). По мнению авторов работ [23,111], это объясняется тем, что биологическая активность аддуктов фуллерена с аминокислотами зависит от типа и положения заместителей в фуллереновом коре.

Важным преимуществом анти-ВИЧ препаратов на основе аддуктов фуллерена с аминокислотами является практически полное отсутствие выработки к ним резистентности у вирусов [112].

Помимо работ, связанных с ингибированием протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ, проводятся исследования эффектов аддуктов фуллеренов с аминокислотами на развитие ЦМВИ. В работах [35,36] была изучена противовирусная активность аддуктов фуллерена C_{60} с натриевыми солями γ -аминомасляной и ϵ -аминокапроновой кислот (см. Рис. 2) в отношении ЦМВИ, а также гибридных структур на основе аддукта фуллерена C_{60} с дипептидом карнозином (см. Рис. 2). Было установлено, что натриевая соль фуллерениламиномасляной кислоты более эффективно ингибирует развитие ЦМВИ по сравнению с клиническим препаратом для лечения ЦМВИ — ганцикловиром.

Котельникова с соавт. [35] впервые показали достоверную корреляционную зависимость между развитием ЦМВИ и интенсивностью ПОЛ в инфицированных клетках фибробластов лёгкого человека. Было установлено, что исследуемые аддукты фуллерена C_{60} с натриевыми солями γ -аминомасляной и ϵ -аминокапроновой кислот (см. Рис. 2) уменьшают количество образовавшегося малонового диальдегида в митохондриях. Известно, что малоновый диальдегид является одним из конечных продуктов ПОЛ и образуется при окислительной деградации жирных кислот. По накоплению малонового диальдегида можно судить об активации или ингибировании ПОЛ [113]. Наиболее эффективным антиоксидантом из всех аддуктов оказался аддукт фуллерена C_{60} с карнозином (см. Рис. 2); карнозин сам по себе менее эффективен, чем аддукт фуллерена C_{60} с карнозином.

Аддукты фуллерена C_{60} с натриевыми солями ϵ -аминокапроновой и γ -аминомасляной (см. Рис. 1) кислот обладают выраженной противовирусной активностью в отношении вируса герпеса, различных вирусов гриппа и ВИЧ [35,36]. Так, Халиков с соавт. [44] изучили противовирусную активность натриевых солей фуллеро-(C_{60}) аминокислот в отношении вируса H5N1 на модели клеточной линии РЕКС в экспериментах *in vitro*. Было показано, что данные соединения способны подавлять репликацию вируса H5N1. Вирулицидная активность соединений обусловлена прямой инаktivацией вирионов в популяции

вирусов, которые частично или полностью подавляют их инфекционную активность.

При определённых условиях многие из соединений фуллеренов способны, защищать клетки от различных видов излучений (ионизирующего, радиации) [114,115]. Возможность применения фуллеренов в фотодинамической терапии определяется как физико-химическими свойствами конкретного аддукта, так и условиями проведения эксперимента: время, мощность источника излучения, концентрация вещества, размеры наночастиц [114]. В настоящее время в данной области широко проводятся исследования аддуктов фуллерена C_{60} с аминокислотами. Ху с соавт. [31] изучили биологическое действие аддуктов фуллерена C_{60} с фолатином, L-фенилаланином и L-аргинином (см. Рис. 2)) в отношении опухолевых клеток линии HeLa. Было показано, что при облучении клеток HeLa видимым светом наблюдается снижение митохондриального мембранного потенциала, жизнеспособности клеток, активности ферментов СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, что приводит к активации каспазы-3 и, соответственно, запуску программы апоптоза.

Цзян с соавт. [38] изучили биологическое действие аддукта фуллерена C_{60} с глицином (см. Рис 2) в отношении клеточных линий HeLa и Lm8. Цитотоксичность сравнивалась для аддукта фуллерена C_{60} с глицином в различных концентрациях ($0-100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) на основании данных по ингибированию скорости роста клеточной линии Lm8, как показано на Рис. 48. Кроме того, в условиях *in vitro* с использованием клеточной линии HeLa сравнивали цитотоксичность при различной мощности излучения (Рис. 49).

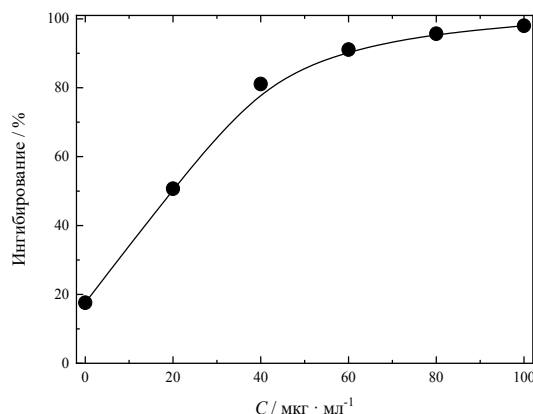


Рис. 48. Зависимость ингибирования роста клеточной линии HeLa от концентрации (0–100 мкг·мл⁻¹) в присутствии аддукта фуллерена C₆₀ с глицином [38].

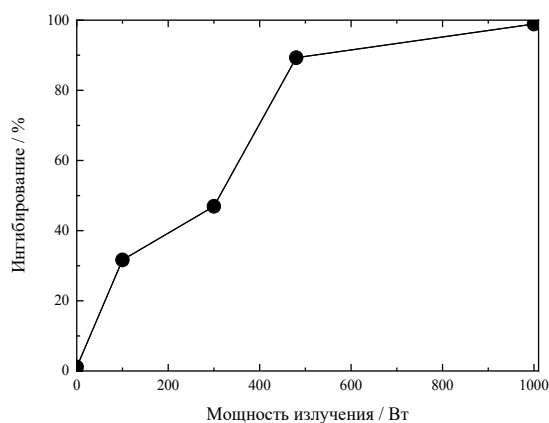


Рис. 49. Зависимость ингибирования роста клеточной линии Lm8 от мощности излучения ($\lambda = 500\text{--}600$ нм) в присутствии аддукта фуллерена C₆₀ с глицином [38].

В результате исследований, было установлено, что аддукт фуллерена C₆₀ с глицином при облучении ($\lambda = 500\text{--}600$ нм) вызывает гибель клеточных линий Lm8 и HeLa.

По мнению авторов, гибель клеток происходит, главным образом из-за повреждения фосфолипидов и белков клеточной мембраны. При облучении аддукт фуллерена C₆₀ с глицином переходит из возбуждённого синглетного состояния в возбуждённое триплетное состояние, которое впоследствии гасится кислородом переводя его в синглетное состояние. Затем синглетный кислород

моментально вступает в реакции с белками, нуклеиновыми кислотами и мембранными фосфолипидами, что приводит к повреждению и гибели клеток.

Ли с соавт. [39] изучили биологическое действие аддуктов фуллерена C_{60} с L-фенилаланином и глицином (см. Рис. 2). Было установлено, что данные аддукты могут выступать в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Исследование проводилось на клеточной линии SMMC-7721. Апоптотическая гибель клеток оценивалась через 30 мин, 24–72 ч после облучения; аддукты фуллерена C_{60} с L-фенилаланином и глицином использовались в концентрациях 80–300 мкг·мл⁻¹. Было установлено, что ингибирование клеточного деления в присутствии аддуктов фуллерена с аминокислотами значительно выше после 48 ч инкубации по сравнению с инкубацией клеток в течение 24 ч. Таким образом, результаты исследований показывают, что аддукты фуллерена C_{60} с аминокислотами могут рассматриваться как перспективные соединения для лечения онкологических заболеваний.

Ху с соавт. [61] изучили биологическую активность C_{60} -GluEG (см. Рис. 20) в отношении клеточной линии HeLa при различных концентрациях и времени инкубации 12 и 24 ч. Исследование показало, что C_{60} -GluEG обладает низкой цитотоксичностью и высокой биосовместимостью.

Съеппи с соавт. [78] изучили биосовместимость наночастиц C_{60} , модифицированных лизоцимом, выделенным из яичного белка курицы (HEWL), а также лизоцимом, на клеточных линиях HaCaT и HeLa. Было показано, что наночастицы фуллерена C_{60} , модифицированные лизоцимом в диапазоне концентраций 0,5–3,0 мкмоль·л⁻¹ не обладают цитотоксичностью (время инкубации 24 и 48 ч).

Одним из наиболее важных свойств аддуктов фуллерена C_{60} с аминокислотами является их способность проникать через биологические мембраны и распределяться в различных компартментах клетки [116]. Котельникова с соавт. [117] изучили мембранотропные свойства аддуктов фуллерена C_{60} -Ala (($C_{60}(C_3H_6NO_2)_nH_n$, где $n = 1$) и (C_{60} -Ala-Ala ($C_{60}(C_6H_{12}N_2O_3)_nH_n$, где $n = 1$). Было показано, что эти аддукты проникают в липосомы через липидный бислой мем-

бран и способны осуществлять активный трансмембранный транспорт ионов Co^{2+} , образуя с ним комплексы.

Ху с соавт. [40–42] изучили биологическое действие аддуктов фуллерена C_{60} с β -аланином, L-цистином и трипептидом глутатионом (см. Рис. 2) в отношении клеточной линии РС12. Результаты исследования показали, что аддукты фуллерена C_{60} в диапазоне концентраций от 0,5 до 100 $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ обладают антиапоптотическим эффектом в отношении клеток линии РС12 при действии перекиси водорода. Антиапоптотический эффект аддуктов фуллерена в первую очередь связан с их активностью и морфологией агрегатов. Размер агрегатов аддукта фуллерена C_{60} с L-аланином (см. Рис. 2) наименьший среди остальных аддуктов, что даёт ему возможность легче проникать через клеточную мембрану и обладать протективным действием посредством захвата АФК.

Кумар с соавт. [118] исследовали способность конъюгата фуллерена C_{60} с L-лизином (Рис. 50) вызывать разрывы ковалентных связей в суперскрученной молекуле ДНК плазмиды рВR322 в присутствии кофермента NADH под действием видимого излучения (время облучения — 3 ч).

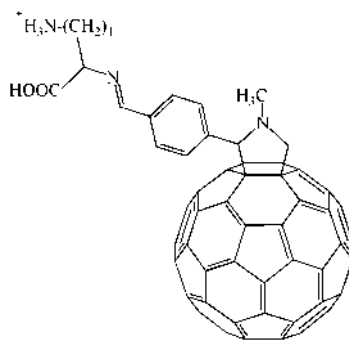


Рис. 50. Конъюгат фуллерена C_{60} с L-лизином [118].

Аддукты фуллерена с аминокислотами эффективно проникают через гематоэнцефалический барьер и поэтому могут выступать в качестве переносчиков лекарственных средств в нервную ткань [7]. В связи с этим, создание и исследование аддуктов на основе фуллеренов является перспективным подходом в фармакотерапии заболеваний нервной системы. Авторами [7] в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было установлено, что аддукты фуллерена C_{60} с различными аминокислотами: (L-фенилаланин (Рис. 4а), L-серин (Рис. 4б), β -аланин (Рис.

4в) и γ -фенилмасляная кислота (Рис. 4з)) ингибируют пролиферацию клеток глиобластомы и уменьшают скорость её роста у рыб вида Данио-рерио. Так же было установлено, что аддукт фуллерена C_{60} с L-фенилаланином ингибирует рост глиобластомы, не замедляя восстановление нейронов и не оказывает влияние на нейрональные стволовые клетки. Предположительно, противоопухолевый механизм действия аддуктов фуллерена C_{60} с аминокислотами объясняется их участием в регуляции свободно-радикальных процессов.

В патенте [53] авторы изучили биологическую активность фуллеренсодержащего гликопептида GlcNac-MurNac-Ala-DiGln[Lys- ϵ -CO(CH₂)₅NHC₆₀-H] (см. Рис. 12). Эксперименты, проведённые на мышах (самки линии Balb/c), показали, что при низких дозах 1 и 10 нмоль/животное фуллеренсодержащий гликопептид обладает высокими адъювантными свойствами. При введении высокой дозы соединения (1 мг/животное) гибель животных не наблюдалась, что свидетельствует о нетоксичности указанного аддукта.

В обзоре литературы обобщены имеющиеся данные по синтезу, идентификации, физико-химическому и биологическому изучению аддуктов фуллерена C_{60} с аминокислотами, пептидами и белками. Анализ работ по функционализации лёгких фуллеренов позволяет сделать следующее заключение:

- не во всех рассмотренных работах представлены полные данные по идентификации синтезированных аддуктов фуллерена C_{60} и тем самым, невозможно однозначно судить о химическом составе полученных соединений;
- лишь в небольшом количестве работ представлены данные по физико-химическому изучению аддуктов фуллеренов, несмотря на то, что их физико-химические свойства лежат в основе понимания механизмов действия создаваемых наночастиц;
- исследование биологической активности аддуктов фуллеренов носит фрагментарный и несистемный характер.

Очевидно, что разработка одностадийных методов синтеза водорастворимых аддуктов фуллеренов, а также комплексное изучение их свойств являет-

ся актуальной задачей для создания на их основе высокотехнологичных материалов медицинского назначения.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы и методы исследования

2.1.1. Синтез аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином

Для проведения синтеза навеску L-аргинина (4,65 г) и гидроксида натрия (15,75 г) растворяли в 54 мл воды. Гидроксид натрия использовали для перевода аминокислоты в натриевую форму. Затем к полученному раствору добавляли этанол (270 мл) (для обеспечения взаимной растворимости *o*-ксилола и воды) и насыщенный раствор фуллерена C₆₀ в *o*-ксилоле (для этого 1 г C₆₀ растворяли в 131,5 мл *o*-ксилола). После чего полученную реакционную смесь перемешивали с помощью магнитной мешалки при комнатной температуре в течение недели в атмосфере аргона. Схема реакции синтеза аддукта фуллерена представлена на Рис. 51.

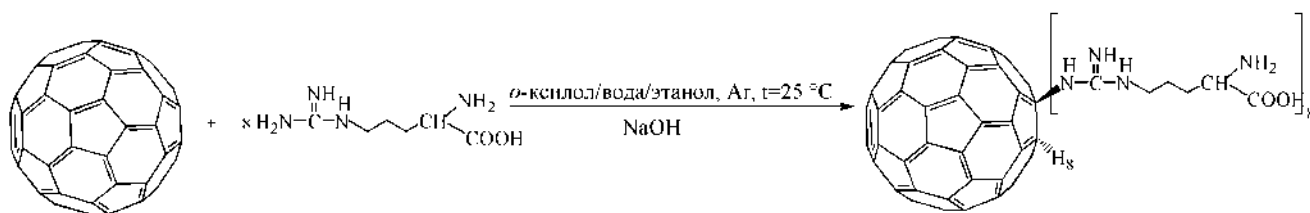


Рис. 51. Схема реакции получения аддукта фуллерена C₆₀ с L-аргинином.

Затем проводили выделение продукта реакции. Полученную смесь отделяли от растворителей с использованием роторного испарителя RV3V (ИКА, Германия) и затем растворяли образовавшийся осадок в воде. После этого полученный раствор отфильтровывали от нерастворимых примесей и проводили перекристаллизацию аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином с использованием этанола. Полученный осадок промывали от щелочи этанолом до нейтральной реакции среды (pH 7). Аддукт C₆₀ с L-аргинином высушивали при 60 °C на воздухе (Рис. 51). Выход целевого продукта составил до 90 %. После чего проводили очистку продукта от примесей диализом с использованием диализного мешка, MWCO = 1000 г/моль, при $t^\circ = 25^\circ \text{C}$, против деионизованной воды в течение 24 ч. Замена воды проводилась каждые 6 ч.

2.1.2. Идентификация аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином

Идентификацию полученного аддукта проводили с использованием комплекса физико-химических методов анализа: элементного анализа, ИК- и ¹³C ЯМР-спектроскопии, ВЭЖХ, термогравиметрического анализа.

Определение содержания углерода, азота и водорода в образце проводили с использованием С, Н, N-анализатора EuroEA3028-НТ (Италия). Регистрация ИК-спектров проводилась на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 8700 (США). Для идентификации аддукта также использовали твердотельную спектроскопию ¹³C ЯМР (ЯМР-спектрометр Avance III 400 WB, Bruker (Массачусетс, США).

Термогравиметрический анализ проводили с помощью синхронного термического анализатора Netzsch STA 449 F3 Jupiter (Германия) в температурном интервале 303,62–1274,95 °С при скорости нагревания 5 °С/мин на воздухе.

2.1.3. Изучение термодинамических свойств аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином

Изучение температурной зависимости изобарной теплоёмкости аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином проводили методом адиабатической вакуумной калориметрии в интервале низких температур $T = 5\text{--}328$ К (калориметр типа «АК-9.02/ВСТ-21», Термах, Россия). Калибровку прибора осуществляли путём измерения изобарных теплоёмкостей стандартных образцов — бензойной кислоты (чистота 0,99999) и синтетического сапфира α -Al₂O₃ (чистота 0,99999). Определение теплоёмкости проводили в вакуумированной и заполненной сухим гелием титановой ампуле.

2.1.4. Изучение физико-химических свойств аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином

Измерение плотности (ρ) водных растворов аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином проводили на плотномере Anton Paar DMA 5000 M (Anton Paar GmbH, Австрия) в интервале температур $T = 278,15\text{--}323,15$ К и в диапазоне концентраций $C = 0,3\text{--}40$ г·дм⁻³). Перед каждой серией измерений прибор калибровали в изотермических условиях (при атмосферном давлении).

Точность определения плотности составляла $7 \cdot 10^{-6} \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ (воспроизводимость $5 \cdot 10^{-6} \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$), термостатирование образцов контролировалась с точностью 0,01 К. Представленные значения плотностей являются средними трёх независимых экспериментов.

Изучение концентрационной зависимости вязкости (η) водных растворов аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 278,15\text{--}313,15 \text{ К}$ и в диапазоне концентраций $C = 0,25\text{--}40 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ проводили с использованием микровискозиметра Anton Paar LOVIS 2000 M. Калибровка вискозиметра была проведена с использованием деионизованной воды; точность термостатирования составила 0,02 К; точность измерения вязкости не превышала 0,5 %. Измерение вязкости проводили три раза для каждого образца.

Измерение показателя преломления (n_D) проводили с использованием рефрактометра Anton Paar Abbemat Multi-Wavelength WR-MW (Австрия) при длине волны 589,3 нм (D-линия натрия) в интервале температур $T = 278,15\text{--}323,15 \text{ К}$ и в диапазоне концентраций $C = 0,06\text{--}30 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$. Калибровку прибора проводили при атмосферном давлении с использованием сухого воздуха. Представленные значения показателей преломления являются средними из трёх независимых экспериментов.

Изучение концентрационной зависимости электрофоретической подвижности и концентрационной зависимости размеров ассоциатов аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином в водных растворах проводили на приборе Malvern Zetasizer 3000 (Великобритания).

Изучение растворимости в бинарной системе аддукт C_{60} с L-аргинином-вода проводили методом изотермического насыщения в ампулах в интервале температур $293,15\text{--}333,15 \text{ К}$. Насыщение проводилось в водном шейкер-термостате LAUDA ET 20 (Германия), точность термостатирования составила $\Delta T = \pm 0,1 \text{ К}$, частота встряхивания 2 Гц, время насыщения 8 ч. Концентрация аддукта определялась спектрофотометрически при длине волны 330 нм [108].

2.1.5. Биосовместимость и биологическая активность аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином

2.1.5.1. Цитотоксичность

Изучение цитотоксичности аддукта C₆₀ с L-аргинином проводили с помощью МТТ-реагента (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида) на клеточной линии НЕК293 (клетки почки эмбриона человека). Клеточная линия была получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург.

