

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Рябухін Сергій Вікторович

Протокол №____ засідання кафедри

від «___»_____ 2022 р.

**ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНІ КАРБОНОВІ НАНОЧАСТИНКИ ДЛЯ
ЗАСТОСУВАНЬ В МАГНІТНО-РЕЗОНАНСНІЙ ТОМОГРАФІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента напряму підготовки
102 «Хімія»
ОП «Хімія (високі технології)»
Ортікової Олександрі Алішерівни

Науковий керівник від кафедри:
к.х.н., доцент кафедри супрамолекулярної
хімії навчально-наукового інституту високих
технологій
Гринь Світлана Валеріївна

Робота виконана на кафедрі аналітичної хімії хімічного факультету
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
під керівництвом к. х. н. **Алексєєва Сергія Олександровича**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Хелатні комплекси іонів Гадолінію широко використовуються, як контрастні агенти для магнітно-резонансної томографії і мають перспективу як радіосенсибілізаційні агенти у протираковій терапії. Введення гадолінієвих комплексів у склад наночастинок дає можливість значно підвищити їх ефективність. Робота присвячена синтезу та дослідженню наночастинок з ядрами фулерену C_{60} або флуороксиду карбону, що функціоналізовані комплексами гадолінію з хелатуючим лігандом ДОТА. Хімічну структуру частинок охарактеризовано методом ІЧ-спектроскопії. Методом динамічного світлорозсіювання показано, що ці частинки мають розміри близькі до 4 нм і утворюють стійкі водні золі. Такі частинки є перспективними для подальших досліджень у галузях МРТ-біовізуалізації та радіотерапії.

Ключові слова: біовізуалізація, нанотехнології, карбонові наночастинки, функціоналізація

Gadolinium chelates are widely used as contrast agents for magnetic resonance tomography and have potential application as radiosensitizing agents in cancer therapy. Introduction of gadolinium complexes to the nanoparticles' structure may dramatically increase their effectiveness. The work is dedicated to the synthesis and research of nanoparticles with fullerene C_{60} or carbon fluoroxide cores, which are functionalized with the gadolinium complexes with DOTA ligands. Chemical structure of the particles was characterized by IR spectroscopy. Dynamic light scattering method demonstrated, that the nanoparticles are close to 4 nm in size and are stable in colloids. Such nanoparticles are prospective for the further MRI-biovisualisation and radiotherapy research.

Keywords: biovisualisation, nanotechnology, carbon-based nanoparticles, functionalization

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	6
1.1 Фізичні підвалини застосування гадоліній-іонів в біодіагностиці.....	6
1.2 Застосування хелатних реагентів.....	8
1.2.1 Gd-DTPA	9
1.2.2 Gd-DOTA	10
1.2.3 Gd-DO3A	11
1.2.4 Na ₂ Gd ₂ (OHEC).....	12
1.3 Функціоналізовані наночастинки як контрастні реагенти	13
1.3.1 Вірусні наночастинки	14
1.3.2 Міцели та ліпосоми	15
1.3.3 Дендримери	15
1.3.4 Частинок на основі золота.....	16
1.3.5 Наночастинки на основі SiO ₂	17
1.3.6 Наночастинки на основі Карбону	20
1.4 Висновки до розділу.....	23
РОЗДІЛ 2. Обговорення результатів	25
2.1 Бромовання фулерену.....	25
2.2 Амінування наночастинок.....	26
2.3 Модифікація поверхні лігандами та Гадолінієм.....	29
2.2 Властивості наногібридів	33
РОЗДІЛ 3. Експериментальна частина.....	42
3.1 Матеріали та реагенти.....	42
3.2 Методи дослідження.....	42
3.2.1 Інфрачервоні спектри	42
3.2.2 Динамічне та електрофоретичне розсіювання світла.....	43
3.2.3 Спектроскопія поглинання в УФ та видимій області	44
3.3 Синтез наногібридів	44
3.3.1 Бромовання фулерену з подальшим амінуванням	44
3.3.2 Амінування фулеренів.....	44
3.3.3 Амінування карбон флуороксиду.....	45
3.4 Модифікація лігандом DOTA та Gd ³⁺	45
3.5 Приготування розчинів наночастинок	46
ВИСНОВКИ.....	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48

ВСТУП

Біовізуалізація – досить широкий термін, що включає в себе цілий ряд неінвазивних методів дослідження організму. Вони активно використовуються в сучасній діагностиці для виявлення захворювань та патологій. Але наразі актуальною є проблема покращення ефективності методу, так само неінвазивно.

Часто покращення ефективності біовізуалізації відбувається внаслідок введення в організм контрастних сполук. Розробка контрастів лишається актуальним завданням сучасної медичної хімії. Розвиток нанотехнології дозволив використовувати і наночастинки у біомедичній сфері, в тому числі для біовізуалізації та терапії захворювань. Створення наногібридів з наночастинок та контрастних реагентів дозволяє поєднати ці дві мети. Відповідно, розробка наноплатформ для контрастних реагентів є актуальною та перспективною задачею.

Карбонові наночастинки – це ціла низка сполук, які можна використати у біомедичній сфері. Деякі з них вже знайшли застосування у біовізуалізації завдяки своїм невеликим розмірам, можливості хімічної модифікації та біосумісності, а деякі з них активно застосовуються у фотодинамічній терапії. Ці властивості у поєднанні з широким вибором різних наноматеріалів з багатою хімічною природою дає в результаті галузь, що активно розвивається і має багато перспектив для подальшого прогресу. З цих матеріалів варто виділити фулерени, до переваг яких можна віднести монодисперсність та невеликі розміри – більше того, фулерени вже використовуються у терапії раку, та карбон флуороксид, який має багату хімію поверхні та будову з невеликими ароматичними доменами, що допускають схожість певних характеристик та застосувань з фулереном. Поєднання таких частинок з комплексами з Гадолінієм може давати одночасно контрастні та потенційно терапевтичні агенти.

Метою цієї роботи є перевірка перспективності використання модифікованих карбонових наночастинок як контрастних агентів для магнітно-резонансної томографії.