Клеточную линию культивировали в CO₂-инкубаторе при +37 °С в увлажнённой атмосфере, содержащей воздух и 5% CO₂ в питательной среде DMEM, содержащей 10 % термически инактивированную фетальную бычью сыворотку, 1% L-глутамин, 50 Ед·мл⁻¹ пенициллина и 50 мкг·мл⁻¹ стрептомицина.

Для проведения эксперимента клетки высевали в 96-луночный планшет и ставили для инкубации 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 проводили на анализаторе жизнеспособности клеток BioRad TC10 (Bio-Rad Laboratories, США). После чего в лунки добавляли раствор, содержащий аддукт фуллерена C₆₀ с L-аргинином. Инкубация клеток в планшетах продолжалась 48 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С. Далее культуральную среду DMEM сливали путём инвертирования планшета и в лунки вносили 100 мкл среды DMEM и 20 мкл МТТ-реагента после чего планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С.

После удаления надосадочной жидкости кристаллы формазана растворяли в течение 15 мин при перемешивании в 200 мкл/лунку ДМСО и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре BioRadxMarx (Bio-Rad Laboratories, США) при 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 нормировали в процентах по отношению к контрольным клеткам [119].

2.1.5.2. Генотоксичность

Генотоксичность аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином изучали с помощью метода ДНК-комет, основанного на измерении влияния аддукта на целостность молекулы ДНК мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС) с помощью электрофореза [120,121]. ДНК кометы визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Микромед 3 ЛЮМ (Россия). Измерение длин хвостов ДНК-комет проводили с помощью программного обеспечения CASP. Содержание ДНК в хвосте и длина хвоста были определены экспериментально, а момент хвоста был рассчитан как процентное содержание ДНК в хвосте, умноженного на расстояние между центром головы и хвоста кометы.

2.1.5.3. Связывание с ЧСА

Изучение взаимодействия ЧСА и аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином проводили при 298,15 К методом изотермической калориметрии титрования с использованием прибора Nano ITC 2G (TA Instruments, США), оснащённого золотой измерительной ячейкой объёмом 1 мл. В ячейку помещали раствор ЧСА ($C = 10^{-4}$ моль·л⁻¹). После установления равновесия к содержимому ячейки при непрерывном перемешивании добавляли раствор аддукта ($C = 10^{-3}$ моль·л⁻¹) путём последовательных инъекций по 10 мкл. В качестве среды для протекания изучаемой реакции использовали фосфатный буферный раствор PBS. Интервал между инъекциями составлял 2400 с, скорость вращения мешалки — 250 об·мин⁻¹. Точность поддержания температуры в ходе эксперимента составляла $\pm 0,0003$ К [119].

2.1.5.4. Антирадикальная активность

Исследование антирадикальной активности аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином (240 мкМ) в модельной реакции со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразида (ДФПГ) (120 мкМ) проводили на спектрофотометре BioRadxMark. Для получения кинетической кривой восстановления ДФПГ

исследуемым веществом реакционную смесь пипетировали в 96-луночный планшет и регистрировали оптическую плотность при длине волны 515 нм через каждую минуту в течение 10 мин, через каждые 10 мин в течение последующих 170 мин, а также через 6 дней после начала реакции. Перемешивание реакционной смеси осуществляли на орбитальном шейкере Multi Bio 3D [119].

Глава 3. Результаты

3.1. Идентификация аддукта лёгкого фуллерена C₆₀ с L-аргинином

3.1.1. Элементный анализ

Результаты элементного анализа аддукта показали хорошее соответствие между расчётными и экспериментальными данными (экспериментальное содержание: С 61,3 %, Н 5,3 %, N 21,2 %, теоретическое содержание: С 61,3 %, Н 5,3 %, N 21,2 %). Таким образом, можно сделать вывод о том, что на одну молекулу C₆₀ приходится восемь остатков молекулы L-аргинина.

3.1.2. ИК-спектроскопия

На Рис. 52 представлен ИК-спектр аддукта фуллерена C₆₀ с L-аргинином: широкий пик при 3449 см⁻¹ относится к валентным колебаниям связи NH гуанидиновой группы; пик при 2926 см⁻¹ можно отнести к валентным колебаниям аминогруппы молекулы L-аргинина; пик при 1618 см⁻¹ соответствует валентным колебаниям связи C–N в составе гуанидиновой группы; пик при 1574 см⁻¹ можно отнести к валентным колебаниям связи C=O карбоксильной группы молекулы L-аргинина; пик при 1401 см⁻¹ относится к деформационным колебаниям CH₂–NH в составе гуанидиновой группе; пик при 1190 см⁻¹ соответствует валентным колебаниям C–N связи гуанидиновой группы; пик при 596 см⁻¹ соответствует колебаниям связей C–C молекулы фуллерена.

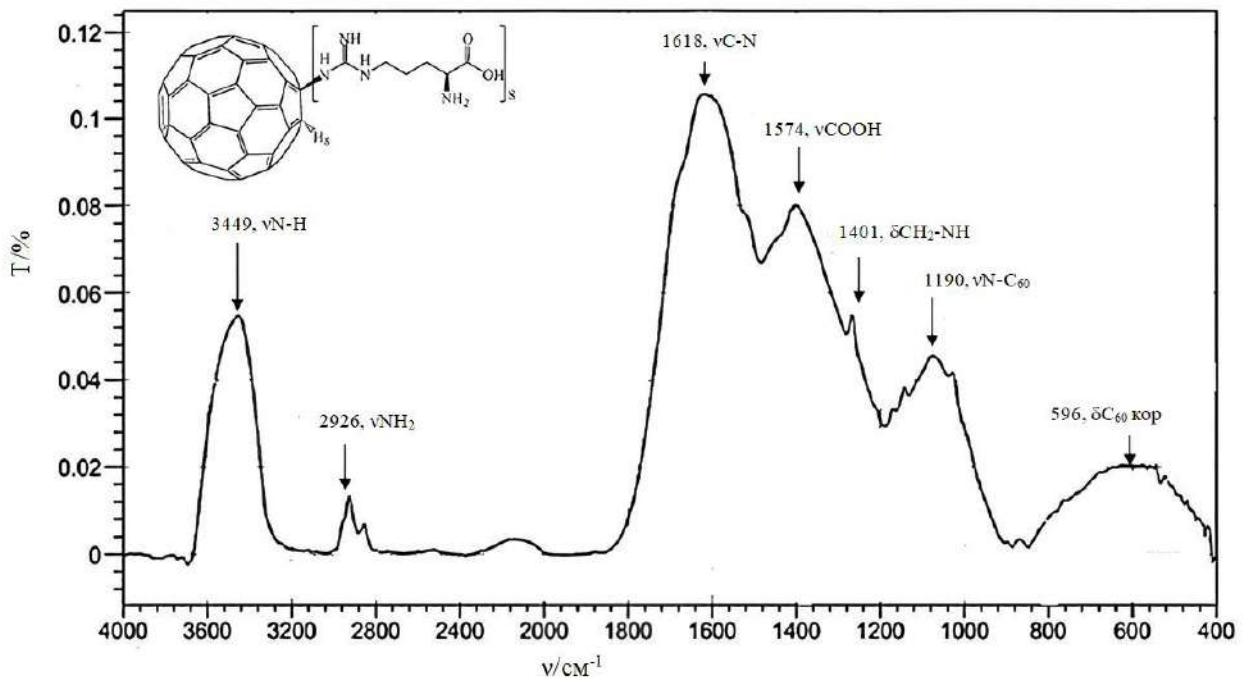


Рис. 52. ИК-спектр аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином.

3.1.3. ^{13}C ЯМР-спектроскопия

Так как в процессе растворения аддукта наблюдается образование крупных ассоциатов с размерами сотни-тысячи нм (в зависимости от концентрации), которые препятствует высокоскоростным процессам спиновой диффузии, а также усреднению диполь-дипольного взаимодействия, приводящему к невозможности регистрации спектра ЯМР высокого разрешения (в жидкой фазе). Поэтому для регистрации спектров применяли метод твердотельной ЯМР-спектроскопии. Для регистрации спектров на ядрах ^{13}C использовалась кросс-поляризационная последовательность возбуждающих импульсов (методика CP/MAS). В качестве внешнего референса использовался тетраметилсилан.

На Рис. 53 представлен набор CP/MAS спектров ЯМР, полученных при разных временах контакта. Видно, что при коротких временах контакта (от 7 до 10 мкс) наблюдаются сигналы, соответствующие двум $-CH_2-$ структурным элементам молекулы L-аргинина. При времени контакта больше 20 мкс возникает сигнал, который соответствует $-CH-$ структурному элементу молекулы L-аргинина. На следующем этапе, когда время контакта превышает 100 мкс, на спектре видны пики, соответствующие атомам углерода в составе гуанидино-

вой и карбоксильной групп молекулы L-аргинина. Остальные сигналы при времени контакта 500 мкс, относятся к атомам углерода фуллеренового кора.

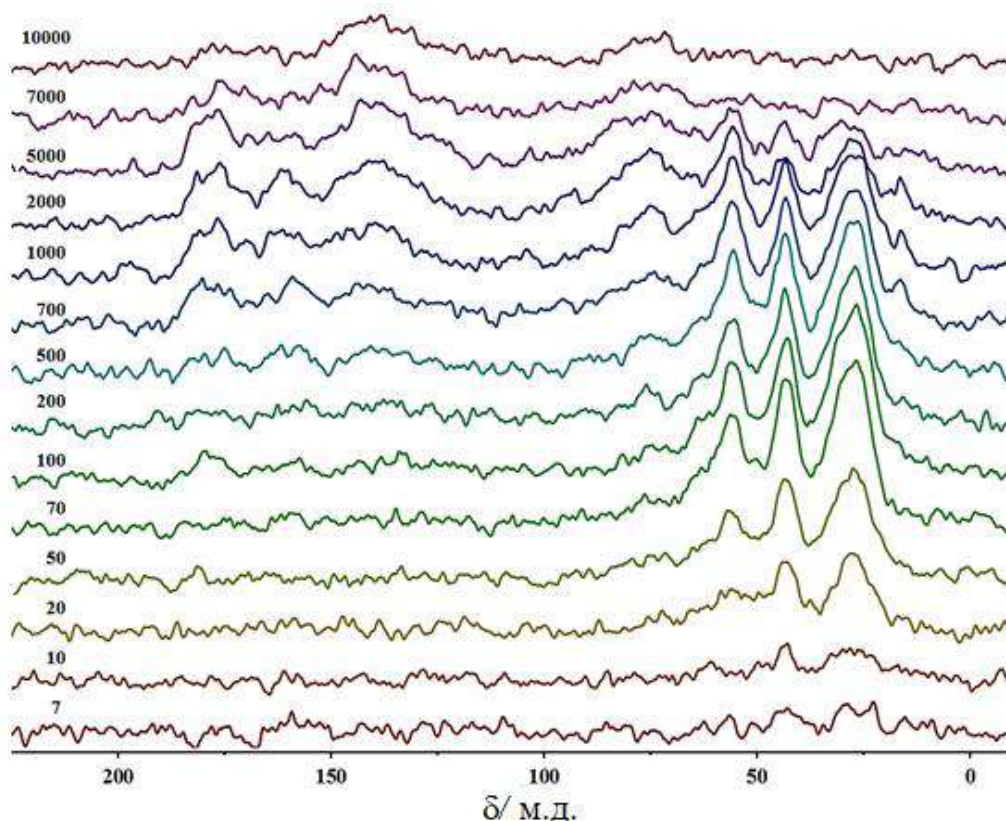


Рис. 53. Набор CP/MAS спектров ЯМР C_{60} -L-аргинин, полученных при разных временах контакта (указаны слева от спектров в мкс).

На Рис. 54 показан спектр ^{13}C ЯМР аддукта, полученный методом CP/MAS (время контакта – 2 мкс). Спектр представлен следующими пиками: сигнал при 176,4 м. д. соответствует атому углерода в составе карбоксильной группе, сигнал при 158 м. д. соответствует атомам углерода в составе гуанидиновой группы, сигнал при 76,2 м. д. может быть отнесён к атомам углерода фуллеренового кора, связанного с атомом водорода, сигнал при 56 м. д., соответствует -CH- структурному элементу молекулы L-аргинина, сигнал при 27,5 м. д. соответствует -CH₂- структурному элементу молекулы L-аргинина. Остальные сигналы с 139,6, 76,2, 63,7 и 16,4 м. д. соответствуют фуллереновому кору.

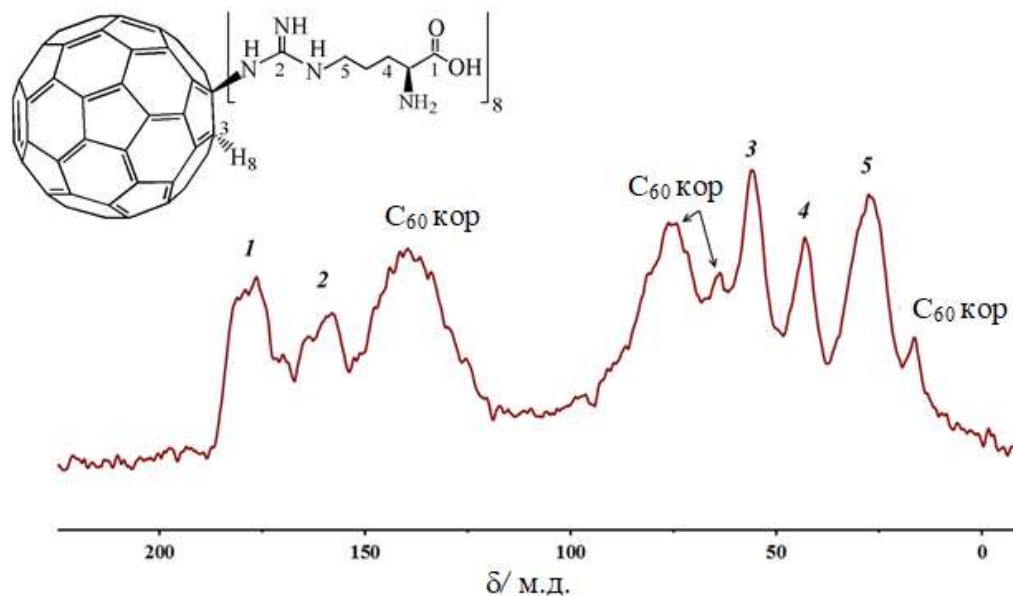


Рис. 54. ^{13}C ЯМР спектр аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, полученный методом CP/MAS (время контакта — 2 мкс).

3.1.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Результаты проведённого хроматографического анализа показали, что чистота аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином составляет 99,8 % (Рис. 55).

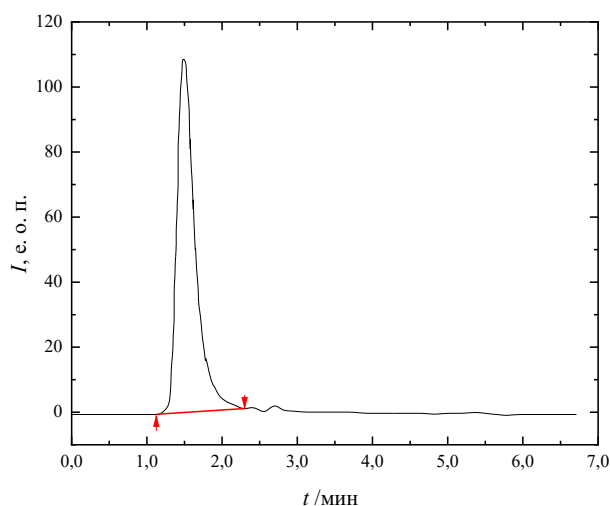


Рис. 55. Хроматограмма аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином.

3.1.5. Термогравиметрический анализ

На Рис. 56 представлены результаты термогравиметрического анализа аддукта C_{60} с L-аргинином.

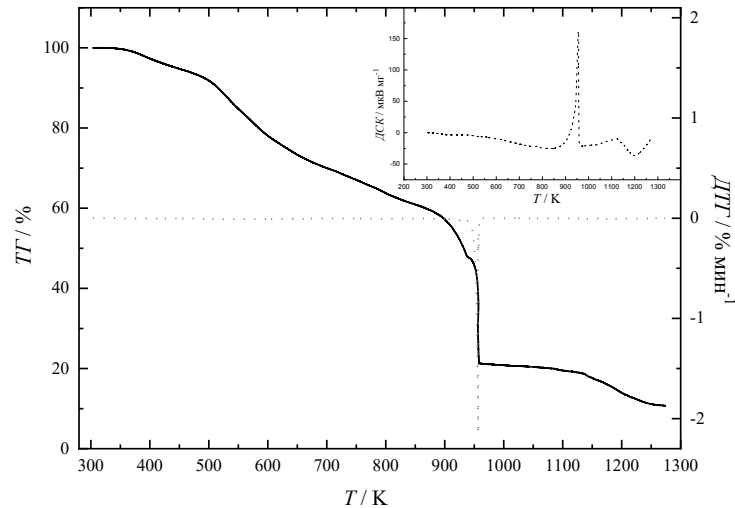


Рис. 56. Термогравиметрический анализ аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 303,62\text{--}1274,95$ К на воздухе. Кривая TG — сплошная линия, кривая DTG — пунктирная линия.

Анализ Рис. 56 выявляет следующее: (1) в температурном диапазоне до 340 К аддукт является термически устойчивым; (2) в интервале температур $T = 340\text{--}950$ К происходят многоступенчатые процессы разложения аддукта, включающие дегидратацию ($-nH_2O$), декарбоксилирование ($-nCO_2$), деазотирование ($-N_2$) и дегидрирование ($-H_2$). Потеря массы, равная 65,9 % (Рис. 56) соответствует разложению восьми остатков L-аргинина; (3) в интервале температур $T = 950\text{--}1270$ К происходит окисление фуллеренового кора (C_{60}).

3.2. Термодинамические характеристики аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином

На Рис. 57 представлена температурная зависимость изобарной теплоёмкости аддукта в интервале температур $T = 5\text{--}328$ К. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в изученном интервале температур не наблюдается фазовых переходов. Для сравнения индивидуальный фуллерен C_{60} существует в трех физических состояниях: в стеклообразном, кристаллическом состоянии, в виде моноклинных кристаллов и в виде пластичных кристаллов и имеет место два фазовых перехода: переход

второго рода «порядок - беспорядок» (при 86 К) и фазовый переход первого рода (при 260,7 К) (см. раздел 1.2.1) [81].

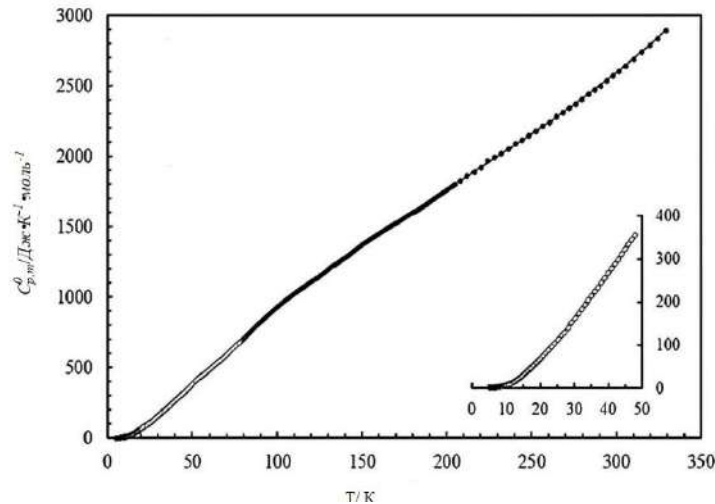


Рис. 57. Температурная зависимость изобарной теплоёмкости аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 5\text{--}328$ К.

Экстраполяция теплоёмкости к $T = 0$ К проводилась с использованием полиномиального уравнения 5:

$$C_{p,m}^o = A \cdot T^n \quad (5),$$

где A и n — эмпирические коэффициенты, вычисленные на основе экспериментальных значений теплоёмкости в интервале температур $T = 6\text{--}10$ К.

Логарифмическая форма уравнения 5 имеет следующий вид:

$$\ln(C_{p,m}^o / \text{Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}) = 2,88346 \cdot \ln(T / \text{К}) - 0,010126 \quad (6).$$

Стандартные отклонения рассчитанных коэффициентов (A и n) из уравнения 5 составляет менее 1,2 %. Численная форма уравнения 5 имеет следующий вид:

$$C_{p,m}^o = 0,989925 \cdot T^{2,88346} \quad (7).$$

Температурная зависимость изобарной теплоёмкости была описана с помощью полиномиального уравнения 8 для следующих интервалов температур: $T = 5\text{--}14$ К, $T = 1\text{--}81$ К и $T = 82\text{--}328$ К:

$$C_{p,m}^o = k_0 + k_1 T^{-3} + k_2 T^{-2} + k_3 T^{-0,5} + k_4 T + k_5 T^2 + k_6 T^3 \quad (8),$$

где k_i — полиномиальные коэффициенты.

Значения полиномиальных коэффициентов представлены в Табл. 3.

Табл. 3. Значения полиномиальных коэффициентов k_i в интервалах температур $T = 5-14$ К, $T = 15-81$ К и $T = 82-328$ К.

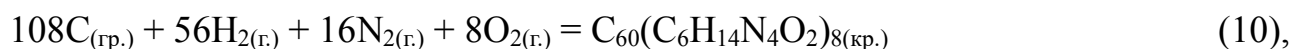
$T, \text{К}$	k_0	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6
5–14	3515,76	–29494,3	20428,2	–7195,9	–217,887	9,28502	–0,156846
15–81	–6907,51	3088030	–575915	27599,6	110,993	–0,97727	0,00388589
82–328	–12630,8	472098000	–21656200	108085	55,5848	–0,125264	0,000140997

Расчёт стандартной молярной энтропии $S_m^\circ(T)$ аддукта был осуществлён в соответствии с уравнением 9, при условии $S^{T=0\text{K}}=0$:

$$S_0 - S^{T=0\text{K}} = \int_0^{298,15} \frac{C_p^0}{T} dT \quad (9).$$

Таким образом, было установлено, что при $T = 298,15$ К стандартная молярная энтропия аддукта ($S_m^\circ(T)$) составляет 2396 ± 5 Дж·К^{–1}·моль^{–1}.

Энтропии простых веществ (С (гр.), Н₂ (г), О₂ (г), N₂ (г)) (Табл. 4) использовались для расчёта стандартной молярной энтропии образования $C_{60}(C_6H_{14}N_4O_2)_8$ в кристаллическом состоянии при $T = 298,15$ К по уравнению 10:



где *гр.* — графит, *г.* — газ, *кр.* — кристалл.

Табл. 4. Стандартные молярные энтропии простых веществ.

Вещество	$S_m^\circ(298 \text{ К}), \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$
С, <i>гр.</i>	$5,6 \pm 0,5$
Н ₂ , <i>г.</i>	$130,680 \pm 0,003$
О ₂ , <i>г.</i>	$205,152 \pm 0,005$
N ₂ , <i>г.</i>	$191,609 \pm 0,004$

В итоге было получено следующее значение стандартной молярной энтропии образования аддукта C_{60} с L-аргинином (уравнение 11):

$$\Delta_f S_m^\circ(298,15\text{K}) = -(10234 \pm 7) \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1} \quad (11).$$

В Табл. 5, представлены стандартные молярные термодинамические функции аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, рассчитанные в интервале температур 5–320 К.

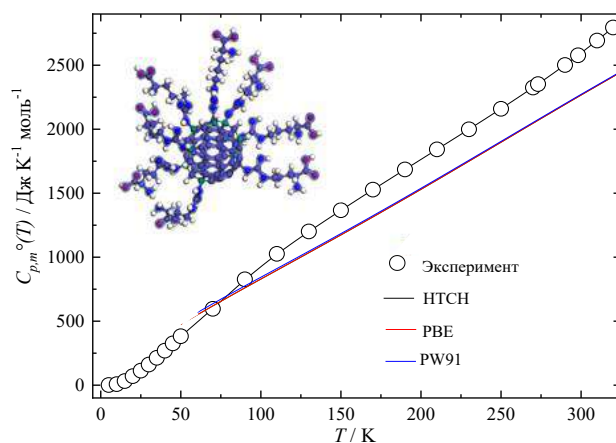
Табл. 5. Стандартные молярные термодинамические функции аддукта лёгкого фуллерена C_{60} -L-аргинин. S_m° — стандартная молярная энтропия, $[H_m^\circ(T) - H_m^\circ(0)]$ — энтальпия и $[\Phi_m^\circ(T) - \Phi_m^\circ(0)]$ — функция Гиббса при 0,1 мПа.

$T, \text{ К}$	$C_{p,m}^\circ(T),$ Дж·К ⁻¹ ·моль ⁻¹	$\Delta_0^T H_m^\circ(T),$ кДж·моль ⁻¹	$\Delta_0^T S_m^\circ(T),$ Дж·К ⁻¹ ·моль ⁻¹	$\Delta_0^T \Phi_m^\circ(T),$ кДж·моль ⁻¹
5	1,049	0,00135	0,364	0,094
10	7,790	0,0199	2,699	0,699
15	32,15	0,110	9,64	2,31
20	70,20	0,360	23,80	5,79
25	113,3	0,818	44,04	11,32
30	161,1	1,50	68,84	18,79
35	213,8	2,44	97,58	27,94
40	269,5	3,64	129,7	38,63
45	326,1	5,13	164,7	50,67
50	382,2	6,90	202,0	63,93
70	596,2	16,71	364,9	126,3
90	827,1	30,92	542,3	198,7
110	1025,9	49,51	728,1	287,0
130	1201,2	71,8	913,9	361,6
150	1366,8	97,49	1097,5	447,5
170	1527,7	126,4	1278,4	534,6
190	1685,6	158,6	1457,0	622,4
210	1842,1	193,9	1633,4	710,3
230	1999,1	232,3	1808,0	798,1
250	2159,1	273,8	1981,2	885,9
270	2325,4	318,7	2153,7	973,4

273,15	2352,4	326,0	2180,8	987,2
290	2501,7	366,9	2326,0	1060,7
298,15	2577,4	387,6	2396,4	1096,3
310	2692,4	418,8	2499,0	1147,9
320	2794,5	446,3	2586,1	1191,5

С помощью метода DFT, в программе DMol³ в рамках гармонического приближения научным сотрудником кафедры химии твёрдого тела Института химии СПбГУ А. В. Петровым были рассчитаны значения теплоёмкости для аддукта C₆₀ с L-аргинином. В области низких температур было получено хорошее соответствие между расчётными и экспериментальными данными для двух изомеров аддукта C₆₀ с L-аргинином с равномерным (Рис. 58а) и экваториальным («Saturn-like») (Рис. 58б) распределением функциональных групп.

(a)



(б)

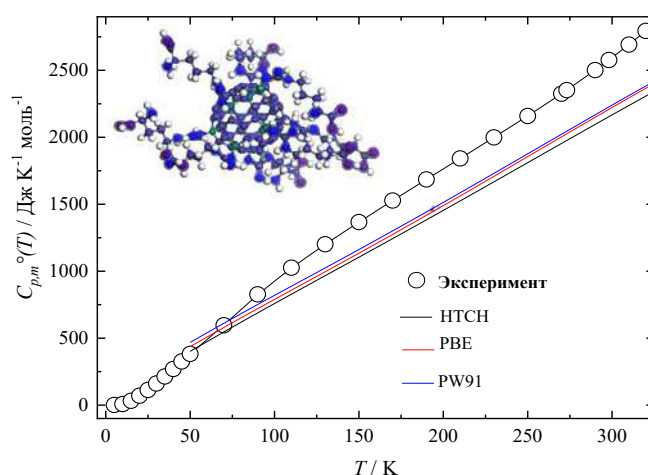


Рис. 58. Сопоставление экспериментальных и расчётных изобарных теплоёмкостей аддукта C_{60} с L-аргинином с равномерным (a) и «Saturn-like» (б) распределением функциональных групп. Функционал НТСН — черная линия, функционал PBE — красная линия, функционал PW91 — синяя линия.

При повышении температуры наблюдается расхождение между экспериментальными и расчётными данными, что связано с ангармоничностью колебаний (значения теплоёмкости рассчитаны в гармоническом приближении). Кроме того, можно сделать вывод об отсутствии существенной разницы в значениях теплоёмкости для молекул аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином с

разным распределением аминокислотных остатков, рассчитанных в функционалах РВЕ, РW91 и НСТН [122].

3.3. Физико-химические свойства водных растворов аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином

3.3.1. Плотности водных растворов аддукта

Результаты экспериментального изучения плотности водных растворов аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 278,15\text{--}323,15$ К и диапазоне концентраций $C = 3\text{--}40$ г·дм⁻³) представлены в Табл. 6 и на Рис. 59.

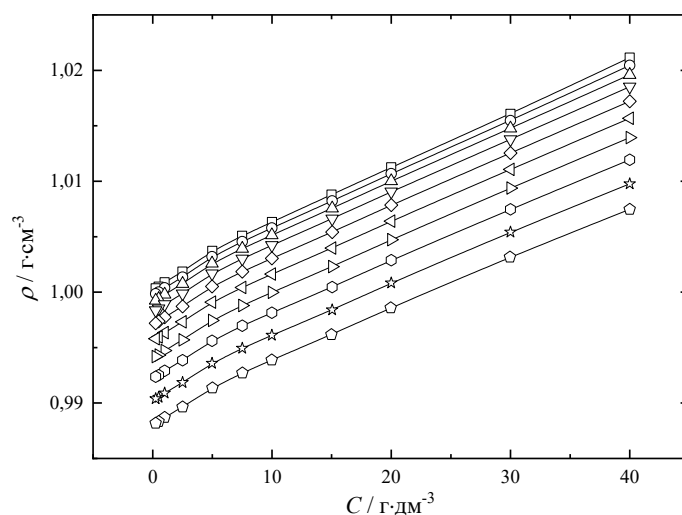


Рис. 59. Концентрационные зависимости плотности (ρ) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином при (\square) 278,15 К; (\circ) 283,15 К; (\triangle) 288,15 К; (∇) 293,15 К; (\diamond) 298,15 К; (\triangleleft) 303,15 К; (\triangleright) 308,15 К; (\odot) 313,15 К; (\star) 318,15 К; (\ominus) 323,15 К. C — объёмная концентрация.

Из Рис. 59 видно увеличение плотности с увеличением концентрации аддукта C_{60} с L-аргинином.

Полученные данные по концентрационным и температурным зависимостям плотности (Табл. 6) были использованы для расчёта средних молярных объёмов (\bar{V}) растворов по уравнению 12:

$$\bar{V} = \frac{V}{n_{H_2O} + n_{C_{60}\text{-L-аргинин}}} \quad (12),$$

где V — объём водного раствора аддукта C_{60} с L-аргинином; n_{H_2O} и $n_{C_{60}-L-аргинин}$ — число молей воды и C_{60} -L-аргинина в 1 дм^3 раствора.

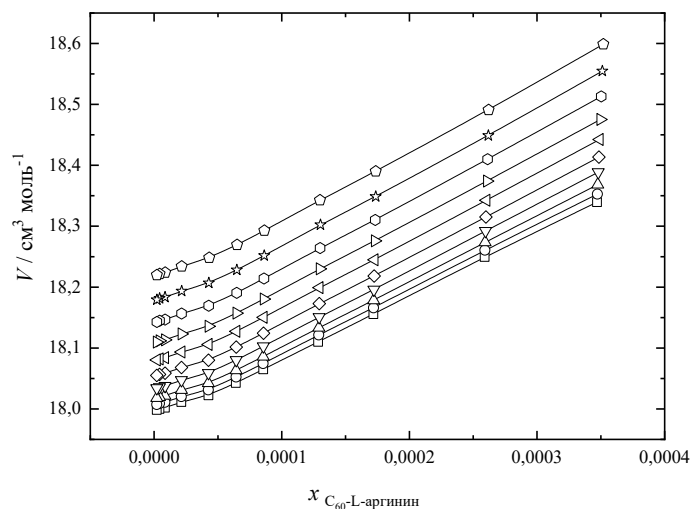


Рис. 60. Концентрационные зависимости среднего молярного объема (V) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином при (□) 278,15 К; (○) 283,15 К; (△) 288,15 К; (▽) 293,15 К; (◇) 298,15 К; (◁) 303,15 К; (▷) 308,15 К; (⊙) 313,15 К; (☆) 318,15 К; (⊕) 323,15 К. x — мольная доля, растворенного вещества.

С использованием уравнений 13 и 14 были рассчитаны парциальные молярные объёмы компонентов раствора (V_{H_2O} и $V_{C_{60}-L-аргинин}$):

Табл. 6. Температурная и концентрационная зависимости плотности (ρ) водных растворов C_{60} с L-аргинином. C — объёмная концентрация аддукта в водном растворе.

$C, \text{г} \cdot \text{дм}^{-3}$	$\rho, \text{г} \cdot \text{см}^{-3}$									
	278,15 К	283,15 К	288,15 К	293,15 К	298,15 К	303,15 К	308,15 К	313,15 К	318,15 К	323,15 К
0,3	1,00033	0,99983	0,99924	0,99834	0,99718	0,99579	0,99418	0,99236	0,99038	0,98817
0,5	1,00045	0,99995	0,99936	0,99847	0,99732	0,99592	0,99428	0,99246	0,99047	0,98828
1	1,00069	1,00020	0,99960	0,99871	0,99755	0,99616	0,99454	0,99272	0,99071	0,98852
2,5	1,00139	1,00089	1,00029	0,99940	0,99826	0,99686	0,99523	0,99340	0,99139	0,98918
5	1,00262	1,00210	1,00149	1,00058	0,99942	0,99800	0,99636	0,99451	0,99248	0,99026
7,5	1,00388	1,00336	1,00274	1,00182	1,00065	0,99923	0,99760	0,99578	0,99375	0,99152
10	1,00505	1,00452	1,00388	1,00296	1,00178	1,00036	0,99872	0,99688	0,99485	0,99262
15	1,00744	1,00687	1,00621	1,00527	1,00406	1,00263	1,00096	0,99911	0,99705	0,99482
20	1,00985	1,00928	1,00861	1,00766	1,00645	1,00500	1,00333	1,00147	0,99942	0,99718
30	1,01464	1,01404	1,01333	1,01234	1,01111	1,00963	1,00795	1,00604	1,00398	1,00173
40	1,01972	1,01901	1,01817	1,01709	1,01577	1,01425	1,01250	1,01051	1,00834	1,00603

$$V_{H_2O} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{H_2O}} \right)_{T,P,n_{C_{60-L-аргинин}}} \quad V_{C_{60-L-аргинин}} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{C_{60-L-аргинин}}} \right)_{T,P,n_{H_2O}} \quad (13),$$

$$V_{H_2O} = \bar{V} - x_{C_{60-L-аргинин}} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{C_{60-L-аргинин}}} \right)_{T,P} \quad V_{C_{60-L-аргинин}} = \bar{V} - x_{H_2O} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{H_2O}} \right)_{T,P} \quad (14).$$

На Рис. 61 и 62 представлены концентрационные зависимости парциальных молярных объёмов воды и аддукта C_{60} с L-аргинином (V_{H_2O} и $V_{C_{60-L-аргинин}}$) в интервале температур $T = 278,15\text{--}323,15$ К.

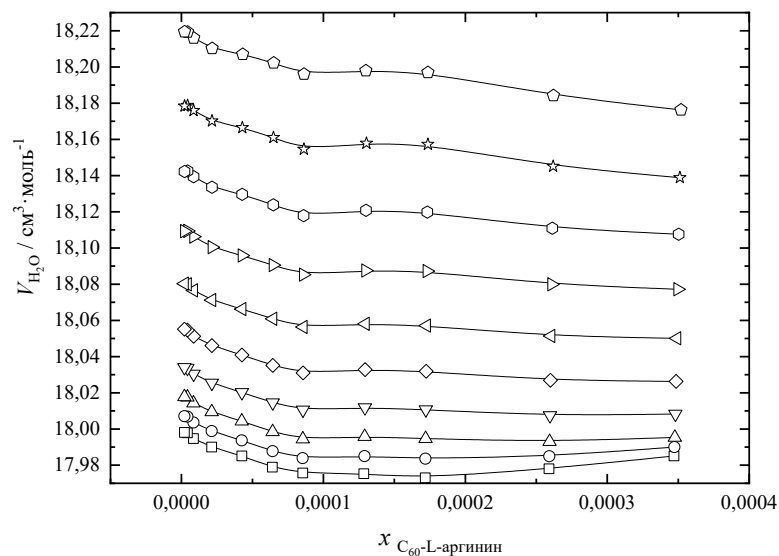


Рис. 61. Концентрационная зависимость парциального объёма воды при (\square) 278,15 К; (\circ) 283,15 К; (\triangle) 288,15 К; (∇) 293,15 К; (\diamond) 298,15 К; (\triangleleft) 303,15 К; (\triangleright) 308,15 К; (\odot) 313,15 К; (\star) 318,15 К; (\odot) 323,15 К. x — мольная доля растворенного вещества в растворе.

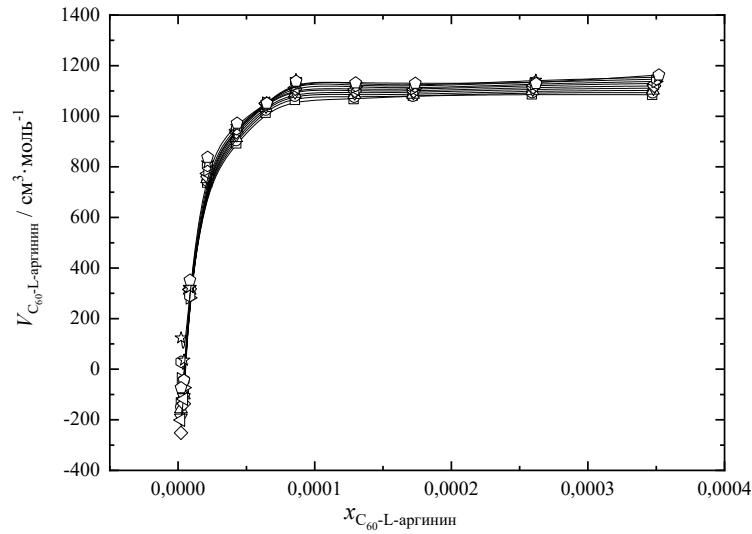


Рис. 62. Концентрационная зависимость парциального объёма C_{60} -L-аргинина при (\square) 278,15 К; (\circ) 283,15 К; (\triangle) 288,15 К; (∇) 293,15 К; (\diamond) 298,15 К; (\triangleleft) 303,15 К; (\triangleright) 308,15 К; (\odot) 313,15 К; (\star) 318,15 К; (\ominus) 323,15 К. x — мольная доля растворенного вещества.