У роботі представлено наночастинки, що складаються із карбонових ядер із ковалентно-закріпленими на поверхні стійкими хелатними комплексами Гадолінію. Такі частинки перспективні для використання в якості контрастних агентів у магнітно-резонансній томографії. У роботі представлено методи одержання таких частинок та дослідження їх властивостей методами ІЧ спектроскопії, динамічного та електрофоретичного розсіювання світла, спектроскопії поглинання в УФ та видимій області.

Для цього було розроблено методики функціоналізації поверхні таких наночастинок за допомогою хелатних комплексів Гадолінію та досліджено їхні властивості методами ІЧ спектроскопії, динамічного та електрофоретичного розсіювання світла, спектроскопії поглинання в УФ та видимій області.

Особистий внесок здобувача полягає у пошуку та систематизації літературних даних для впровадження відповідних методик, експериментальній роботі, узагальненні й оформленні отриманих результатів. Постановка завдань дослідження та обговорення їх результатів були проведені разом з науковим керівником, к. х. н. Алексєєвим С. О.

Робота має 55 сторінок, 31 малюнок, 3 таблиці та 70 джерел і складається зі вступу, огляду літератури, обговорення експерименту, експериментальної частини, висновків та списку використаних джерел

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

1.1 Фізичні підвалини застосування гадоліній-іонів в біодіагностиці

Магнітно-резонансна томографія – потужний діагностичний метод в медицині, що ґрунтується на використанні ефекту ядерного магнітного резонансу для дослідження тканин організму. Його відкриття Пурселем et al [1] та Блохом et al [2] дало значний поштовх для розвитку аналітичної хімії та медичної діагностики.

Як відомо, парамагнітні речовини мають постійний магнітний момент. За відсутності постійного магнітного поля, ці магнітні моменти направлені хаотично, але за наявності такого поля вони розташовуються впорядковано. При цьому, у магнітному полі ядро атома починає прецесувати з певною частотою, відомою як частота Лармора. Згодом, атом повертається у свій початковий стан, і час, за який цей процес відбувається, називають часом релаксації. Найбільш важливими є T1 та T2 релаксації. T1 релаксація відбувається внаслідок втрати енергії у вигляді тепла. T2 релаксація, натомість, може відбуватись і без передачі енергії, завдяки розфазуванню спінів. Атоми Гідрогену, що входять у склад води у різних тканинах, мають різний час релаксації. Це пов'язано з міжмолекулярними взаємодіями в живих тканинах [3]. Саме ця відмінність дає можливість досліджувати організм за допомогою МРТ.

Зміна часу релаксації може змінити якість отриманого в результаті МРТ зображення. Інтенсивність сигналів для багатьох імпульсних послідовностей залежить від часів релаксації T1 та T2:

- спінове ехо: $I(SE) = M_0 \left(1 - e^{-(TE-TR)/T1}\right) e^{-TE/T2}$
- inversion-recovery: $I(IR) = M_0 \left(1 - (2 - e^{-(TE+TI-TR)/T1}) e^{-TI/T2}\right) e^{-TE/T2}$

Зменшення часу T1 в обох випадках призведе до збільшення інтенсивності сигналу [4]. Bloembergen et al було описано рівняння, яке пов'язує концентрацію парамагнітних агентів та час релаксації T1:

$$\Delta \frac{1}{T1} = \frac{12\pi^2 \gamma^2 g \mu^2 N}{5kT},$$

де μ – ефективний магнітний момент, ϵ – в'язкість розчинника, k – константа Больцмана, T – абсолютна температура, γ – гіромагнітне співвідношення, N – кількість іонів на одиницю об'єму [5, 6].

Відповідно, додавання парамагнітних речовин при проведенні МРТ призводить до збільшення інтенсивності сигналу завдяки зміні часу релаксації. Також, парамагнітні контрастні реагенти покращують співвідношення сигналів та шумів, зменшують час дослідження та можуть збільшувати діагностичну специфічність [7]. У випадках, коли час релаксації ядер у здорових тканинах та тканинах з патологією дуже близький, зміна часу релаксації дає можливість провести якісну діагностику [8].

Серед парамагнітних одиниць можна виділити:

- іони металів:
 - ряд перехідних металів: Ti^{3+} , V^{4+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}
 - ряд лантаноїдів: Pr^{3+} , Gd^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+}
 - ряд актиноїдів: Ra^{4+}
- стабільні вільні радикали нітроксидів:
 - пірролідинові похідні
 - піперидинові похідні
- молекулярний кисень (O_2) [4]

Одним з найпопулярніших з перелічених варіантів є іон Гадолінію. Він має 7 неспарених електронів, і, відповідно, один з найбільших магнітних моментів [4].

Табл. 1. Електронна будова деяких парамагнітних іонів.

Атом. №	Іон	Електронна конфігурація										Магнітний момент	
		3d					4f						
24	Cr^{3+}	↑	↑	↑									3.8
25	Mn^{2+}	↑	↑	↑	↑	↑							5.9
26	Fe^{3+}	↑	↑	↑	↑	↑							5.9

29	Cu^{2+}	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑								1.7 – 2.2
63	Eu^{3+}						↑↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	6.9
64	Gd^{3+}						↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	7.9
66	Dy^{3+}						↑↓	↑↓	↑	↑	↑	↑	↑	5.9

Завдяки цій особливості електронної будови, Гадоліній має дуже сильний ефект на час релаксації T1. Однак як вільний іон у водному середовищі Гадоліній сильно токсичний: у тестуванні на мишах LD50 складав 0.34 ммоль/кг [9]. До того ж, вільний іон Гадолінію у слабо-лужному середовищі осаджується у вигляді гідроксиду, тому довгий час не виводиться з організму [10].