Видно, что при всех изученных температурах концентрационные зависимости парциальных молярных объёмов C_{60} с L-аргинином имеют сложный характер: в области низких концентраций аддукта парциальные молярные объёмы отрицательны и принимают высокие по модулю значения (Рис. 62). Это означает, что добавление даже небольшого количества аддукта C_{60} с L-аргинином приводит к значительному уплотнению и структурированию водных растворов.

Вторые производные потенциала Гиббса, соответствующие первым производным объёма или энтропии, значительно более чувствительны к изменению структуры раствора, чем частные производные низкого порядка. Смешанные производные второго порядка потенциала Гиббса были определены из экспериментальных данных по плотностям водных растворов C_{60} с L-аргинином с использованием соотношений Максвелла:

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial T} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial T \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial T} \right)_{P,X} = - \left(\frac{\partial \bar{S}}{\partial P} \right)_{T,X} \quad (15),$$

где $\bar{G}, \bar{V}, \bar{S}$ — средние молярные величины (потенциал Гиббса, объём и энтропия).

Видно, что в изученном температурном диапазоне функция $(\partial \bar{V} / \partial T)_P(x_{C_{60}\text{-L-аргинин}})$ проходит через экстремум при $x_{C_{60}\text{-L-аргинин}} \approx 2 \cdot 10^{-5}$ (Рис. 63).

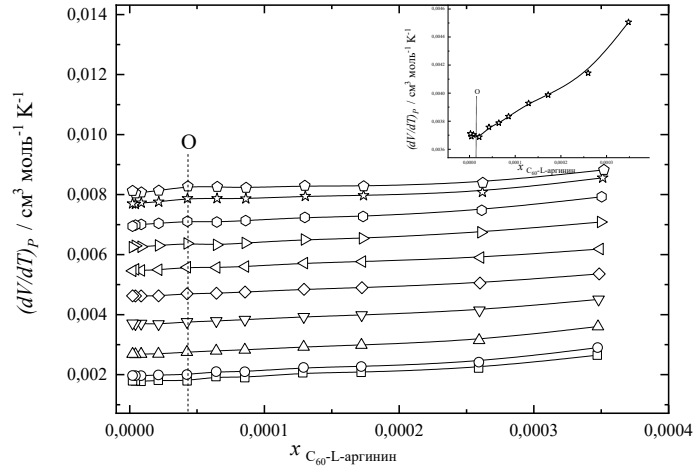


Рис. 63. Концентрационная зависимость производной $\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_{P,x}$ при (\square) 278,15 К; (\circ) 283,15 К; (\triangle) 288,15 К; (∇) 293,15 К; (\diamond) 298,15 К; (\triangleleft) 303,15 К; (\triangleright) 308,15 К; (\odot) 313,15 К; (\star) 318,15 К; (\ominus) 323,15 К. O — точка экстремума $\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x \partial T}\right)_P = 0, x = 5 \cdot 10^{-6}$.

Данная концентрация соответствует потере термодинамической устойчивости водными растворами аддукта C_{60} с L-аргинином. Последний факт связан со сложным и иерархическим типом ассоциации аддукта в растворе, а именно с образованием ассоциатов второго порядка с линейными размерами тысяч нм (см. раздел 3.3.4.).

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

$$\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial P \partial x} = \frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x \partial P} = \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x}\right)_{T,P} = \left(\frac{\partial \mu_{C_{60}\text{-L-аргинин}}}{\partial P}\right)_T - \left(\frac{\partial \mu_{H_2O}}{\partial P}\right)_T = V_{C_{60}\text{-L-аргинин}} - V_{H_2O} \quad (16),$$

где μ_i, V_i — химический потенциал и парциальный молярный объем i -компонента.

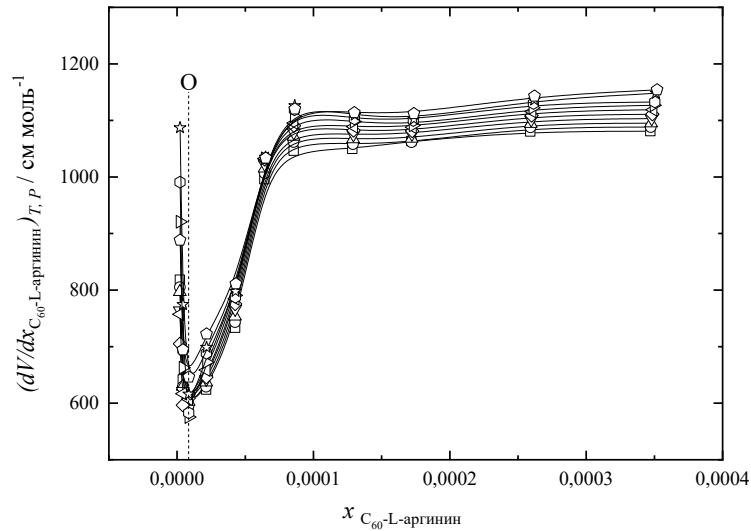


Рис. 64. Концентрационная зависимость производной $\frac{\partial V}{\partial x_{C_{60}-L-arginin}}$ при (\square) 278,15 К; (\circ) 283,15 К; (\triangle) 288,15 К; (∇) 293,15 К; (\diamond) 298,15 К; (\triangleleft) 303,15 К; (\triangleright) 308,15 К; (\odot) 313,15 К; (\star) 318,15 К; (\ominus) 323,15 К. O — точка экстремума $\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x \partial T}\right)_P = 0, x = 5 \cdot 10^{-6}$.

Как видно из Рис. 64, зависимость $(\partial \bar{V} / \partial x)_{P,T}(x_{C_{60}-L-arginin})$ также проходит через минимум при $x_{C_{60}-L-arginin} \approx 5 \cdot 10^{-6}$.

На Рис. 65 представлены рассчитанные концентрационные и температурные зависимости коэффициента изобарного термического расширения (α_P) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 283,15$ – $323,15$ К:

$$\alpha_P = -\left(\frac{1}{\rho}\right)\left(\frac{\partial \rho}{\partial T}\right)_P \quad (17),$$

где ρ — плотности водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином и T — абсолютная температура.

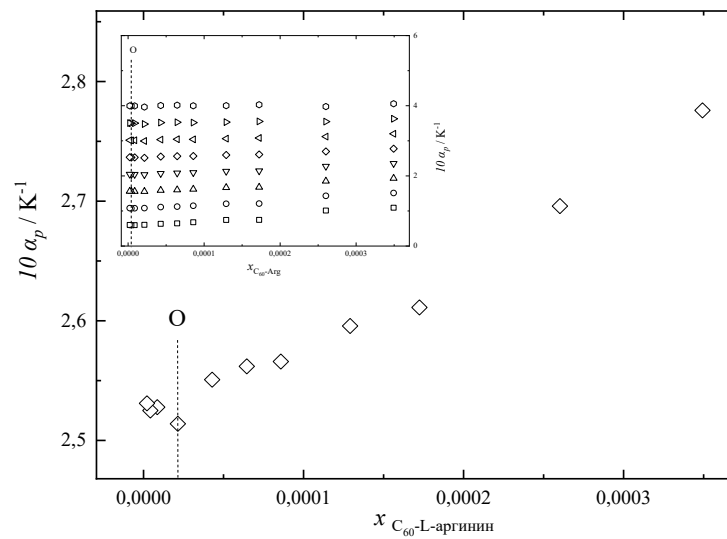


Рис. 65. Концентрационная зависимость коэффициента изобарного термического расширения (α) бинарной системы C_{60} -L-аргинин– H_2O при (\square) 278,15 К; (\circ) 283,15 К; (\triangle) 288,15 К; (∇) 293,15 К; (\diamond) 298,15 К; (\triangleleft) 303,15 К; (\triangleright) 308,15 К; (\odot) 313,15 К; (\star) 318,15 К; (\ominus) 323,15 К; x — мольная доля; O — точка экстремума.

Видно, что в интервале температур $T = 283,15$ – $318,15$ К коэффициенты изобарного термического расширения имеют аналогичную концентрационную зависимость, как и смешанные производные энергии Гиббса $(\partial \bar{V} / \partial T)_{P,x}$ и $(\partial \bar{V} / \partial x)_{P,T}$.

3.3.2. Температурная зависимость вязкости водных растворов аддукта

Концентрационные зависимости динамической вязкости $\eta(C)$ водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином представлены в Табл. 7 и на Рис. 66.

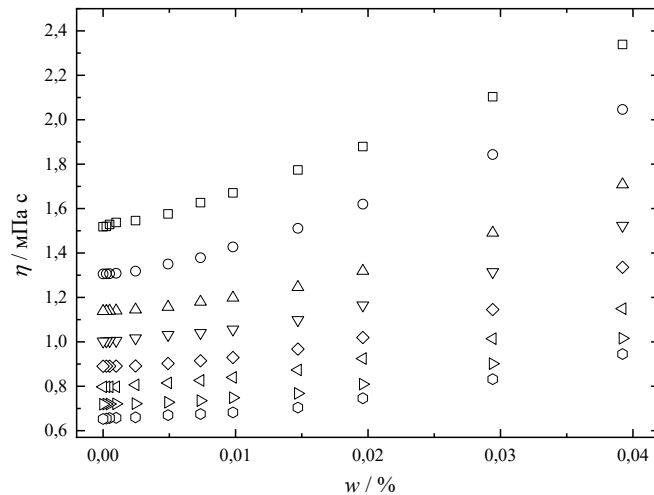


Рис. 66. Концентрационная зависимость вязкостей водных растворов аддукта C_{60} -L-аргинин при (\square) 278,15 К; (\circ) 283,15 К; (\triangle) 288,15 К; (∇) 293,15 К; (\diamond) 298,15 К; (\triangleleft) 303,15 К; (\triangleright) 308,15 К; (\odot) 313,15 К. w — массовая доля аддукта C_{60} с L-аргинином.

Из Рис. 66 видно, что с увеличением концентрации аддукта происходит увеличение вязкости, при этом максимальное увеличение (на 22 % по сравнению с водой) наблюдается при $T = 283,15$ К при $C = 40$ г·дм $^{-3}$.

Термодинамические параметры вязкости течения рассчитывались по уравнению Эйринга:

$$\eta = \frac{hN_A}{V} \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)_p \quad (18),$$

где η — динамическая вязкость, V — молярный объем, h — постоянная планка, N_A — число Авогадро.

Табл. 7. Температурная и концентрационная зависимости вязкости (η) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином. C — объёмная концентрация.

$C, \text{г} \cdot \text{дм}^{-3}$	$\eta, \text{мПа} \cdot \text{с}$									
	278,15 К	283,15 К	288,15 К	293,15 К	298,15 К	303,15 К	308,15 К	313,15 К	318,15 К	323,15 К
0,25	1,525	1,312	1,143	1,006	0,895	0,802	0,725	0,659	0,604	0,556
0,5	1,529	1,316	1,146	1,010	0,897	0,805	0,727	0,661	0,606	0,558
1	1,539	1,324	1,154	1,017	0,904	0,810	0,732	0,666	0,609	0,561
2,5	1,560	1,343	1,170	1,031	0,917	0,822	0,743	0,676	0,618	0,569
5	1,610	1,386	1,208	1,063	0,946	0,850	0,767	0,697	0,635	0,582
7,5	1,628	1,402	1,221	1,077	0,957	0,858	0,775	0,705	0,646	0,594
10	1,651	1,423	1,238	1,090	0,969	0,869	0,785	0,713	0,653	0,599
15	1,748	1,504	1,313	1,158	1,031	0,923	0,833	0,759	0,692	0,634
20	1,822	1,570	1,369	1,205	1,072	0,960	0,867	0,787	0,718	0,657
30	2,032	1,753	1,527	1,345	1,199	1,076	0,972	0,882	0,808	0,741
40	2,274	1,902	1,653	1,456	1,292	1,157	1,043	0,947	0,865	0,791

ΔH и ΔS дают структурную информацию о взаимодействии между растворенным веществом и растворителем. Анализ Табл. 8 указывает на стабильность значений ΔH и ΔS вязкого течения во всём диапазоне концентраций ($C = 0,25\text{--}40 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$) с учётом точности численного дифференцирования [123].

Положительные значения ΔH указывают на наличие специфических взаимодействий между молекулами аддукта и растворителя, отрицательные значения ΔS свидетельствуют о том, что образование активированного комплекса приводит к молекулярному упорядочению в растворе. При помощи логарифмической формы уравнения Френкеля — Андраде была рассчитана энергия активации вязкого течения и предэкспоненциальный множитель (Табл. 8):

$$\ln \eta = \ln A_S + \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (19),$$

где A_S — предэкспоненциальный множитель, E_a — энергия активации вязкого течения, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура.

Температуры активации вязкого течения были определены согласно уравнению 20 (Табл. 8):

$$T_A = \frac{-E_a}{R \ln A_S} \quad (20).$$

Дополнительно были рассчитаны коэффициенты Вант-Гоффа для вязкости (γ_n) бинарной системы C_{60} -L-аргинин- H_2O в соответствии с уравнением 21:

$$\gamma_n^{\frac{\Delta T}{10}} = \frac{\eta_{T-\Delta T}}{\eta_T} = \frac{\eta_{T-10}}{\eta_T} = 1,22 \pm 0,03 \quad (21),$$

где γ_n — коэффициент Вант-Гоффа (Рис. 67).

Табл. 8. Концентрационные зависимости термодинамических характеристик вязкого течения: энергии активации (E_a), логарифма предэкспоненциального множителя ($\ln A_S$), температуры активации вязкого течения (T_A), изменения энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS). C — объёмная концентрация.

$C, \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$	$E_a, \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1}$	$\ln A_S, \text{ мПа} \cdot \text{с}$	$T_A, \text{ К}$	$\Delta H, \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$	$\Delta S, \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$
0,25	16588,70	-6,4236	310,61	16,34	-94,17
0,5	16660,01	-6,5227	307,21	16,44	-93,18
1	16835,63	-6,7060	301,96	16,62	-91,60
2,5	16732,98	-6,7044	300,19	16,47	-91,13
5	16760,54	-6,7744	297,58	16,53	-90,69
7,5	16678,75	-6,7538	297,03	16,52	-90,66
10	16776,16	-6,8055	296,50	16,57	-90,69
15	16687,06	-6,8004	295,15	16,48	-90,71
20	16690,47	-6,8157	294,54	16,49	-90,58
30	16686,59	-6,821	294,25	16,48	-90,54
40	16697,48	-6,8283	294,12	16,50	-90,47

Из Рис. 67 видно, что имеет место высокая стабильность коэффициентов Вант-Гоффа.

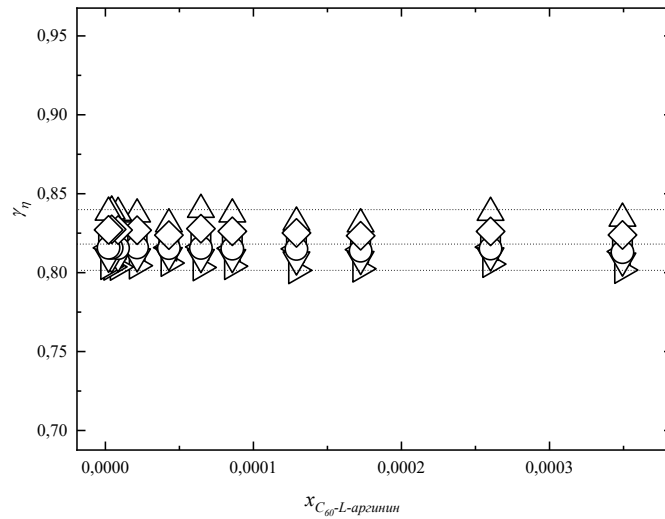


Рис. 67. Концентрационные зависимости коэффициентов Вант-Гоффа для вязкости ($\gamma_n = 1,22 \pm 0,03$) бинарной системы C_{60} -L-аргинин- H_2O . (\square) $\left(\frac{\eta_{298,15}}{\eta_{313,15}}\right)^{\frac{10}{\Delta T}}$, (\circ) $\left(\frac{\eta_{293,15}}{\eta_{308,15}}\right)^{\frac{10}{\Delta T}}$, (\triangle) $\left(\frac{\eta_{288,15}}{\eta_{303,15}}\right)^{\frac{10}{\Delta T}}$; (∇) $\left(\frac{\eta_{303,15}}{\eta_{313,15}}\right)^{\frac{10}{\Delta T}}$; (\triangleleft) $\left(\frac{\eta_{298,15}}{\eta_{308,15}}\right)^{\frac{10}{\Delta T}}$; (\triangleright) $\left(\frac{\eta_{293,15}}{\eta_{303,15}}\right)^{\frac{10}{\Delta T}}$. x — мольная доля аддукта C_{60} с L-аргинином.

На Рис. 68 представлены температурные зависимости динамических вязкостей бинарной системы C_{60} -L-аргинин- H_2O . Полученные зависимости были описаны с помощью трёхпараметрического уравнения Фогеля — Фулчера — Таммана (VFT):

$$\lg \eta(T) = \lg \eta_0 + \frac{A}{T - B} \quad (22),$$

где η_0 , A и B — корреляционные параметры.

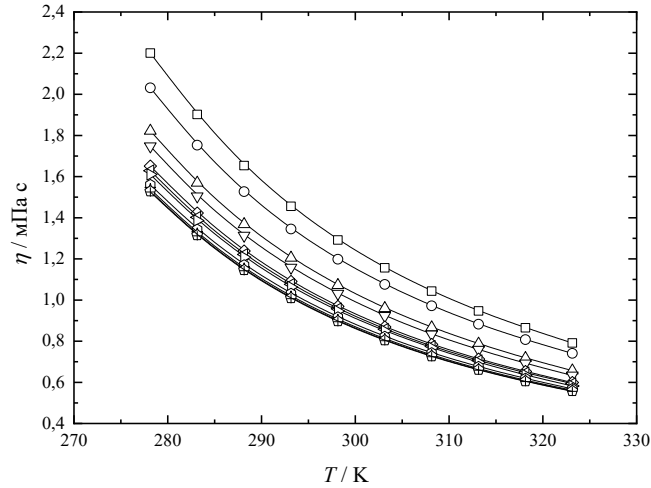


Рис. 68. Температурные зависимости динамической вязкости водных растворов, содержащих аддукт фуллерена C_{60} с L-аргинином: точки — экспериментальные значения, сплошные линии — результаты аппроксимации по уравнению Фогеля — Фулчера — Таммана (уравнение 22): (□) $40 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (○) $30 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (Δ) $20 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (▽) $15 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (◇) $10 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (◁) $7,5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (▷) $5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (⊕) $2,5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (☆) $0,5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (⊕) $0,25 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$; (+) вода.

Абсолютное среднее отклонение (AAD) и стандартное отклонение (SD) между экспериментальными и расчётными значениями были определены по уравнениям 23 и 24:

$$AAD = \left[\sum_{i=1}^n \left(\frac{\eta_{\text{exp},i} - \eta_{\text{cal},i}}{\eta_{\text{exp},i}} \right)^2 \right]^{1/2} \cdot \frac{100}{n} \quad (23),$$

$$SD = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (\eta_{\text{exp},i} - \eta_{\text{cal},i})^2}{(n - p)} \right]^{1/2} \quad (24),$$

где $\eta_{\text{exp},i}$ и $\eta_{\text{cal},i}$ — экспериментальные и рассчитанные значения динамических вязкостей водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином; n — количество измерений, p — количество заданных параметров. Значения параметров уравнения VFT, а также значения SD и AAD представлены в Табл. 9.

Табл. 9. Корреляционные параметры уравнения Фогеля — Фулчера — Таммана. C — концентрация аддукта C_{60} с L-аргинином в водном растворе, SD — стандартное отклонение, AAD — абсолютное среднее отклонение.