Окрім ефектів, пов'язаних з біовізуалізацією, Гадоліній також демонструє ефективність у радіосенсибілізації – покращенню ефективності радіотерапії при лікуванні раку. При дії радіації на організм відбувається руйнування ракових клітин – але разом з тим, пошкоджуються і здорові клітини. Для запобігання побічних ефектів, використовують сполуки, які здатні накопичуватись у ракових тканинах та посилювати дію X- та гамма-променів на них. Їх використання часто базується на ефекті Оже – втраті атомом електронів при дії X-випромінювання. При іонізації, електрон покидає нижчу оболонку атома, а подальший процес релаксації змушує електрон з вищої оболонки перейти на місце, що звільнилось, випускаючи надлишкову енергію у вигляді фотона або іншого електрона. На цьому процес може продовжуватись, запускаючи каскад Оже. Таким чином можна зменшити інтенсивність іонізуючого випромінювання, оскільки ефект буде посилено радіосентизуючими сполуками. Кількість випущених електронів є більшою у атомів з більшою кількістю нуклонів, серед яких є і Гадоліній. [11]

1.2 Застосування хелатних реагентів

Альтернативою токсичним іонам стало використання парамагнітних комплексів Gd^{3+} . В якості лігандів використовувались в тому числі полідентантні багатоосновні кислоти.

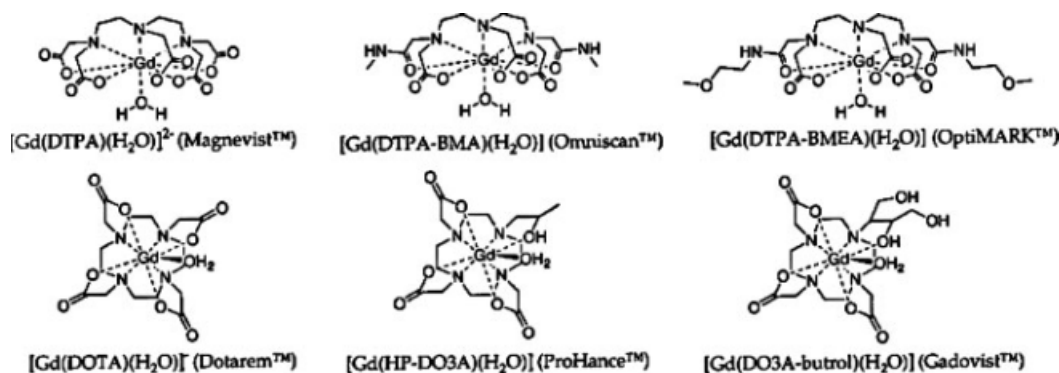


Рис.1. Деякі комерційно доступні контрастні агенти на основі хелатів Гадолінію [12]

1.2.1 Gd-DTPA

Gadopentetate dimeglumine (Gd-DTPA) – контрастний агент, що використовується у магнітно-резонансній томографії. Ліганд є ациклічною, іонною сполукою. Також у дослідженнях печінки використовується дивалентна гадоксетова кислота.

Токсичність цього агенту більш ніж в 10 разів нижча за токсичність гадолінієвого іону та ліганду окремо: LD50 складає 8 ммоль/кг [13]. При цьому у хелата зберігались властивості, необхідні для контрасту МРТ. Його використання було схвалено у Німеччині та США у 1988.

Серед неіонних агентів-похідних DTPA можна виділити діаміди: гадодіамід (Gd-DTPA-BMA) та гадоверсетамід (Gd-DTPA-BMEA).

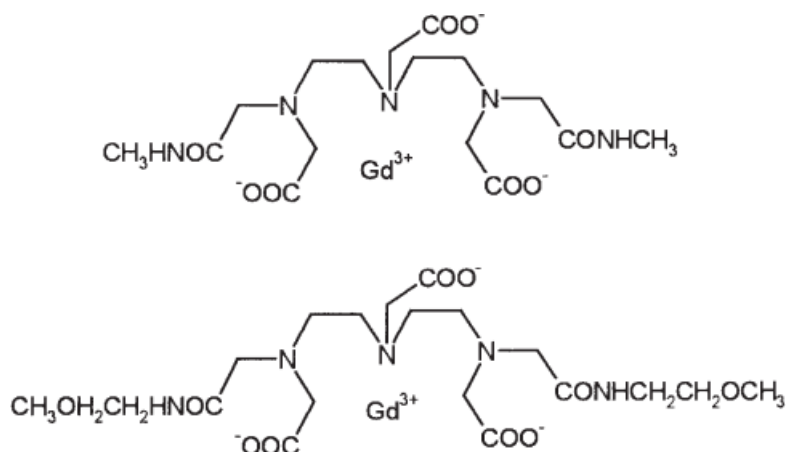


Рис. 2. Гадодіамід та гадоверсетамід [13]

Розробка неіонних агентів була виправдана зменшенням осмотичного тиску водних розчинів, порівняно з іонними сполуками, хоч і у низьких концентраціях (які найчастіше використовуються в МРТ) зміна осмотичного тиску є незначною. Обидва ліганди синтезуються з ДТРА та відповідних амінів [14].

1.2.2 Gd-DOTA

Другий клас контрастних агентів для МРТ є похідним макроциклічного тетрааміну 1.4.7.10-тетраазациклододекану (циклену). Гадотерат (Gd-DOTA) став першим макроциклічним контрастним агентом на ринку. Вперше синтезований у 1976 [15], він мав високу стабільність та низьку токсичність навіть порівняно з найпопулярнішим до цього ДРТА [16, 9]. LD50 при внутрішньовенному введенні складає 18 ммоль/кг. Фармакологічна поведінка та клінічне використання гадотерату є аналогічними до ациклічних агентів

1.2.3 Gd-DO3A

По аналогії з розробкою неіонних нециклічних агентів, було знайдено спосіб синтезувати і нейтральні макроциклічні хелати Гадолінію: DO3A (1,4,7-трикарбоксиметил-1,4,7,10-тетразакоклододекан) та його похідні [17, 18].

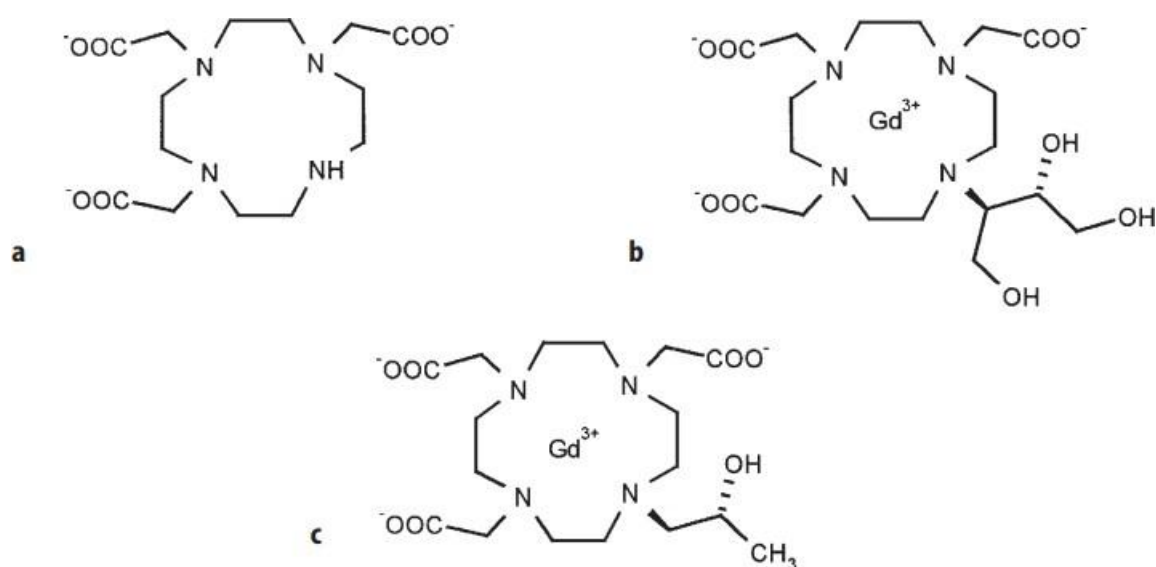


Рис. 3. а) DO3A б) гадобутрол с) гадотерідол [13]

На жаль, молекула DO3A не стала використовуватись *in vivo* через можливість альтернативної координації з бідентантними аніонами в організмі, тож з'явилися сумніви у ефективності та безпечності застосування [19]

Гадобутрол є нейтральною та досить стабільною сполукою, хоча й термодинамічна константа стійкості ($\log K(\text{therm}) = 21,8$ в 0.1 М КСl [20]) приблизно на два порядки менша за Gd-DTPA та Gd-DOTA. Це можна пояснити тим фактом, що іон Гадолінію (III) є сильною кислотою Льюїса, що сильніше зв'язується з негативно зарядженими сполуками, ніж з нейтральними.

LD50 галотерідолу після внутрішньовенного введення складає <15 ммоль/кг, гадобутролу – 25 ммоль/кг [13].

Обидва реагенти використовуються у швидких динамічних аналізах, таких як brain perfusion (?) та швидка магнітно-резонансна ангіографія.

1.2.4 $\text{Na}_2\text{Gd}_2(\text{OHEC})$

У розробці нових контрастних агентів одним із завдань є зв'язати ліганд з більш ніж одним іоном Гадолінію. Щоб досягти цього, було синтезовано ліганд 1,4,7,10,14,17,20,23-октаазациклогексакозан-1,4,7,10,14,17,20,23-октаоцтова кислота (" H_8OHEC ") [21].

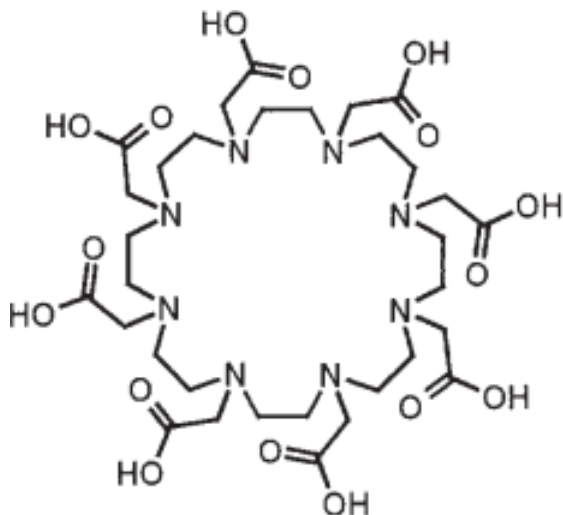


Рис. 4. H_8OHEC [13]

В макроциклі вміщається вже два іони Гадолінію, що підтверджують експериментальні дані

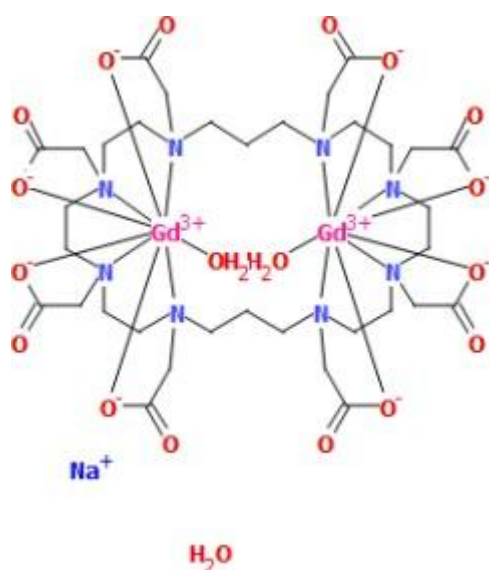


Рис. 5. Просторова структура $\text{Na}_2\text{Gd}_2(\text{OHEC})$ [22]

1.3 Функціоналізовані наночастинки як контрастні реагенти

Використання нанотехнологій у розробці контрастних реагентів має ряд переваг. Так, наноплатформа може впливати на іонну релаксацію таким чином:

- наночастинка може мати відносно велику кількість іонів у малому об'ємі
- наночастинка може бути спроектована з специфічними для тканини властивостями
- кон'югація хелатованого іону Гадолінію з наночастинкою зменшує частоти коливання іонів, що призводить до підвищеної іонної релаксації (reduces the molecular tumbling rates of Gd ions leading to increased ionic relaxivity (r_1)) [23, 24]

Всі ці фактори можуть значно покращувати якість отриманого МРТ-знімку, тож використання наночастинок є актуальним завданням при розробці контрастних агентів.

До характеристик, що визначають можливість використання наноплатформи у біомедичній сфері можна віднести розмір, можливість

визначення складу кінцевої структури та функціоналізації відповідними хелатами і водорозчинність.

Найбільш оптимальним способом функціоналізації було обрано модифікацію поверхні аміновмісними групами та подальша реакція з DOTAGA ангідридом (GA = glutaric acid).