	$C_{C_{60}-L-аргинин}, \Gamma \cdot ДМ^{-3}$											
	0	0,25	0,5	1	2,5	5	7,5	10	15	20	30	40
A, K	332,57	332,57	332,57	332,68	332,76	333,02	333,52	333,90	334,58	334,74	335,12	335,21
B, K	116,51	116,51	116,51	116,94	117,21	118,18	120,07	121,57	124,23	124,90	126,44	126,70
$\eta_0, мПа \cdot с$	0,0132	0,0132	0,0132	0,0131	0,0131	0,0129	0,0124	0,0121	0,0117	0,0121	0,0130	0,0144
$SD, мПа \cdot с$	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,006	0,006	0,008	0,010	0,011	0,011	0,008
$AAD, \%$	0,42	0,46	0,60	0,72	0,66	0,81	0,98	1,25	1,58	1,80	1,58	1,37

3.3.3. Рефракция водных растворов аддукта

Экспериментальные значения показателей преломления (n_D) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином в интервале температур $T = 283,15\text{--}323,15$ К представлены в Табл. 10.

Концентрационные зависимости удельных и молярных рефракций водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином были рассчитаны по уравнению Лоренц — Лоренца:

$$r = \left(\frac{n_D^{T^2} - 1}{n_D^{T^2} + 2} \right) \cdot \frac{1}{\rho} \quad (25),$$

$$R = \left(\frac{n_D^{T^2} - 1}{n_D^{T^2} + 2} \right) \cdot \frac{\bar{M}}{\rho} \quad (26),$$

где r , R — удельная и молярная рефракция, \bar{M} — средняя молекулярная масса раствора: $\bar{M} = x_{H_2O} \cdot M_{H_2O} + x_{C_{60}\text{-L-аргинин}} \cdot M_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$. В Табл. 11 представлены полученные удельные и молярные рефракции изученных водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином.

Табл. 10. Концентрационные зависимости показателя преломления (n_D) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином в температурном диапазоне 278,15–323,15 К.

$C, \text{г} \cdot \text{дм}^{-3}$	n_D								
	283,15	288,15	293,15	298,15	303,15	308,15	313,15	318,15	323,15
0,06	1,33374	1,33345	1,33305	1,33256	1,33200	1,33137	1,33067	1,32992	1,32909
0,13	1,33381	1,33351	1,33311	1,33262	1,33207	1,33144	1,33074	1,32998	1,32916
0,25	1,33397	1,33368	1,33328	1,33278	1,33224	1,33161	1,33092	1,33014	1,32933
0,5	1,33438	1,33410	1,33371	1,33320	1,33269	1,33199	1,33130	1,33054	1,32971
1	1,33515	1,33489	1,33450	1,33397	1,33351	1,33275	1,33206	1,33129	1,33043
2,5	1,33573	1,33551	1,33512	1,33460	1,33416	1,33337	1,33269	1,33192	1,33106
5	1,33625	1,33607	1,33569	1,33519	1,33475	1,33395	1,33327	1,33251	1,33163
10	1,33732	1,33716	1,33682	1,33635	1,33591	1,33509	1,33443	1,33366	1,33278
15	1,33841	1,33824	1,33795	1,33754	1,33706	1,33629	1,33564	1,33487	1,33401
20	1,34052	1,34031	1,34007	1,33983	1,33927	1,33858	1,33794	1,33718	1,33636
30	1,34327	1,34292	1,34248	1,34197	1,34139	1,34074	1,34001	1,33921	1,33838

Табл. 11. Рефракционные свойства водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином при 298,15 К. C — объёмная концентрация, n_D — показатель преломления, r и R — удельные и молярные рефракции водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином, $r_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$ и $R_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$ — удельные и молярные рефракции аддукта C_{60} с L-аргинином.

C , $\Gamma \cdot \text{дм}^{-3}$	n_D	r , $\text{см}^3 \cdot \Gamma^{-1}$	R , $\text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$	$r_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$, $\text{см}^3 \cdot \Gamma^{-1}$	$R_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$, $\text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$
0,25	1,33257	0,20603	3,70944	0,246	519
0,5	1,33264	0,20604	3,71051	0,243	513
1	1,33281	0,20606	3,71272	0,244	516
2,5	1,33328	0,20612	3,71935	0,245	518
5	1,33412	0,20622	3,73039	0,246	519
7,5	1,33478	0,20632	3,74152	0,246	519
10	1,33539	0,20641	3,75235	0,245	518
15	1,33659	0,20659	3,77432	0,244	516
20	1,33777	0,20675	3,79596	0,243	513
30	1,34006	0,20705	3,83951	0,241	509
40	1,34238	0,20737	3,88408	0,240	508

Значения молярной ($R_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$) и удельной ($r_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$) рефракций аддукта C_{60} с L-аргинином (Табл. 11) были рассчитаны в соответствии с правилом аддитивности рефракций (уравнения 27 и 28):

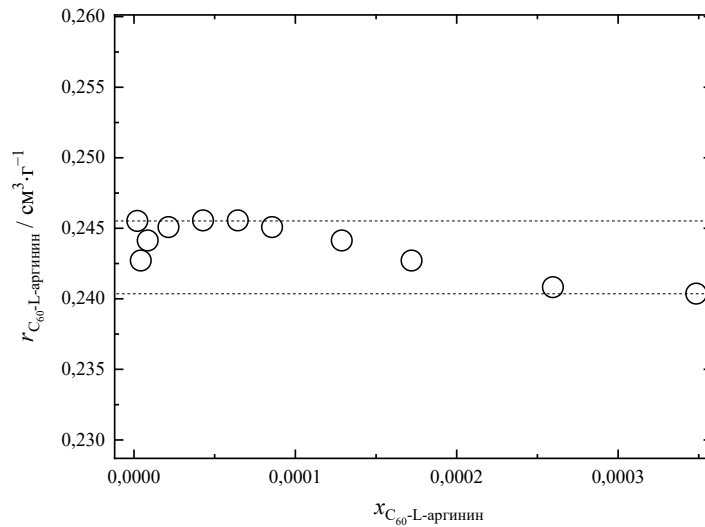
$$r = (r_{H_2O} \cdot w_{H_2O} + r_{C_{60}\text{-L-аргинин}} \cdot w_{C_{60}\text{-L-аргинин}}) \cdot \frac{1}{100} \quad (27),$$

$$R = (R_{H_2O} \cdot x_{H_2O} + R_{C_{60}\text{-L-аргинин}} \cdot x_{C_{60}\text{-L-аргинин}}) \quad (28),$$

где r_i , R_i — удельные и молярные рефракции i -компонента, w_i , x_i — массовые и молярные доли i -компонента.

На Рис. 69 представлены значения удельных и молярных рефракций аддукта C_{60} с L-аргинином в водных растворах при $T = 298,15$ К, рассчитанные с помощью правила аддитивности рефракций.

(а)



(б)

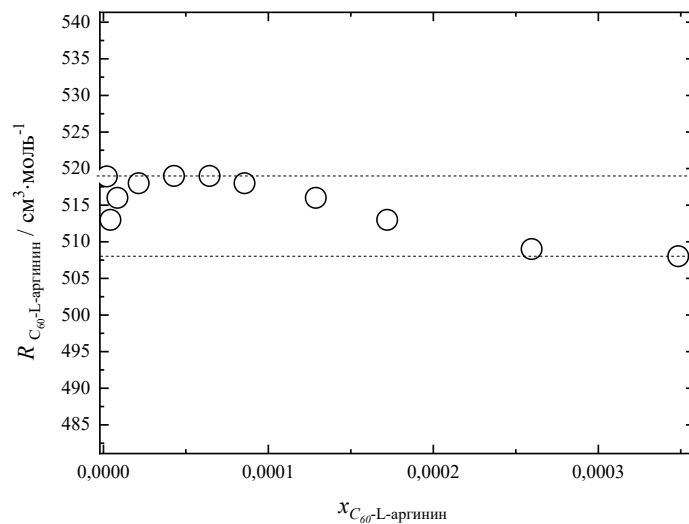


Рис. 69. Концентрационные зависимости удельной (а) и молярной (б) рефракции C_{60} -L-аргинин в водном растворе при 298,15 К; x — мольная доля.

Кроме того, при помощи правила аддитивности Эйзенлора на основе данных по атомным рефракциям и инкрементам химических связей было рассчитано значение молярной рефракции аддукта C_{60} с L-аргинином:

$$R^{add} = 60R_c + 8 \cdot (3R_c + 3R_{CH_2} + 8R_H + 2R_{N(=NH_2)} + 2R_{N(NH)} + R_{O(C=O)} + R_{O(-OH)}) \approx 512 \pm 7 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \quad (29),$$

Установлено, что расхождение в расчёте молярной рефракции связано с выбором спектральных линий (H_α [$\lambda = 658,3$ нм]) и H_γ [$\lambda = 436,1$ нм]). Величина удельной рефракции аддукта C_{60} с L-аргинином была рассчитана в соответствии с уравнением 30:

$$r^{add} = \frac{R^{add}}{M(C_{60}\text{-L-аргинин})} \approx 0,242 \pm 0,03 \text{ м}^3 \cdot \text{г}^{-1} \quad (30).$$

Значения удельной и молярной рефракций аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, рассчитанные по правилу аддитивности Эйзенлора, хорошо согласуются с данными, рассчитанными по показателям преломления растворов.

3.3.4. Размеры частиц в водном растворе и ζ -потенциалы

В Табл. 12 и на Рис. 70 представлена концентрационная зависимость распределения ассоциатов аддукта C_{60} с L-аргинином по размерам в водных растворах в диапазоне концентраций $C = 0,001\text{--}10 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ при $T = 298,15 \text{ К}$.

Табл. 12. Распределение ассоциатов аддукта C_{60} с L-аргинином по размерам в водных растворах при 298,15 К. δ_0 , δ_I , δ_{II} , δ_{III} — средние диаметры мономерной молекулы и ассоциатов первого, второго и третьего порядков; $N_{0 \rightarrow 1}$, $N_{0 \rightarrow 2}$, $N_{0 \rightarrow 3}$ — среднее число мономерных молекул аддукта C_{60} с L-аргинином в ассоциатах первого, второго и третьего порядка, ζ_I , ζ_{II} , ζ_{III} — дзета-потенциалы ассоциатов первого, второго и третьего порядка.

C , г·дм ⁻³	δ_0 , нм	δ_I , нм	δ_{II} , нм	δ_{III} , мкм	$N_{0 \rightarrow 1} \cdot 10^{-4}$	$N_{0 \rightarrow 2} \cdot 10^{-5}$	$N_{0 \rightarrow 3} \cdot 10^{-9}$	ζ_I , мВ	ζ_{II} , мВ	ζ_{III} , мВ
0,001	—	50–70	200–300	—	0,8–2	3–7	—	-30	-40	—
0,01	—	50–70	200–300	—	0,8–2	3–7	—	-30	-40	—
0,1	—	—	200–300	—	—	3–7	—	-30	-40	—
0,2	—	—	200–300	—	—	3–7	—	—	-40	—
0,3	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	—
0,4	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	—
0,5	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	—
1,0	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	—
3,0	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	—
5,0	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	-60
7,0	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	-60
10,0	—	—	200–300	5–6	—	3–7	2–4	—	-40	-60

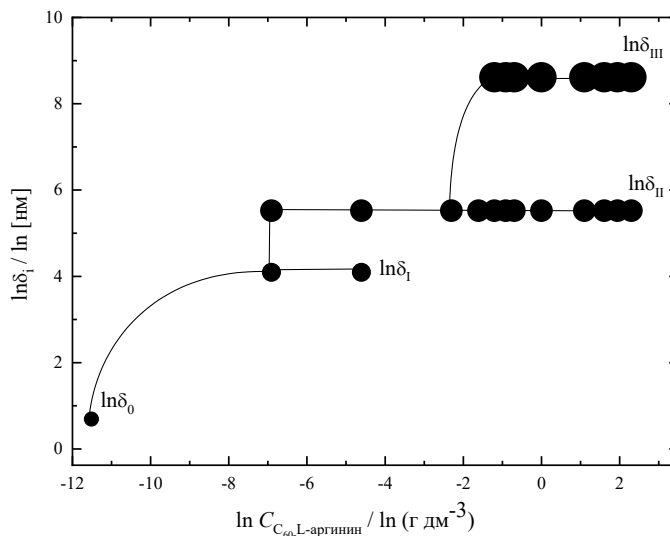


Рис. 70. Концентрационная зависимость распределения по размерам ассоциатов аддукта C_{60} с L-аргинином в водных растворах при 298,15 К; $C_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$ — объёмная концентрация аддукта C_{60} с L-аргинином.

Анализ Табл. 12 и Рис. 70 показывает следующее:

- (1) мономерные молекулы аддукта C_{60} с L-аргинин с линейными размерами ~ 2 нм не обнаружены в диапазоне концентраций $C = 0,001\text{--}10$ г·дм $^{-3}$;
- (2) в диапазоне концентраций $C = 0,001\text{--}0,1$ г·дм $^{-3}$ наблюдается одновременное присутствие ассоциатов первого и второго порядка с линейными размерами 50–70 нм и 200–300 нм, соответственно. Следует отметить, что образование ассоциатов второго порядка обуславливает потерю термодинамической устойчивости раствором [124];
- (3) в диапазоне концентраций $C = 0,1\text{--}0,2$ г·дм $^{-3}$ в растворе присутствуют кластеры только второго порядка с линейными размерами 200–300 нм;
- (4) в диапазоне концентраций $C = 0,3\text{--}10$ г·дм $^{-3}$ в растворе одновременно присутствуют ассоциаты второго и третьего порядков с размерами 200–300 нм и 5–6 мкм, соответственно;
- (5) с использованием уравнения 31 было вычислено среднее число мономерных молекул в кластерах первого ($N_{0\rightarrow 1}$), второго ($N_{0\rightarrow 2}$) и третьего порядка ($N_{0\rightarrow 3}$) (см. Табл. 12):

$$N_{0 \rightarrow i} = \left(\frac{d_i}{d_0} \right)^3 \cdot K_{\text{упак}} \quad (31),$$

где $K_{\text{упак}}$ — формальный упаковочный коэффициент, соответствующий упаковке «малых сфер» в «большую сферу». Из-за сравнительно больших размеров и наличия заряда на аминокислотных остатках был выбран упаковочный коэффициент, соответствующий примитивной кубической ячейке ($K_{\text{упак}} = 0,52$).

Кроме того, с помощью уравнения Гельмгольца — Смолуховского были оценены значения ζ -потенциалов на основе экспериментальных значений электрофоретической подвижности (см. Табл. 12 и Рис. 71).

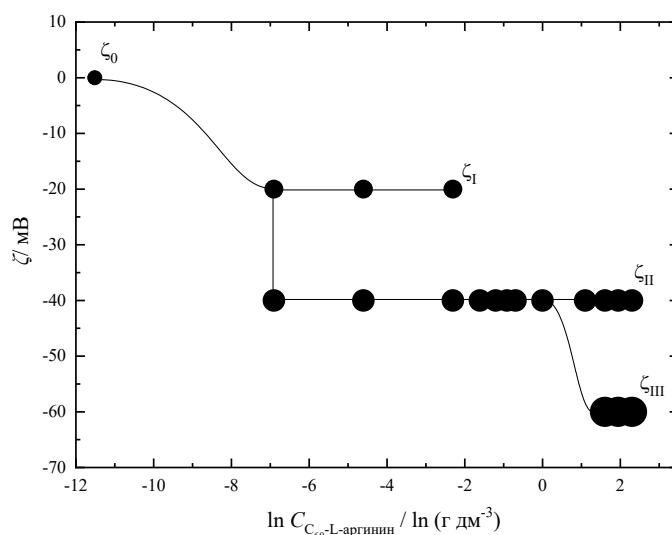


Рис. 71. Концентрационные зависимости ζ -потенциалов ассоциатов аддукта C_{60} с L-аргинином первого, второго и третьего порядков в водных растворах при 298,15 К; $C_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$ — объёмная концентрация.

Анализ концентрационной зависимости ζ -потенциалов (см. Табл. 12 и Рис. 71) показывает следующее:

- (1) в диапазоне концентраций $C = 0,001\text{--}10 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$ значения ζ -потенциалов отрицательны и равны $-(60\text{--}20) \text{ мВ}$;
- (2) во всём диапазоне концентраций растворы аддукта C_{60} с L-аргинином являются электрокинетически устойчивыми;

(3) в концентрационном диапазоне $C = 0,001-0,1 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$ распределение ζ -потенциала включает два пика, соответствующих ассоциатам первого и второго порядка. В диапазоне концентраций $C = 0,2-5 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$ распределение ζ -потенциалов включает один пик, соответствующий ассоциатам второго порядка. В свою очередь, в диапазоне концентраций $C = 5-10 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$ на распределении ζ -потенциала отчётливо проявляется два пика, соответствующих ассоциатам второго и третьего порядков (см. Табл. 12).

(4) сравнение экспериментальных данных, представленных на Рис. 69 и 70, показывает несовпадение размерности ассоциатов в концентрационном диапазоне $C = 0,1-3 \text{ г}\cdot\text{дм}^{-3}$ (см. Табл. 12). Скорее всего, это связано с тем, что под действием электрического потенциала заряженные частицы аддукта C_{60} с L-аргинином могут ассоциировать или диссоциировать в зависимости от соотношения поверхностных зарядов и степени гидратации кластеров.

3.3.5. Растворимость

На Рис. 72 представлена температурная зависимость растворимости в бинарной системе аддукт C_{60} с L-аргинином–вода в интервале температур 293,15–333,15 К.

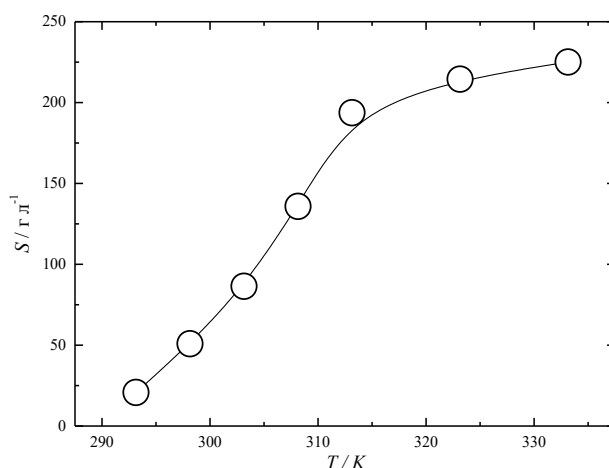


Рис. 72. Температурная зависимость растворимости аддукта C_{60} с L-аргинином в воде в интервале температур 293,15–333,15 К.

Из представленных данных хорошо видно, что растворимость аддукта составляет от десятков до сотен граммов в литре (в зависимости от температуры), подобные значения растворимости хорошо согласуются с экспериментальными

данными, полученными для таких хорошо известных водорастворимых аддуктов как фуллеренолы [94], карбоксилированные фуллерены [95]. Диаграмма растворимости имеет сигмоидный характер. Данный тип зависимости является распространённым для систем, содержащих фуллерены и их производные [95].

3.3.6. Описание зависимостей T - x физических свойств

Температурные и концентрационные зависимости физико-химических свойств растворов (M) аддукта C_{60} с L-аргинином (плотности, вязкости и показателей преломления) описаны с использованием полинома второго порядка, $M(T, x)$ (Рис. 73):

$$M = A + \sqrt{x} \sum_{i=1}^3 b_i \cdot T^{i-1} + \sqrt{1-x} \sum_{i=4}^6 b_i \cdot T^{i-4} \quad (32),$$

где x — мольная доля аддукта C_{60} с L-аргинином, T — абсолютная температура, A , b_i ($i = 1-6$) — корреляционные параметры, рассчитанные методом наименьших квадратов с использованием программного обеспечения Origin 9.