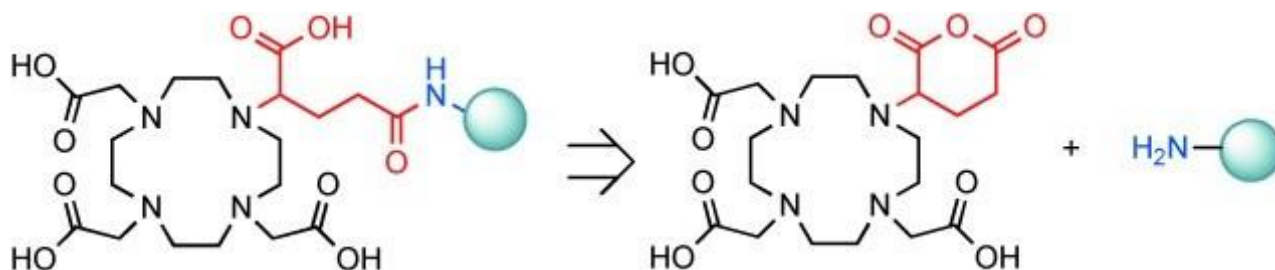


Рис.6. Ретросинтетична схема перетворення з DOTAGA ангідридом [25]

1.3.1 Вірусні наночастинки

Віруси можна назвати «природними наночастинками». Їхня високо монодисперсна структура має багато ідентичних протеїнових одиниць, організованих у стабільні структури, які енкапсулюють їхній геномний матеріал [26]. Наразі низка вірусних наночастинок вивчається для їх подальшого біомедичного застосування [27].

Функціоналізація таких протеїнових наночастинок легко досягається реакціями біокон'югації, в результаті яких відбувається взаємодія між активними групами амінокислот (аміногрупа лізину, тільна група цистеїну, карбоксигрупа глутаматної та аспартатної кислот, фенольна група тирозину) [28]. Оскільки такі частинки мають біологічне походження, їхні властивості можна модифікувати за допомогою генної інженерії [29].

Вірусні наночастинки, які можна було функціоналізувати іонами Гадолінію, було синтезовано на основі cowpea chlorotic mottle virus розміром 28 нанометрів у 2005 році [30]. Структура включала в себе пептиди, здатні до

зв'язування з іонами металів. Через небезпеку вивільнення іону Гадолінію структура так і не була застосована *in vivo*, тож до вірусних наночастинок було ковалентно приєднано ліганд DOTA [31].

1.3.2 Міцели та ліпосоми

Наноемульсії, такі як ліпосоми та міцели, є одними з найбільш досліджуваних наноплатформ для розробки контрастів для МРТ. Простота в виготовленні, можливість масштабування, переважне використання поширених і недорогих агентів та можливість контролю розміру частково пояснюють таку популярність.

Наноемульсії формуються з невеликих молекул з гідрофобним хвостом. Розмір, морфологія та поверхневі властивості наноемульсій контролюються складом гідрофобного хвоста, розміром та зарядом гідрофільної частини та умовами утворення, такими як концентрація, рН та температура [32].

Наноемульсії модифікуються за такими протоколами:

- включення молекул в наноемульсії на етапі утворення
- асоціати між гідрофільними/гідрофобними молекулами та гідрофобними частинами
- енкапсуляція в водному шарі ліпосом та спеціальних амфифільних молекул

Наноемульсії для використання в магнітно-резонансній томографії в основному формуються з амфифільних хелатних агентів для іонів Гадолінію. Було синтезовано та досліджено ряд наноемульсій з похідних ДТРА [33 - 36], а згодом з'явилися і похідні з іншими комплексами [37].

1.3.3 Дендримери

Дендримери – це монодисперсні розгалужені наночастинки, які активно використовуються в біомедичних дослідженнях [38].

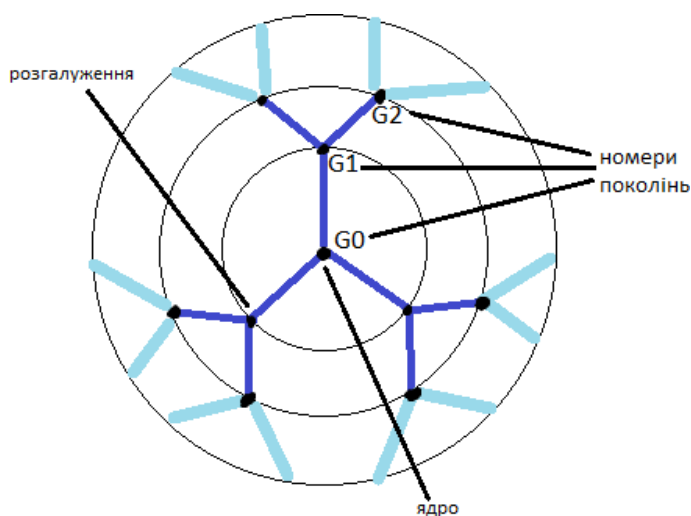


Рис. 7. Структура дендримеру

Найпопулярніші родини дендримерів включають поліамідоаміни, поліпропіленіміни та полілізини. Ці дендримерні структури мають аміногрупи, які можуть модифікуватись відповідними сполуками. Комплексні сполуки ковалентно зв'язуються з дендримерами амідним зв'язком [39].

Дендримерні структури характеризуються кількістю розгалужень, які називають «поколіннями», кількість функціональних груп зростає з кожним поколінням. Кожне додаткове покоління зазвичай збільшує діаметр частинки на 1 нм [40]. Існує занепокоєння щодо біосумісності та токсичності дендримерів, що містять аміногрупи: велика кількість позитивно заряджених груп збільшує цитотоксичність таких сполук [41].

1.3.4 Частинки на основі золота

Золоті наночастинки мають велику популярність у нанотехнологіях, але їх застосування у біомедичній сфері має певні проблеми: дослідження продемонстрували, що такі наночастинки повільно виводяться з організму, що збільшує токсичні ефекти. Але дослідження продовжуються: способи синтезу

частинок добре вивчені та вони є гарними кандидатами для використання у комп'ютерній томографії через високу електронну густину [42].