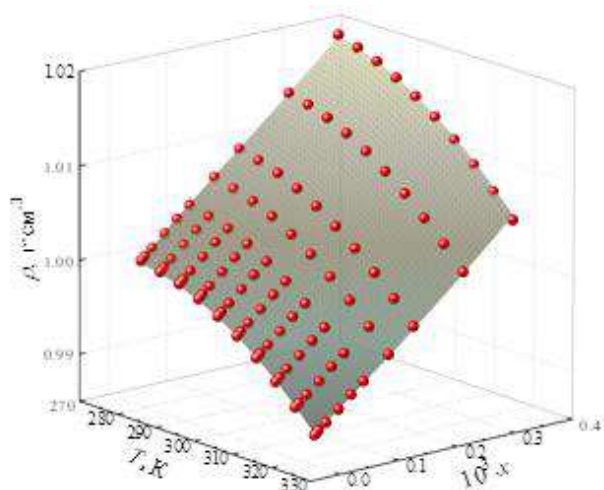
Оценка соответствия между экспериментальными и расчётными значениями физико-химических свойств водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином была проведена путём расчёта стандартного отклонения (SD) и коэффициента детерминации (R^2) по уравнениям 33, 34:

$$SD = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_{\text{exp},i} - x_{\text{cal},i})^2}{n} \right]^{1/2} \quad (33),$$

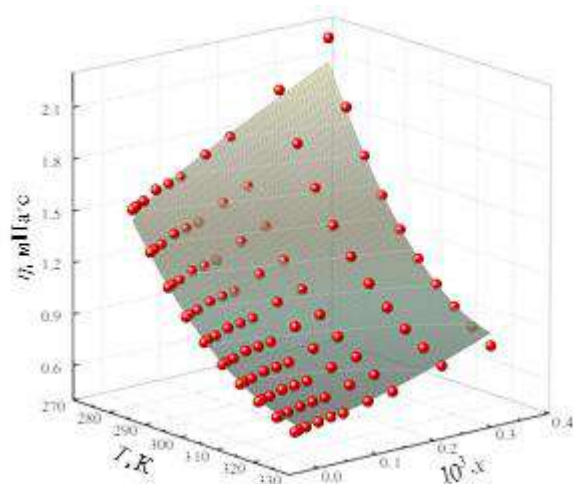
$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n \left(x_{\text{cal},i} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{\text{exp},i} \right)^2}{\sum_{i=1}^n \left(x_{\text{exp},i} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{\text{exp},i} \right)^2} \quad (34),$$

где $x_{\text{cal},i}$ и $x_{\text{exp},i}$ — расчётные и экспериментальные величины, n — число измерений. В Табл. 13 и 14 обобщены корреляционные параметры, а также значения R^2 и SD для T - x зависимостей плотности, вязкости и показателя преломления.

(a)



(б)



(в)

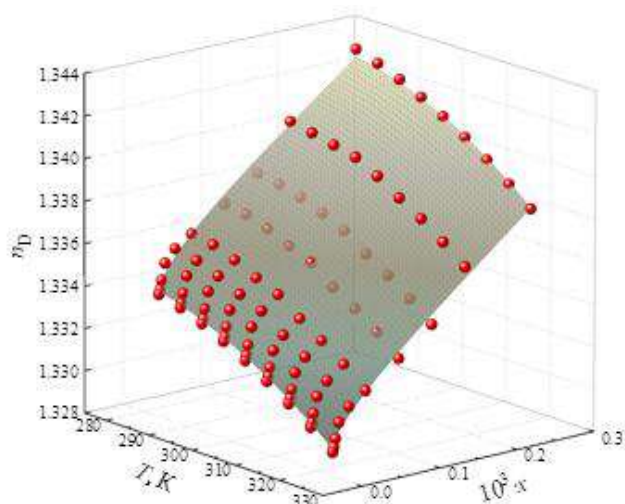


Рис. 73. Температурная и концентрационная зависимость плотности (а), вязкости (б) и показателя преломления (в) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином; ρ — плотность раствора, η — динамическая вязкость, n_D — показатель преломления, T — абсолютная температура, x — мольная доля. Экспериментальные данные представлены красными сферами, поверхности представляют собой данные, рассчитанные с использованием уравнения 32.

Табл. 13. Корреляционные параметры A , b_i ($i = 1-6$) полиномиального уравнения 32 для описания температурных и концентрационных зависимостей плотности (ρ), динамической вязкости (η) и показателей преломления (n_D) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином. R^2 — коэффициент детерминации (уравнение 34).

Свойства раствора	A	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	b_6	R^2
ρ , г·см ⁻³	101,681	1,574	$-8,57 \cdot 10^{-3}$	$1,16 \cdot 10^{-3}$	-101,017	$2,48 \cdot 10^{-3}$	$-4,57 \cdot 10^{-6}$	0,9998
η , мПа·с	2654,894	828,853	-5,052	$7,58 \cdot 10^{-3}$	-2616,051	-0,2338	$3,57 \cdot 10^{-4}$	0,9968
n_D	48,637	2,998	-0,0203	$3,46 \cdot 10^{-5}$	-47,412	$8,26 \cdot 10^{-4}$	$-1,56 \cdot 10^{-6}$	0,9996

Табл. 14. Стандартные отклонения (SD) для рассчитанных значений плотности (ρ), динамической вязкости (η) и показателя преломления (n_D) водных растворов аддукта C_{60} с L-аргинином (уравнение 33).

T, K	SD		
	$\rho, g \cdot cm^{-3}$	$\eta, mPa \cdot s$	n_D
278,15	0,00009	0,0033	—
283,15	0,00008	0,0022	0,00005
288,15	0,00005	0,0024	0,00004
293,15	0,00006	0,0018	0,00005
298,15	0,00004	0,0008	0,00004
303,15	0,00004	0,0012	0,00004
308,15	0,00006	0,0019	0,00004
313,15	0,00008	0,002	0,00004
318,15	0,00009	0,0015	0,00004
323,15	0,00011	0,0025	0,00007

3.4. Биосовместимость и биологическая активность аддукта лёгкого фуллерена C_{60} с L-аргинином

3.4.1. Цитотоксичность

Изучение цитотоксичности аддукта проводили с помощью реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) на клеточной линии НЕК293 (клетки почки эмбриона человека). В результате взаимодействия реагента МТТ с НАД(Ф)Н-зависимыми клеточными оксидоредуктазами образуется окрашенный продукт — формаза, с максимумом поглощения при длине волны 540 нм, содержание которого пропорционально количеству жизнеспособных клеток (Рис. 74).

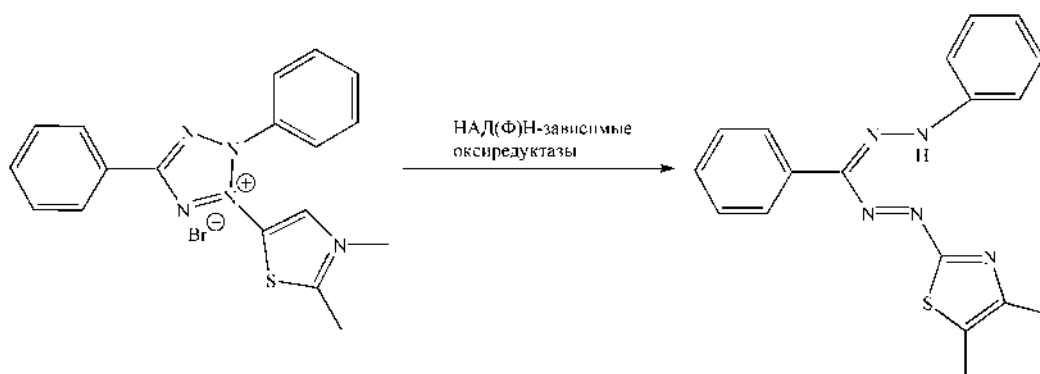


Рис. 74. Схема реакции восстановления тетразолиевого красителя МТТ.

Было установлено, что аддукт C_{60} с L-аргинином в концентрационном диапазоне 1–200 мкМ не вызывал снижение жизнеспособности клеток и не оказывал токсического действия на клетки линии НЕК293 (Рис. 75).

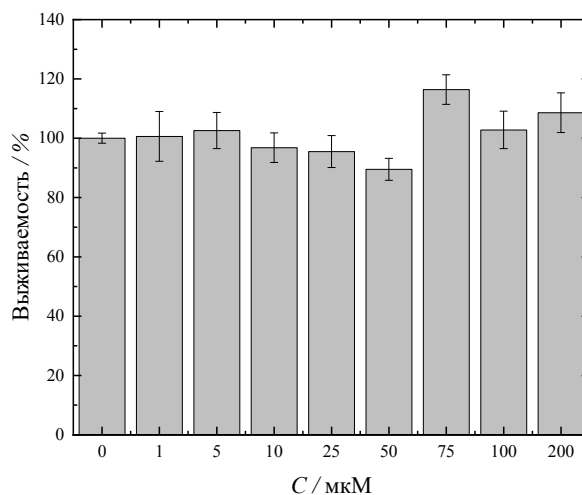


Рис. 75. Зависимость жизнеспособности клеточной линии (НЕК293) от концентрации аддукта C_{60} с L-аргинином. C — молярная концентрация аддукта.

3.4.2. Генотоксичность

ДНК-повреждающее действие аддукта C_{60} с L-аргинином было изучено на клетках моноцитов периферической крови человека. Средние значения содержания ДНК в хвосте комет (%), длины хвоста и хвостового момента комет представлены в Табл. 15.

Табл. 15. Концентрационная зависимость генотоксичности аддукта C₆₀ с L-аргинином.

Изучаемая характеристика	Контроль (фосфатный буфер)	Амплитуда, %				
		C(H ₂ O ₂), мкМ		C(C ₆₀ -L-аргинин), мкМ		
		100,0	10,0	50,0	75,0	100,0
%ДНК хвоста	3,3 ± 0,4	89,1 ± 6,7*	3,4 ± 0,3	4,7 ± 1,4	2,5 ± 0,5	5,6 ± 1,2
Длина хвоста, мкМ	14,0 ± 3,0	492,8 ± 20,6*	9,5 ± 2,3	16,1 ± 3,2	11,0 ± 2,2	19,1 ± 2,9
Хвостовой момент	0,50 ± 0,01	43,1 ± 1,4*	0,30 ± 0,01	0,80 ± 0,04	0,30 ± 0,01	1,07 ± 0,03

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Было установлено, что количество повреждений ДНК моноцитов периферической крови человека в присутствии H_2O_2 значительно больше, чем в контрольных клетках, инкубированных в фосфатном буфере. Аддукт C_{60} с L-аргинином в диапазоне концентраций 10–100 мкМ не оказывал генотоксического влияния на ДНК моноцитов периферической крови человека. В качестве примера на Рис. 76 представлены фотографии ДНК-комет, полученные при инкубации клеток в присутствии H_2O_2 , фосфатного буфера и аддукта C_{60} с L-аргинином.

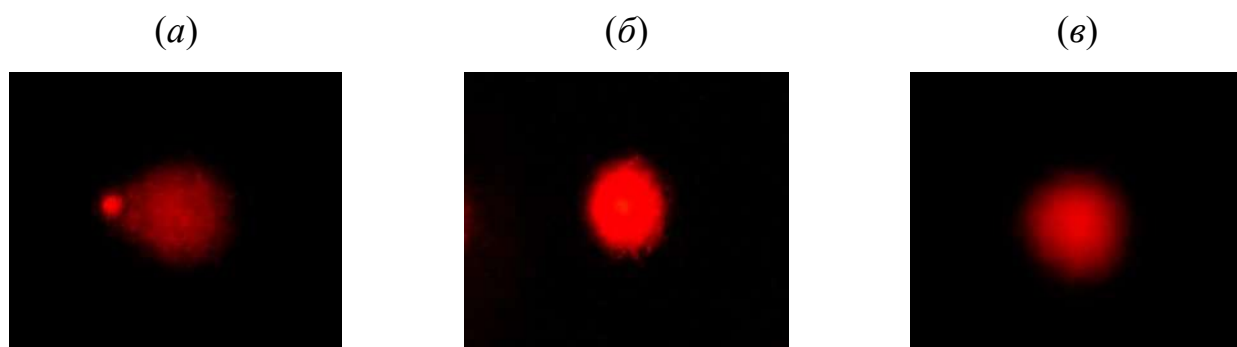


Рис. 76. ДНК кометы после электрофореза в микрогеле клеток: (а) — положительный контроль (H_2O_2), (б) — отрицательный контроль (фосфатный буфер), (в) — аддукт C_{60} с L-аргинином ($C = 100$ мкМ).

3.4.3. Связывание с ЧСА

На Рис. 77 представлена зависимость теплового эффекта реакции взаимодействия аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином с ЧСА при 298,15 К в зависимости от объёма титранта.

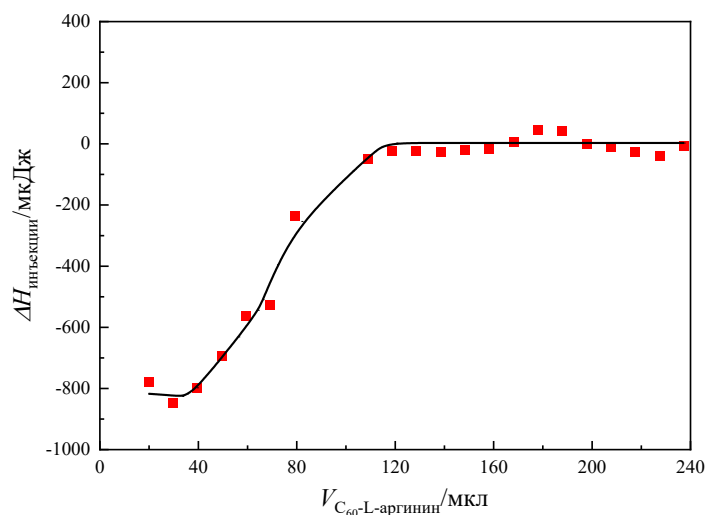


Рис. 77. Зависимость теплового эффекта реакции взаимодействия аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином с ЧСА при 298,15 К. ΔH — тепловой эффект реакции, $V_{C_{60}\text{-L-аргинин}}$ — объём титранта.

На основе полученных экспериментальных данных были рассчитаны параметры взаимодействия аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином с ЧСА на основе термодинамической модели независимого связывания [125]. Полученное значение стехиометрии взаимодействия показывает, что в точке эквивалентности на 1 моль титруемого вещества (ЧСА) приходится 0,7 моль титранта (аддукта) (Табл. 16). Данный факт можно объяснить особенностями структуры изучаемого белка, а именно недоступностью некоторых сайтов связывания в силу стерического фактора. Рассчитанная константа связывания ЧСА с аддуктом ($K_a = 6,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) находятся в эффективном диапазоне $10^4\text{--}10^5 \text{ моль} \cdot \text{дм}^{-3}$, необходимом для выполнения альбумином транспортной функции в кровотоке. В свою очередь, при меньших значениях константы связывания комплексы будут недостаточно прочны, а при больших будет происходить необратимое связывание и аддукт не будет высвобождаться из комплекса с ЧСА [126].

Табл. 16. Термодинамические характеристики взаимодействия аддукта C_{60} с L-аргинином с ЧСА при 298,15 К. K_d — константа диссоциации, K_a — константа связывания, n — стехиометрический коэффициент, ΔH , ΔS , ΔG — изменение энтальпии, энтропии и энергии Гиббса в реакции взаимодействия аддукта с ЧСА, T — абсолютная температура.

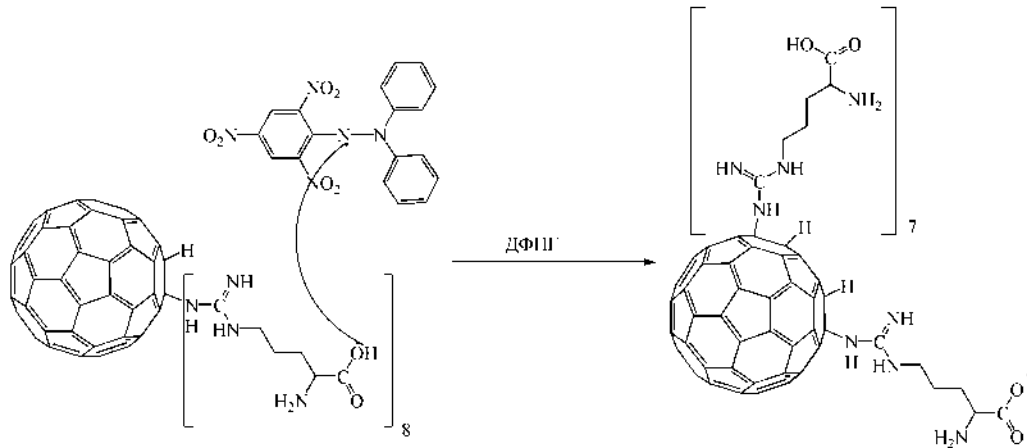
K_d, M^{-1}	n	$\Delta H,$ кДж·моль ⁻¹	$\Delta S,$ Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	$\Delta G,$ кДж·моль ⁻¹	$-T\Delta S,$ кДж·моль ⁻¹	$K_a,$ M ⁻¹
$1,7 \cdot 10^{-6}$	$0,7 \pm 0,07$	$-85,3 \pm 8,5$	$-175 \pm 17,5$	$-33,0 \pm 3,3$	$-52,3 \pm 5,2$	$6,0 \cdot 10^5$

Из представленных значений термодинамических параметров (Табл. 16) видно, что взаимодействие аддукта с ЧСА является экзотермическим процессом. Отрицательные значения ΔH и ΔS являются типичными при образовании водородных связей, поэтому, связывание аддукта с ЧСА происходит за счёт аргининовых остатков фуллеренового аддукта.

3.4.4. Антирадикальная активность

На Рис. 78 показан предполагаемый механизм реакции взаимодействия аддукта C_{60} с L-аргинином с ДФПГ.

(a)



(б)

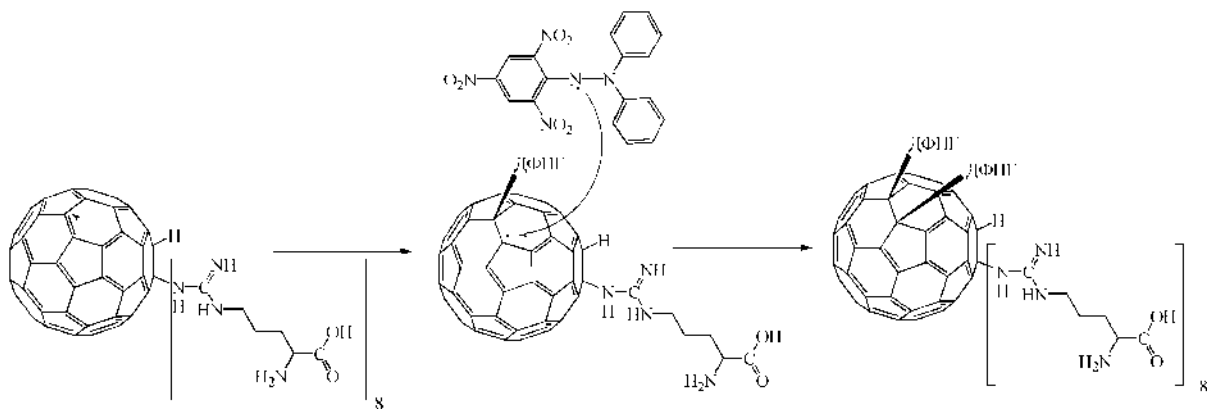


Рис. 78. Предполагаемый механизм взаимодействия аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином с ДФПГ: (а) передача водорода радикалу ДФПГ (быстрая стадия) и (б) нуклеофильная атака $C=C$ связи (медленная стадия).

Для количественной оценки скорости реакции между аддуктом C_{60} с L-аргинином и ДФПГ была использована модель псевдопервого порядка [127]:

$$\ln \frac{A_{\infty} - A_t}{A_{\infty} - A_0} = -kt \quad (35),$$

где A_{∞} , A_t и A_0 — оптические плотности раствора спустя «бесконечность» (через шесть дней после начала эксперимента), в момент времени t и в начальный момент времени, соответственно. Кинетическая зависимость реакции восстановления радикала ДФПГ аддуктом C_{60} с L-аргинином представлена на Рис. 79.

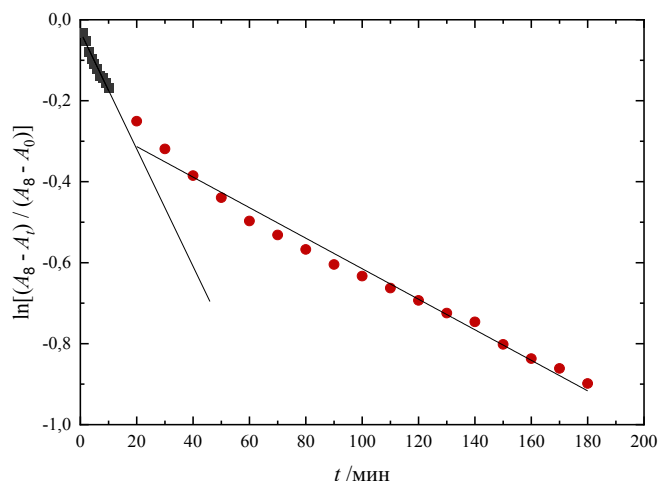


Рис. 79. Кинетическая зависимость реакции восстановления радикала ДФП аддуктом фуллерена.

При помощи уравнения 35 были рассчитаны константы скоростей для двух стадий реакции взаимодействия ДФП с аддуктом C_{60} с L-аргинином: $k_1 = 0,0151 \text{ мин}^{-1}$ (быстрая стадия) и $k_2 = 0,0038 \text{ мин}^{-1}$ (медленная стадия).

Анализ литературы [127] показал, что для фуллерена C_{60} (концентрация 100 мкМ) константа скорости составляет $k_2 = 0,0007 \text{ мин}^{-1}$, для $C_{60}(\text{ОН})_{30}$ $k_1 = 0,0063 \text{ мин}^{-1}$ и $k_2 = 0,0014 \text{ мин}^{-1}$. Кроме того, установлено, что рассчитанные константы скоростей реакции сопоставимы со значения констант скоростей первой и второй стадий для других аддуктов фуллеренов с аминокислотами (Табл. 17).

Табл. 17. Значения констант скорости восстановления ДФП водорастворимыми аддуктами лёгких фуллеренов с аминокислотами.

Соединение	$k_1, \text{мин}^{-1}$	$k_2, \text{мин}^{-1}$
C_{60} -L-аргинин	0,0151	0,0038
C_{70} -L-лизин [128]	0,0313	0,00238
C_{70} -L-треонин [128]	0,0112	0,00127
C_{60} -глицин [129]	0,0352	0,00112
C_{60} -L-гидроксипролин [129]	0,0835	0,00131
C_{60} -L-метионин [129]	0,0301	0,00112
C_{60} -L-цистеин [129]	0,0931	0,00105

Также была рассчитана доля восстановленного радикала (ДВР) по формуле:

$$ДВР = \frac{(A_{ДФПГ} - A_{образец})}{A_{ДФПГ}} \cdot 100\% \quad (36),$$

где $A_{ДФПГ} = 0,302$, $A_{образец}$ — оптические плотности растворов ДФПГ через час после начала измерений в отсутствии и в присутствии антиоксиданта (аскорбат натрия и C_{60} -L-аргинин), соответственно. В результате были получены следующие величины ДВР: $ДВР$ (C_{60} -L-аргинин) = 64,2 %, $ДВР$ (аскорбат натрия) = 86,8 %. Кроме этого, для аддукта была рассчитана величина антиоксидантной эффективности (AE) по формуле:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T_{EC_{50}}} \quad (37).$$

где EC_{50} — количество антиоксиданта, необходимое для восстановления половины радикалов, $T_{EC_{50}}$ — время восстановления половины радикалов.

Расчёты показали, что величина AE для аддукта составляет $2,39 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ($T_{EC_{50}} = 4189 \text{ с}$, $EC_{50} = 100 \text{ мкМ}$). Согласно литературным данным [130], для синтетического промышленного антиоксиданта ионола величина AE составляет $0,58 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ($T_{EC_{50}} = 2100 \text{ с}$, $EC_{50} = 82 \text{ мкМ}$). Из полученных данных следует, что аддукт обладает выраженными антирадикальными свойствами.

Глава 4. Основные результаты и выводы

1. Разработан новый метод получения водорастворимого аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином, позволяющий получить конечный продукт с выходом более 90 %. Полученное соединение было идентифицировано с использованием комплекса физико-химических методов анализа: ^{13}C ЯМР-, ИК-спектроскопия, термогравиметрический анализ, элементный анализ и ВЭЖХ.
2. Изучены термодинамические свойства аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином в широком интервале температур $T = 13\text{--}326$ К методом адиабатической вакуумной калориметрии. Установлено, что в изученном интервале температур не наблюдаются фазовых переходов; на основании экспериментальных данных по температурной зависимости изобарной теплоёмкости были рассчитаны стандартные термодинамические функции $S_m^\circ(T)$, $[H_m^\circ(T) - H_m^\circ(0)]$ и $[\Phi_m^\circ(T) - \Phi_m^\circ(0)]$.
3. Проведено исследование физико-химических свойств водных растворов аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином: изучены плотности, вязкости, показатели преломления, распределение частиц по размерам и ζ -потенциалы. Установлено, что аддукт фуллерена C_{60} с L-аргинином имеет большие отрицательные значения парциальных молярных объёмов в водных растворах, что свидетельствует о сильном структурировании растворов. Показано, что водные растворы аддукта ассоциированы и размер ассоциатов варьируется от 50 нм до 6 мкм в зависимости от концентрации.
4. Исследована биосовместимость аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином. Показано, что аддукт связывается с ЧСА и не проявляет цито- и генотоксичности.
5. Изучено взаимодействие аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином со стабильным радикаломДФПГ. Установлено, что аддукт обладает антирадикальной активностью, которая сопоставима с антирадикальной активностью промышленного антиоксиданта ионола.

Перечень сокращений

АЕ — антиоксидантная эффективность

АСМ — атомно-силовая микроскопия

АФК — активные формы кислорода

БСА — бычий сывороточный альбумин

ВПГ — вирус простого герпеса

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ДВР — доля восстановленного радикала

ДМСО — диметилсульфоксид

НАД(Ф)Н — никотинамид- β -адениндинуклеотидфосфат

Пептид Т — синтетически полученный белок на основе белка gp 120 вируса ВИЧ 1, способный связываться с CD4 рецепторами Т-лимфоцитов

Пептид Т(4–8) — пентапептидный аналог в V2-области белка gp120, который блокирует вирусную активность ВИЧ (последовательностью аминокислот Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr)

ЦВ — циклическая вольтамперометрия

ЦМВИ — цитомегаловирусная инфекция

ЦПД — цитопатическое действие

ЧСА — человеческий сывороточный альбумин

Аib — α -аминоизомаляновая кислота

A172 — клеточная линия глиобластомы человека

A549 — клеточная линия карциномы лёгкого человека

Вос — *трет*-бутилоксикарбонильная группа

САТ — каталаза

CD4 — кластер дифференцировки

СОР — С₆₀-пептид

СР/MAS — кросс-поляризационная последовательность возбуждающих импульсов

Cys3 — цистатион гамма-лиаза

DCC/NOBt — *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксибензотриазол

- DFT — теория функционала плотности (Density Functional Theory)
- DFT-MD — метод молекулярной динамики на основе теории функционала плотности
- DiGln — диглюкуронид
- DMAP — 4-диметиламинопиридин
- DMEM — модифицированная среда Дульбекко Eagle Medium
- DMol³ — метод DFT, реализованный с использованием атомных волновых функций с применением модели PCM
- Fab — фрагмент связывания антигена
- FBO — определение порядков связей для «нечётких» атомов
- Fgu — фуллеропирролидиноглутаминовая кислота
- Fmoc — флуоренилметилоксикарбонильная группа
- Fmoc-Cl — 9-флуоренилметилхлорформиат
- FOX — каталитическое окисление железа
- Fpr — 3,4-фуллеропрولين
- GlcNac — *N*-ацетилглюкозамин
- GluEg — модифицированная этиленгликолем боковая цепь глутаминовой кислоты
- GSH-Px — глутатионпероксидаза
- HEPES — (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)
- HEWL — лизоцим, выделенный из яичного белка курицы
- HF — метод Хартри-Фока (Hartree–Fock method)
- HMP — *n*-бензилоксибензиловый спирт
- HSA — человеческий сывороточный альбумин
- HaCaT — клеточная линия иммортализованных клеток кожи человека
- HEK 293 — клетки почки эмбриона человека
- HeLa — клеточная линия аденокарциномы шейки матки человека
- Hyp — гидроксипролин
- IC₅₀ — концентрация полумаксимального ингибирования
- Lm8 — линия опухолевых клеток остеогенной саркомы мыши
- MT-4 — лимфобластоидные клетки человека

- MurNac — *N*-ацетилмураминовая кислота
- MWCO — предельные отсечения по молекулярной массе
- NADH — восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
- Nle — норлейцин
- PAL — пептидный амидный линкер
- PBE — функционал Пердью — Бёрка — Эрнцерхофа
- Pbf — 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил
- PCM — модель поляризуемого континуума
- PC12 — клеточная линия феохромоцитомы крысы
- PEКС — клетки почки эмбриона свиньи
- PEG — полиэтиленгликоль
- Phl — фенилаланинол
- Pmc — 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил
- POEPOP — полиоксиэтиленполиоксипропилен
- PS — полистирол
- $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ — рутений-*трис*(2,2'-бипиридил)
- SMMC-7721 — клеточная линия гепатокарциномы человека
- TFA — трифторуксусная кислота
- TEMPO — (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил
- TG — термогравиметрия
- TOAC — 2,2,6,6-тетраметил-*N*-оксил-4-амино-4-карбоновая кислота
- VFT — уравнение Фогеля — Фулчера — Таммана

Благодарности

Выражаю глубокую благодарность моим научным руководителям — доктору биологических наук, ведущему научному сотруднику кафедры химии твёрдого тела Шаройко Владимиру Владимировичу и доктору химических наук, профессору кафедры химии твёрдого тела Семёнову Константину Николаевичу — за их помощь и поддержку в организации и проведении диссертационного исследования. Особую благодарность выражаю доктору химических наук, профессору, заведующему кафедрой химии твёрдого тела Мурину Игорю Васильевичу за помощь в организации диссертационного исследования на кафедре и сотрудникам кафедры химии твёрдого тела.

Идентификация и изучение физико-химических свойств аддукта фуллерена C_{60} с L-аргинином были проведены с использованием оборудования ресурсных центров «Инновационные технологии композитных наноматериалов», «Магнитно-резонансные методы исследования», «Методы анализа состава вещества», «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования», Научного парка СПбГУ и Центра коллективного пользования научным оборудованием «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» ННГУ им. Н. И. Лобачевского. Проведение биомедицинских исследований осуществлялось на базе кафедры общей и биоорганической химии и лаборатории биомедицинского материаловедения ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России.

Список литературы

1. Kroto H.W. et al. C₆₀: Buckminsterfullerene // Nature. Nature Publishing Group, 1985. Vol. 318, № 6042. P. 162–163.
2. Krätschmer W. et al. Solid C₆₀: a new form of carbon // Nature. 1990. Vol. 347, № 6291. P. 354–358.
3. Krokosz A. et al. Carbon nanoparticles as possible radioprotectors in biological systems // Radiation Physics and Chemistry. 2016. Vol. 128. P. 143–150.
4. Ghasemzadeh P. et al. Protective effect of ²⁵Mg-porphyrin-fullerene nanoparticles on oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in PC12 cells // Acta Med Iran. 2016. Vol. 54, № 8. P. 478–484.
5. Rašović I. Water-soluble fullerenes for medical applications // Materials Science and Technology. Taylor & Francis, 2017. Vol. 33, № 7. P. 777–794.
6. Goodarzi S. et al. Fullerene: Biomedical engineers get to revisit an old friend // Materials Today. Elsevier, 2017. Vol. 20, № 8. P. 460–480.
7. Hsieh F.-Y. et al. Water-Soluble Fullerene Derivatives as Brain Medicine: Surface Chemistry Determines If They Are Neuroprotective and Antitumor // ACS Appl Mater Interfaces. 2017. Vol. 9, № 13. P. 11482–11492.
8. Miao, Y., Zhao, H., Chen, J., Wang, M., Wen L.-P. The Application of *In Vivo* Extracellular Recording Technique to Study the Biological Effects of Nanoparticles in Brain // Use of Nanoparticles in Neuroscience / ed. Santamaria F., Peralta X. Humana Press, 2018. P. 171–186.
9. Mahdi J.F. et al. Effect of Viscosity and Density of Substance on Dielectric Properties of Medicinal Compounds in Solution // Nano Biomed Eng. 上海交通大学, 2020. Vol. 12, № 4. P. 351–357.
10. Jiang G., Yang Y. Preparation and tribology properties of water-soluble fullerene derivative nanoball // Arabian Journal of Chemistry. Elsevier, 2017. Vol. 10. P. S870–S876.

11. Gao J. et al. Polyhydroxy Fullerenes (Fullerols or Fullerenols): Beneficial Effects on Growth and Lifespan in Diverse Biological Models // PLoS One / ed. Willson R.C. 2011. Vol. 6, № 5. P. e19976.
12. Yang J. et al. Fullerene-Derivatized Amino Acids: Synthesis, Characterization, Antioxidant Properties, and Solid-Phase Peptide Synthesis // Chemistry - A European Journal. 2007. Vol. 13, № 9. P. 2530–2545.
13. Bianco A. et al. Fullerene-based amino acids and peptides // Journal of Peptide Science. 2001. Vol. 7, № 4. P. 208–219.
14. Toniolo C. et al. A Bioactive Fullerene Peptide // J Med Chem. American Chemical Society, 1994. Vol. 37, № 26. P. 4558–4562.
15. Marastoni M. et al. Structure-activity relationships of peptide T-related pentapeptides. // Arzneimittelforschung. 1989. Vol. 39, № 8. P. 926–928.
16. Sofou P. et al. Synthesis of a proline-rich [60]fullerene peptide with potential biological activity // Tetrahedron. 2004. Vol. 60, № 12. P. 2823–2828.
17. Bianco A. et al. Solid-phase synthesis and characterization of a novel fullerene-peptide derived from histone H3 // Org Biomol Chem. The Royal Society of Chemistry, 2003. Vol. 1, № 23. P. 4141–4143.
18. Zhang Y. et al. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation mediated by a cationic fullerene by added iodide: *in vitro* and *in vivo* studies. // Nanomedicine (Lond). NIH Public Access, 2015. Vol. 10, № 4. P. 603–614.
19. Li Q., Liu C., Li H. Induction of Endogenous Reactive Oxygen Species in Mitochondria by Fullerene-Based Photodynamic Therapy // J Nanosci Nanotechnol. 2016. Vol. 16, № 6. P. 5592–5597.
20. Nishizawa C. et al. Pyrrolidinium-type fullerene derivative-induced apoptosis by the generation of reactive oxygen species in HL-60 cells // Free Radic Res. Taylor & Francis, 2009. Vol. 43, № 12. P. 1240–1247.
21. Iwase Y. et al. Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acid fullerene // Jpn J Appl Phys. IOP Publishing, 2016. Vol. 55, № 7S1. P. 07KF02.

22. Hardt J.I. et al. Pharmacokinetics and Toxicology of the Neuroprotective e,e,e-Methanofullerene(60)-63-tris Malonic Acid [C3] in Mice and Primates // *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* Springer International Publishing, 2018. P. 1–12.
23. Mashino T. et al. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives. // *Bioorg Med Chem Lett.* Elsevier Limited, 2005. Vol. 15, № 4. P. 1107–1109.
24. Kumarasamy N., Krishnan S. Beyond first-line HIV treatment regimens // *Curr Opin HIV AIDS.* 2013. Vol. 8, № 6. P. 586–590.
25. Paydary K. et al. The emergence of drug resistant HIV variants and novel anti-retroviral therapy. // *Asian Pac J Trop Biomed.* China Humanity Technology Publishing House, 2013. Vol. 3, № 7. P. 515–522.
26. Liu Q. et al. Fullerene-Induced Increase of Glycosyl Residue on Living Plant Cell Wall // *Environ Sci Technol.* American Chemical Society, 2013. Vol. 47, № 13. P. 7490–7498.
27. Yin J.-J. et al. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials // *Biomaterials.* 2009. Vol. 30, № 4. P. 611–621.
28. Kole C. et al. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*) // *BMC Biotechnol.* BioMed Central, 2013. Vol. 13, № 1. P. 37.
29. Troshin P.A., Lyubovskaya R.N. Organic chemistry of fullerenes: the major reactions, types of fullerene derivatives and prospects for practical use // *Russian Chemical Reviews.* 2008. Vol. 77, № 4. P. 323–369.
30. Hirsch A., Li Q., Wudl F. 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.* Wiley-Blackwell, 1991. Vol. 30, № 10. P. 1309–1310.

31. Hu Z. et al. Photodynamic anticancer activities of water-soluble C₆₀ derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line // *Chem Biol Interact.* Elsevier, 2012. Vol. 195, № 1. P. 86–94.
32. Romanova V.S. et al. Addition of amino acids and dipeptides to fullerene C₆₀ giving rise to monoadducts // *Russian Chemical Bulletin.* 1994. Vol. 43, № 6. P. 1090–1091.
33. Vol'pin M.E., Parnes Z.N., Romanova V.S. Amino acid and peptide derivatives of fullerene // *Russian Chemical Bulletin.* Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1998. Vol. 47, № 5. P. 1021–1025.
34. Kotelnikova R.A. et al. Nanobionics of Pharmacologically Active Derivatives of Fullerene C₆₀ // *Journal of Nanoparticle Research.* Kluwer Academic Publishers, 2003. Vol. 5, № 5/6. P. 561–566.
35. Kotel'nikova R.A. et al. Antioxidant properties of water-soluble amino acid derivatives of fullerenes and their role in the inhibition of herpes virus infection // *Russian Chemical Bulletin.* Springer US, 2011. Vol. 60, № 6. P. 1172–1176.
36. Frog E.S., Kotelnikova RA, Bogdanov GN, Shtolko VN F.I., Kushch AA, Fedorova NE, Medzhidova AA R.V. Effect of amino acid derivatives of fullerene C₆₀ on the development of cytomegalovirus infection [Electronic resource] // *Technologies of living systems.* 2003. P. 42–46.
37. Belavtseva E.M. et al. Investigation of structures of micelles of a fullerene derivative of alanine in aqueous solutions by tunneling scanning microscopy // *Russian Chemical Bulletin.* 1996. Vol. 45, № 4. P. 831–833.
38. Jiang G. et al. Synthesis and properties of novel water-soluble fullerene–glycine derivatives as new materials for cancer therapy // *J Mater Sci Mater Med.* Springer US, 2015. Vol. 26, № 1. P. 24.
39. Li Z. et al. Preparation and Characterization of Fullerene (C₆₀) Amino Acid Nanoparticles for Liver Cancer Cell Treatment // *J Nanosci Nanotechnol.* 2014. Vol. 14, № 6. P. 4513–4518.