Перші наночастинки золота, функціоналізовані комплексами з гадолінієм, були синтезовані за допомогою дитіольного похідного ДТРА [43]. Дослідження показали, що при збільшенні наночастинки золота посилюються і релаксаційні ефекти [44]. Окрім цього, золоті наночастинки також мають перспективне застосування у радіосенсибілізації, оскільки золото – це метал з високим нуклонним числом. Тобто такі частинки можуть мати не тільки діагностичні, але й терапевтичні застосування [45].

1.3.5 Наночастинки на основі SiO_2

Матеріали на основі оксиду Кремнію використовуються в біомедичній галузі завдяки легкому виробництву та функціоналізації, значній площі поверхні та біосумісності. Вони виробляються у різних розмірах (від мікрона до 20 нанометрів) та формах (сфери та стержні). Хоч переважно наночастинки SiO_2 вважаються біосумісними, їхня поведінка *in vivo* залежить від розміру, пористості, форми та поверхневого заряду [46]. Можливість хімічної модифікації дозволяє розширити спектр застосувань таких наночастинок, в тому числі для магнітно-резонансної томографії.

Одним з найбільш успішних прикладів наночастинок на основі SiO_2 , модифікованих іонами Гадолінію, є AGuIX®. Ці наночастинки використовуються як у дослідженнях, так і у терапії (завдяки ефекту радіосенсибілізації [47]), та вже проходять першу фазу досліджень на людях [48].

Частинки AGuIX® складаються з ядра з оксиду Гадолінію у оболонці полісилоксану. Поверхня цієї оболонки має аміногрупи, інтегровані за допомогою амінопропіл триетоксісилану (APTES), які можуть ковалентно зв'язуватись з лігандом DOTA. При перенесенні у водні середовища, ядро наночастинок розчиняється та відбувається фрагментація на менші частинки.

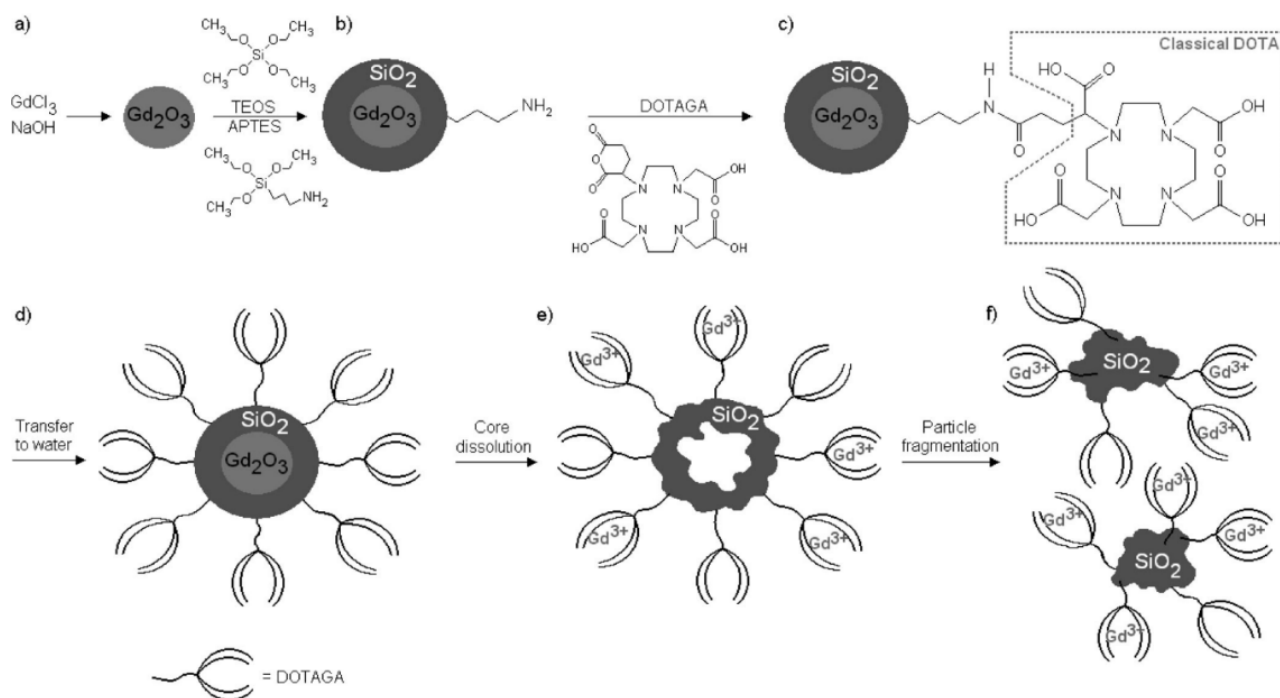


Рис. 8. Схема синтезу AGuIX® [49]

В результаті було отримано частинки розміром до 10 нм, які мають необхідні властивості для застосування в діагностиці. Для доведення структури та запропонованої схеми використовували вимірювання гідродинамічного діаметру методом динамічного розсіювання світла та трансмісійну електронну мікроскопію, які показали зростання розмірів частинок на перших стадіях та їх зменшення при фрагментації частинок. Також, для визначення колоїдної стабільності при різних рН використовували вимірювання дзета-потенціалу, які довели наявність електростатичного відштовхування між частинками, що мають негативний потенціал (-17 mV при рН 7.4). Трансмісійна електронна мікроскопія високої роздільної здатності показала, що у кінцевому продукті відсутні кристалічні ділянки оксиду Гадолінію, не зважаючи на високий вміст Гадолінію в зразку, що було підтверджено енергетично дисперсною рентгенівською спектроскопією. Це свідчить про повне його розчинення та фрагментацію отриманих частинок.

Для підтвердження структури частинок використали також скануючу трансмісійну електронну мікроскопію, комбіновану з спектроскопією втрати

енергії електронами. Такий метод відомий своєю чутливістю до складу. Цей метод показав наявність Гадолінію та Кремнію у кінцевому продукті.

Для визначення хімічного складу наночастинок використовували метод мас-спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою.

Табл. 2. Результати ICP-MS для кінцевих частинок [49]

	Gd	Si	N	C
кількість речовини (моль)	1.0	3.8	8.0	36.6
маса речовини (грам)	1.0	0.68	0.71	2.79

Також було записано мас- та ЯМР-спектри (^{29}Si та ^1H). Додатково було проведено експеримент 2D DOSY – дифузійної двовимірної спектроскопії для визначення зв'язаності окремих груп між собою.