40. Hu Z. et al. Synthesis of glutathione C₆₀ derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells. // *Neurosci Lett*. 2007. Vol. 429, № 2–3. P. 81–86.
41. Hu Z. et al. Synthesis of β-alanine C₆₀ derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells // *Cell Biol Int*. Wiley-Blackwell, 2007. Vol. 31, № 8. P. 798–804.
42. Hu Z. et al. Synthesis of amphiphilic amino acid C₆₀ derivatives and their protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells // *Carbon N Y*. 2008. Vol. 46, № 1. P. 99–109.
43. Hu Z. et al. The protective activities of water-soluble C(60) derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells. // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, № 34. P. 8872–8881.
44. Khalikov Sh.Kh. et al. Synthesis and Characterization of Fullero-C₆₀ α-Amino Acids with Antiviral Properties // *Chem Nat Compd*. Springer US, 2017. Vol. 53, № 1. P. 121–127.
45. Rasnetsov L.D. The agent for inhibiting the reproduction of enveloped viruses, process of its preparing, pharmaceutical composition and method for inhibiting viral infections.: pat. RU2236852 USA. Россия, 2004.
46. Rasnetsov L.D. Hydrated n-fullerene-amino acid derivatives, method for preparing them and based pharmaceutical compositions.: pat. RU2458046 USA. Россия, 2012.
47. Maggini M., Scorrano G., Prato M. Addition of azomethine ylides to C₆₀: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines // *J Am Chem Soc*. American Chemical Society, 1993. Vol. 115, № 21. P. 9798–9799.
48. Watanabe L.A. et al. Synthesis of novel fullerene amino acids and their multifullerene peptides // *Tetrahedron Lett*. 2004. Vol. 45, № 38. P. 7137–7140.
49. Zhang J., Yuan L., Zhang Y.D. Synthesis of Fullerene-Acid Conjugates // *Adv Mat Res*. Trans Tech Publications, 2012. Vol. 463–464. P. 538–542.
50. Naixing Wang et al. A C₆₀-derivatized dipeptide // *Tetrahedron Lett*. Pergamon, 1995. Vol. 36, № 3. P. 431–434.

51. Prato M. et al. Synthesis and characterization of the first fullerene-peptide // *J Org Chem. American Chemical Society*, 1993. Vol. 58, № 21. P. 5578–5580.
52. König W., Geiger R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. // *Chem Ber.* 1970. Vol. 103, № 3. P. 788–798.
53. Zhmak O.M., Volpina M.A., Kupriyanova T.M., Andronova E.A., Makarov V.S., Romanova Z.N., Parnes M.E., Volpin V.T. Glycopeptide fullerene derivative showing adjuvant activity: pat. RU2124022 USA. 1997.
54. Polese A. et al. Solvent-Dependent Intramolecular Electron Transfer in a Peptide-Linked $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ - C_{60} Dyad // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 1999. Vol. 121. P. 3446–3452.
55. Ousaka N. et al. “Helix-in-Helix” Superstructure Formation through Encapsulation of Fullerene-Bound Helical Peptides within a Helical Poly(methyl methacrylate) Cavity // *Angewandte Chemie International Edition. John Wiley & Sons, Ltd*, 2017. Vol. 56, № 3. P. 791–795.
56. Mazzoni M., Conti F., Corvaja C. The sign of the exchange interaction between triplet excited fullerene and nitroxide free radicals // *Appl Magn Reson. Springer-Verlag*, 2000. Vol. 18, № 3. P. 351–361.
57. Kurz A. et al. A fullerene-modified protein // *Chemical Communications. Royal Society of Chemistry*, 1998. Vol. 0, № 3. P. 433–434.
58. Prato M. et al. Synthesis and electrochemical properties of substituted fulleropyrrolidines // *Tetrahedron. Pergamon*, 1996. Vol. 52, № 14. P. 5221–5234.
59. Kim K.-H. et al. Protein-directed self-assembly of a fullerene crystal // *Nat Commun. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 7. P. 11429.
60. Grigoryan G. et al. Computational Design of Virus-Like Protein Assemblies on Carbon Nanotube Surfaces // *Science (1979)*. 2011. Vol. 332, № 6033. P. 1071–1076.
61. Xu D. et al. A Novel method for the preparation of fluorescent C_{60} poly(amino acid) composites and their biological imaging // *J Colloid Interface Sci.* 2018. Vol. 516. P. 392–397.

62. Jung G. et al. Template-free self-assembling fullerene and lipopeptide conjugates of alamethicin form voltage-dependent ion channels of remarkable stability and activity // *Journal of Peptide Science*. Wiley-Blackwell, 2003. Vol. 9, № 11–12. P. 784–798.
63. Bianco A. et al. Synthesis, Chiroptical Properties, and Configurational Assignment of Fulleroproline Derivatives and Peptides // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 1996. Vol. 118, № 17. P. 4072–4080.
64. Pellarini F. et al. A Novel [60]Fullerene Amino Acid for Use in Solid-Phase Peptide Synthesis // *Org. Lett.* American Chemical Society, 2001. Vol. 3, № 12. P. 1845–1848.
65. Pantarotto D. et al. Solid-Phase Synthesis of Fullerene-peptides // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2002. Vol. 124, № 42. P. 12543–12549.
66. Xu Y. et al. Synthesis and immunomodulatory activity of [60]fullerene–tuftsin conjugates // *Biomaterials*. Elsevier, 2011. Vol. 32, № 36. P. 9940–9949.
67. Dostalova S. et al. Antiviral activity of fullerene C₆₀ nanocrystals modified with derivatives of anionic antimicrobial peptide maximin H5 // *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2016. Vol. 147, № 5. P. 905–918.
68. Jennepalli S. et al. Synthesis of Mono and Bis[60]fullerene-Based Dicationic Peptoids // *European J Org Chem*. Wiley-Blackwell, 2015. Vol. 2015, № 1. P. 195–201.
69. Aroua S., Schweizer W.B., Yamakoshi Y. C₆₀ Pyrrolidine Bis-carboxylic Acid Derivative as a Versatile Precursor for Biocompatible Fullerenes // *Org Lett.* American Chemical Society, 2014. Vol. 16, № 6. P. 1688–1691.
70. Strom T.A., Barron A.R. A simple quick route to fullerene amino acid derivatives // *Chemical Communications*. The Royal Society of Chemistry, 2010. Vol. 46, № 26. P. 4764.
71. Tsumoto H. et al. Preparation of C₆₀-based active esters and coupling of C₆₀ moiety to amines or alcohols. // *Bioorg Med Chem Lett*. 2008. Vol. 18, № 2. P. 657–660.

72. Reiriz C. et al. α,γ -Peptide Nanotube Templating of One-Dimensional Parallel Fullerene Arrangements // *J Am Chem Soc.* 2009. Vol. 131, № 32. P. 11335–11337.
73. Garbuio L. et al. Effect of Orientation of the Peptide-Bridge Dipole Moment on the Properties of Fullerene–Peptide–Radical Systems // *J Am Chem Soc. American Chemical Society*, 2012. Vol. 134, № 25. P. 10628–10637.
74. Fujii S., Morita T., Kimura S. Photoinduced electron transfer in thin layers composed of fullerene-cyclic peptide conjugate and pyrene derivative. // *Langmuir*. 2008. Vol. 24, № 10. P. 5608–5614.
75. Fujii S., Morita T., Kimura S. Fabrication of Langmuir–Blodgett Film of a Fullerene Derivative with a Cyclic Peptide as an Anchor // *Bioconjug Chem. American Chemical Society*, 2007. Vol. 18, № 6. P. 1855–1859.
76. Stewart M.H. et al. Competition between Förster Resonance Energy Transfer and Electron Transfer in Stoichiometrically Assembled Semiconductor Quantum Dot–Fullerene Conjugates // *ACS Nano*. 2013. Vol. 7, № 10. P. 9489–9505.
77. Minois P. et al. [60]Fullerene L-Amino Acids and Peptides: Synthesis under Phase-Transfer Catalysis Using a Phosphine–Borane Linker. *Electrochemical Behavior* // *J Org Chem*. 2017. Vol. 82, № 21. P. 11358–11369.
78. Siepi M. et al. Modified denatured lysozyme effectively solubilizes fullerene c60 nanoparticles in water // *Nanotechnology*. 2017. Vol. 28, № 33. P. 335601.
79. Chen B.-X. et al. Antigenicity of fullerenes: Antibodies specific for fullerenes and their characteristics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. Vol. 95, № 18. P. 10809–10813.
80. Benyamini H. et al. Interaction of C₆₀-Fullerene and Carboxyfullerene with Proteins: Docking and Binding Site Alignment // *Bioconjugate Chem. American Chemical Society*, 2006. Vol. 17, № 2. P. 378–386.
81. Lebedev B. V. et al. Thermodynamics of C₆₀ fullerene in the 0–340 K range // *Russian Chemical Bulletin. Kluwer Academic/Plenum Publishers*, 1996. Vol. 45, № 9. P. 2113–2117.

82. Lebedev B.V., Bykova T.A., Lobach A.S. Thermodynamic properties of hydrofullerene C₆₀H₃₆ from 5 to 340 K // *J Therm Anal Calorim.* Kluwer Academic Publishers, 2000. Vol. 62, № 1. P. 257–265.
83. Lelet M.I. et al. Thermodynamic and thermal properties of the C₆₀-l-lysine derivative // *J Chem Thermodyn.* 2017. Vol. 115. P. 7–11.
84. Podolsky N.E. et al. Thermodynamic properties from calorimetry and density functional theory and the thermogravimetric analysis of the fullerene derivative C₆₀(OH)₄₀ // *J Chem Eng Data.* American Chemical Society, 2019. Vol. 64, № 4. P. 1480–1487.
85. Podolsky N.E. et al. Thermodynamic properties of the C₇₀(OH)₁₂ fulleranol in the temperature range $T = 9.2$ K to 304.5 K // *Journal of Chemical Thermodynamics.* Academic Press, 2020. Vol. 144, № 3. P. 106029.
86. Timofeeva G.I., Romanova V.S., Lopanova L.A. Molecular characteristics of water-soluble fullerene derivatives of amino acids and peptides // *Russian Chemical Bulletin.* Springer New York, 1996. Vol. 45, № 4. P. 834–837.
87. Timofeeva G.I. et al. A study of the behavior of disubstituted methyl esters of peptide derivatives of fullerene C₆₀ in aqueous solutions // *Russian Chemical Bulletin.* Springer US, 2012. Vol. 61, № 8. P. 1635–1637.
88. Timofeeva G.I., Romanova V.S. 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.* Springer US, 2007. Vol. 56, № 12. P. 2389–2393.
89. Timofeeva G.I., Kuleshova E.F., Romanova V.S. 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.* Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1997. Vol. 46, № 3. P. 472–475.
90. Charykov N.A. et al. Excess thermodynamic functions in aqueous systems containing soluble fullerene derivatives // *J Mol Liq.* 2018. Vol. 256. P. 305–311.
91. Serebryakov E.B. et al. Physico-chemical properties of the C₇₀-L-lysine aqueous solutions // *J Mol Liq.* 2018. Vol. 256. P. 507–518.

92. Meshcheriakov A.A. et al. Physicochemical properties, biological activity and biocompatibility of water-soluble C₆₀-Hyp adduct // *Colloids Surf B Biointerfaces*. Elsevier B.V., 2020. Vol. 196. P. 111338.
93. Sharoyko V. V. et al. Physicochemical investigation of water-soluble C₆₀(C₂NH₄O₂)₄H₄ (C₆₀-Gly) adduct // *J Mol Liq. Elsevier*, 2021. Vol. 344. P. 117658.
94. Semenov K.N. et al. Fullerenols: Physicochemical properties and applications // *Progress in Solid State Chemistry*. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 44, № 2. P. 59–74.
95. Semenov K.N. et al. Carboxylated fullerenes: Physico-chemical properties and potential applications // *Progress in Solid State Chemistry*. Pergamon, 2017. Vol. 47–48. P. 19–36.
96. Pochkaeva E.I. et al. Fullerene derivatives with amino acids, peptides and proteins: From synthesis to biomedical application // *Progress in Solid State Chemistry*. 2020. Vol. 57. P. 100255.
97. Nikolaev D.N. et al. Thermodynamic and quantum chemical investigation of the monocarboxylated fullerene C₆₀CHCOOH // *Journal of Chemical Thermodynamics*. 2020. Vol. 140.
98. Semenov K.N. et al. Fullerenol-d solubility in fullerenol-d–inorganic salt–water ternary systems at 25 °C // *Ind Eng Chem Res. American Chemical Society*, 2013. Vol. 52, № 46. P. 16095–16100.
99. Semenov K.N., Charykov N.A., Keskinov V.N. Fullerenol synthesis and identification. Properties of the fullerenol water solutions // *J Chem Eng Data. American Chemical Society*, 2011. Vol. 56, № 2. P. 230–239.
100. Semenov K.N. et al. Physico-chemical properties of the fullerenol-70 water solutions // *J Mol Liq. Elsevier*, 2015. Vol. 202. P. 1–8.
101. Semenov K.N. et al. Phase equilibria in fullerene-containing systems as a basis for development of manufacture and application processes for nanocarbon materials // *Russian Chemical Reviews. IOP Publishing*, 2016. Vol. 85, № 1. P. 38–59.

102. Semenov K.N. et al. Solid-liquid phase equilibria in the fullereneol-d-CuCl₂-H₂O system at 25 °C // Russian Journal of Physical Chemistry A. Maik Nauka-Interperiodica Publishing, 2014. Vol. 88, № 6. P. 1073–1075.
103. Semenov K.N. et al. Solubility and some properties of aqueous solutions of fullereneol-d and composition of crystal hydrates // Russian Journal of Applied Chemistry. SP MAIK Nauka/Interperiodica, 2011. Vol. 84, № 1. P. 44–49.
104. Семёнов К.Н. et al. Фуллеренол–70-d: синтез, идентификация, политермическая растворимость и плотность водных растворов // Наносистемы: физика, химия, математика. 2012. Vol. 3, № 6. P. 146–156.
105. Semenov K.N., Charykov N.A. Solubility Diagram of a Fullereneol-d-NaCl-H₂O System at 25°C // Russian Journal of Physical Chemistry A. Springer, 2012. Vol. 86, № 10. P. 1636–1638.
106. Сидоров Л.Н. et al. Фуллерены. Учебное пособие / ed. Яновский Д.В. Москва: Издательство “Экзамен,” 2005. 688 p.
107. Semenov K.N., Charykov N.A. Temperature dependence of solubility of individual light fullerenes and industrial fullerene mixture in 1-chloronaphthalene and 1-bromonaphthalene // J Chem Eng Data. American Chemical Society, 2010. Vol. 55, № 7. P. 2373–2378.
108. Семенов К.Н. et al. Растворимость, термический анализ и ассоциация бис-аддуктов легкого фуллерена C₆₀ и аминокислот: лизина, треонина и оксипролина в водных растворах // Журнал физической химии. Pleiades Publishing Ltd, 2019. Vol. 93, № 7. P. 1015–1022.
109. Strom T.A. et al. Fullerene-based inhibitors of HIV-1 protease // Journal of Peptide Science. 2015. Vol. 21, № 12. P. 862–870.
110. Рафальский В.В. Клиническая фармакология атазанавира // Фарматека. 2008. Vol. 4. P. 18–26.
111. Nakamura S., Mashino T. Biological activities of water-soluble fullerene derivatives // J Phys Conf Ser. IOP Publishing, 2009. Vol. 159, № 1. P. 012003.
112. Castro E. et al. Fullerenes in biology and medicine // J Mater Chem B. The Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 5, № 32. P. 6523–6535.

113. Slater T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. // *Biochem J.* Portland Press Ltd, 1984. Vol. 222, № 1. P. 1–15.
114. Orlova M.A. et al. Fullerene and apoptosis: Ingenta Connect // *Onlogematologia.* 2013. Vol. 8, № 1. P. 65-71(7).
115. Mroz P. et al. Photodynamic therapy with fullerenes // *Photochemical & Photobiological Sciences.* The Royal Society of Chemistry, 2007. Vol. 6, № 11. P. 1139.
116. Kotelnikova R.A. et al. Membrantropic properties of the water soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene C₆₀ // *FEBS Lett.* Wiley-Blackwell, 1996. Vol. 389, № 2. P. 111–114.
117. Kotel'nikova R.A. et al. Luminescent techniques in investigation of the biological properties of fullerene-based hybrid nanostructures // *High Energy Chemistry.* 2009. Vol. 43, № 7. P. 582–586.
118. Kumar A., Rao M. V., Menon S.K. Photoinduced DNA cleavage by fullerene–lysine conjugate // *Tetrahedron Lett.* 2009. Vol. 50, № 47. P. 6526–6530.
119. Yang L.-Y. et al. Characterization of fullerenol-protein interactions and an extended investigation on cytotoxicity // *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017. Vol. 157. P. 261–267.
120. Ji H., Sun H., Qu X. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent achievements and challenges // *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier B.V., 2016. Vol. 105. P. 176–189.
121. Mahmoudi T., Wang Y., Hahn Y.B. Graphene and its derivatives for solar cells application // *Nano Energy.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 47. P. 51–65.
122. Iurev G.O. et al. Thermodynamic and thermal properties of the C₆₀-L-Arg derivative // *J Chem Thermodyn.* 2018. Vol. 127. P. 39–44.
123. Pochkaeva E.I. et al. Polythermal density and viscosity, nanoparticle size distribution, binding with human serum albumin and radical scavenging activity of the C₆₀-L-arginine (C₆₀(C₆H₁₃N₄O₂)₈H₈) aqueous solutions // *J Mol Liq.* Elsevier B.V., 2020. Vol. 297. P. 111915.

124. Semenov K.N. et al. Thermodynamic Functions in the Binary System of a C₆₀ Fullerene Derivative with Methionine Amino Acid–H₂O // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2020. Vol. 94, № 4. P. 698–703.
125. Herrera I., Winnik M.A. Differential Binding Models for Isothermal Titration Calorimetry: Moving beyond the Wiseman Isotherm // J Phys Chem B. American Chemical Society, 2013. Vol. 117, № 29. P. 8659–8672.
126. Почкаева Е.И. et al. Изотермическое калориметрическое титрование человеческого сывороточного альбумина аддуктом C₆₀-L-аргинин // Журнал общей химии. 2019. Vol. 89, № 8. P. 1309–1312.
127. Awan F. et al. Enhanced radical scavenging activity of polyhydroxylated C₆₀ functionalized cellulose nanocrystals // Cellulose. Springer Netherlands, 2016. Vol. 23, № 6. P. 3589–3599.
128. Серебряков Е.Б. Физико-химическое изучение аддуктов фуллерена C₇₀ с L-лизинном и L-треонином. 2023.
129. Мещеряков А.А. Функционализация фуллерена C₆₀ для получения материалов биомедицинского назначения. 2023.
130. Alinkina E.S., Misharina T.A., Fatkullina D.L. Antiradical Properties of Oregano, Thyme, and Savory Essential Oils // Appl Biochem Microbiol. Akademiia nauk SSSR, 2013. Vol. 49, № 1. P. 82–87.