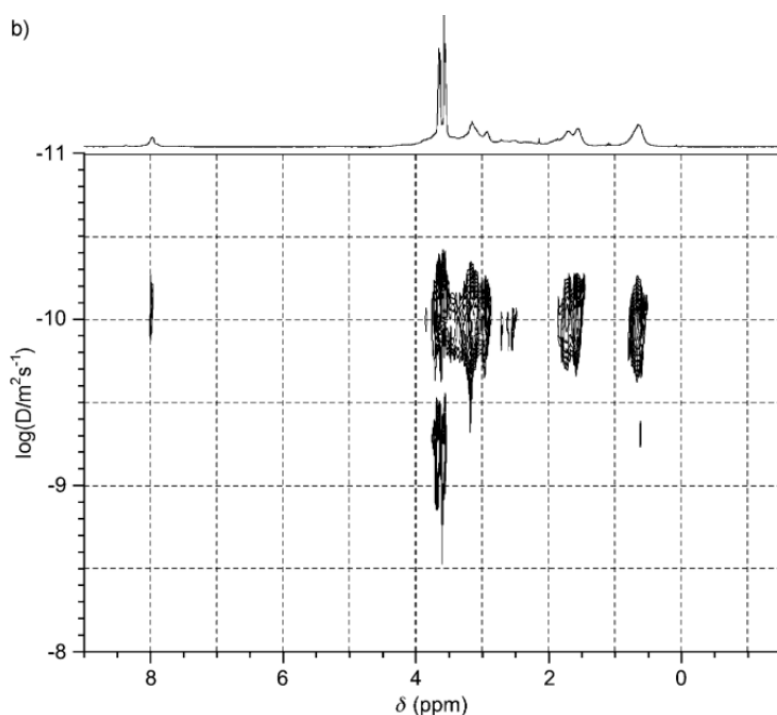


Рис. 9. 2D DOSY спектр AGuIX® [49]

Для визначення ефективності приєднання комплексу було проведено потенціометричне титрування кислотних залишків DOTA.

Окрім цього, повідомлялось про модифікацію методу для одночасного використання у магнітно-резонансній томографії та позитрон-емісійній томографії з введенням хелатів ізотопів Галію [50].

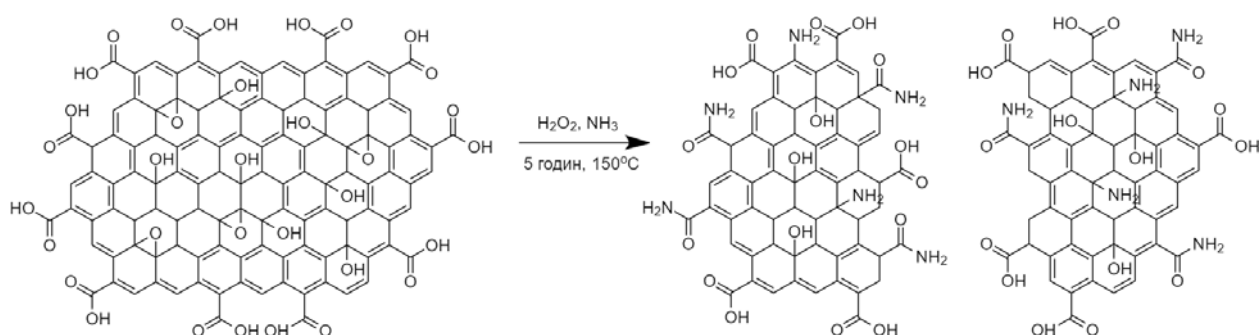
1.3.6 Наночастинки на основі Карбону

Вуглецеві наночастинки мають ряд переваг, які підтримують інтерес до них, в тому числі в біомедичній сфері. Серед них можна виділити механічні властивості, значну площі поверхні та добре досліджені методи функціоналізації. Наночастинки на основі Карбону можуть мати розміри від 1 нм; так, Ван-дер-Ваальсів діаметр фулерену C_{60} становить 1.1 нм.

Окрім перелічених переваг, наночастинки на основі Карбону, на відміну від більш популярних частинок на основі оксиду Кремнію, можуть поглинати світло та проявляти люмінесценцію, що може покращити ефективність при застосуванні для радіосенсибілізації.

Хітозан – полісахарид, що складається з D-глюкозоаміну та N-ацетил-D-глюкозоаміну. Його отримують деацетилюванням хітину при обробці лугом (наприклад NaOH) хітинових панцирів ракоподібних. Хітозан знайшов значну кількість біомедичних застосувань, серед них: заживляючі матеріали, доставлення лікарських засобів тощо. Така кількість використань визначається його вартістю, біосумісністю, можливістю біорозкладу та цілим рядом варіантів функціоналізації. При всіх перевагах цього полісахариду, значна кількість властивостей – такі як розчинність у нейтральних водних середовищах та токсичність – залежать в тому числі від молекулярної маси ланцюга. Чим більша молекулярна маса полімерного ланцюга, тим менша його розчинність у воді в нейтральному середовищі [51]. Визначення молекулярної маси відбувається завдяки вискоэффективній рідинній хроматографії [52] або вимірюванням в'язкості розчину [53]. До інших факторів, що впливають на розчинність, можна віднести також ступінь деацетилювання [54].

Невеликі ланцюги – олігосахариди або олігомери – відповідно, мають вищу розчинність. Найчастіше зустрічаються такі методи деполімеризації хітозанових ланцюгів: гідроліз у кислому середовищі, окислення, мікрохвильове та гамма випромінювання і ензиматичні методи [55]. Отримані олігосахариди хітозану мають цитотоксичні властивості, що також може стати в нагоді для терапії онкології [56]. Олігосахариди хітозану також можуть використовуватись для продукування наночастинок. Методи синтезу наночастинок на основі хітозану також були багатократно описані [57]. Наявність аміногруп в складі хітозану дає можливість функціоналізувати наночастинок необхідними лігандами. Чітко визначений хімічний склад, можливість контролювати та визначати розмір та



хімічна природа хітозанових наночастинок роблять їх цікавою платформою для контрастних агентів, що вже були описані [58].

Двовимірні вуглецеві наноматеріали, такі як графен та графен-оксид (ГО), мають ряд унікальних механічних, оптичних, термічних та електронних властивостей. Зокрема, низька токсичність, розчинність у водному середовищі та наявність хімічно активних епоксидних груп на планарних поверхнях робить матеріали на основі оксиду графену перспективними для біомедичних застосувань. Однак, великі латеральні розміри є перешкодою для його введення в кровеносну систему або живі клітини. Тому актуальною є проблема одержання невеликих (до 10 нм) графен-оксидних наночастинок із заданими термінальними функціональними групами. Одне з можливих рішень – окиснення ГО перекисом водню у водно-амоніачному розчині при гідротермальній обробці [59]

Рис. 10. Схема перетворення

Для таких сполук можлива подальша функціоналізація відповідними лігандами та іонами Гадолінію. Відповідні наночастинки були раніше описані в літературі [60].

Флуорооксид карбону має схожу будову з оксидом графену, але має при цьому ряд відмінних властивостей. Синтез карбонфлуороксидних наночастинок відбувається внаслідок електрохімічного протравлювання карбїду кремнію сумішшю HF та етанолу. Такі наночастинки мають необхідні розмір (до 10 нм), оптичні властивості (люмінесценція при 500-550 нм при збудженні УФ-випромінюванням), визначену структуру та хімічну природу [61]. Активні групи на поверхні також демонструють можливість хімічної модифікації необхідними амінами.

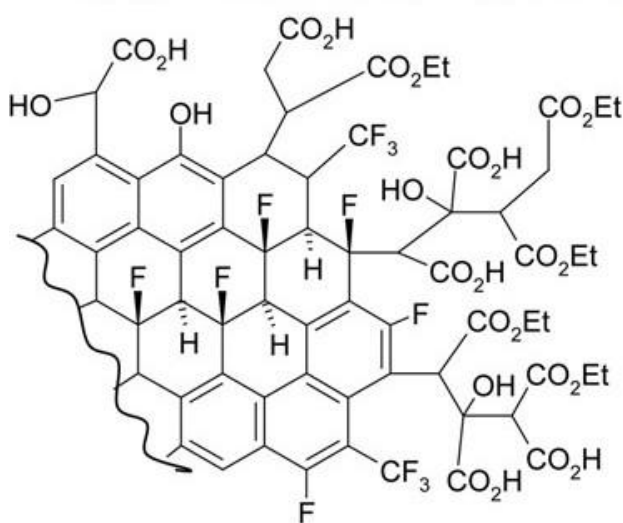


Рис. 11. Приблизна структура частинок на основі флуорооксиду карбону [61]

Схожі механічні та оптичні властивості демонструють і фулерени. Для біологічної візуалізації досліджувались фулеренові наночастинки, в яких іон Гадолінію був ядром. Серед таких сполук можна виділити гадофулерени, всередині яких могли знаходитись від одного до трьох іонів [62]. Однак

враховуючи потенційні ефекти для здоров'я та погану розчинність у водних середовищах, такі сполуки не використовуються в біомедичній сфері. Натомість, можлива модифікація карбонових наночастинок лігандами, описаними раніше, та іонами Гадолінію завдяки попередній функціоналізації полярними групами. Така функціоналізація дозволяє отримати водорозчинні похідні фулерену з низькою токсичністю, які вже застосовуються в біомедичній галузі [63]. Були описані фулерени, функціоналізовані амінами, які можна використати для цих цілей [64].

1.4 Висновки до розділу

Сполуки Гадолінію є найбільш популярним контрастним агентом для МРТ і довели свою ефективність. Враховуючи токсичність та гідролітичну нестійкість аквакатіонів Gd^{3+} , у біомедичній сфері найчастіше використовуються його стійкі хелатні комплекси.

У теперішній час активно розробляються методи покращення ефективності гадолінієвих контрастних реагентів, зокрема активно досліджуються функціоналізовані хелатами Гадолінію наночастинок різної природи. Порівняно з низькомолекулярними хелатами, використання наночастинок, як МРТ-контрастів має ряд суттєвих переваг. Зокрема, вони мають більшу кількість іонів в одиниці об'єму, що покращує контраст знімку МРТ та підвищує їх ефективність в радіосенсибілізації.

Для застосування в контрастних та терапевтичних цілях, наночастинок мають мати:

- невеликі розміри (до 10 нм) – можливість проходити гематоенцефалітичний бар'єр [65]
- структуру, яку можливо визначити та охарактеризувати
- розчинність у воді

- хелати з іонами Гадолінію на поверхні – для уникнення ризиків для організму, Гадоліній має бути в зв'язаному вигляді. Враховуючи обраний метод функціоналізації, варто розглядати наявність/можливість приєднання аміногруп на поверхню.

Ці властивості притаманні наночастинкам AGuIX®, однак їхній складний багатоступінчатий синтез є серйозною перешкодою при застосуванні. Більше того, проведення гідролізу на останній стадії може свідчити про аналогічні, можливо непередбачувані перетворення в людському організмі. Карбонові наночастинки – фулерен, карбон флуороксид тощо – мають більш практичні варіанти функціоналізації та не руйнуються у водних середовищах.

Тому **метою даної роботи** є створення перспективних МРТ-контрастів - наночастинок, що складаються із карбонових ядер із ковалентно-закріпленими на поверхні стійкими хелатними комплексами Гадолінію. Як карбонові ядра було обрано фулерен C₆₀ та флуорооксид карбону.

Для досягнення поставленої мети потрібно було вирішити ряд задач:

- синтезувати карбонові наночастинки, функціоналізовані аміногрупами
- розробити методику функціоналізації наночастинок хелатуючим лігандом ДОТА
- одержати гадолінієві комплекси наночастинок
- охарактеризувати спектральні та колоїдно-хімічні властивості одержаних речовин

РОЗДІЛ 2. Обговорення результатів

2.1 Бромовання фулерену

Після реакції з бромом чорний порошок C_{60} змінив свій колір на коричневий. ІЧ-спектр на рисунку 12 ілюструє перетворення в результаті проведеної реакції.

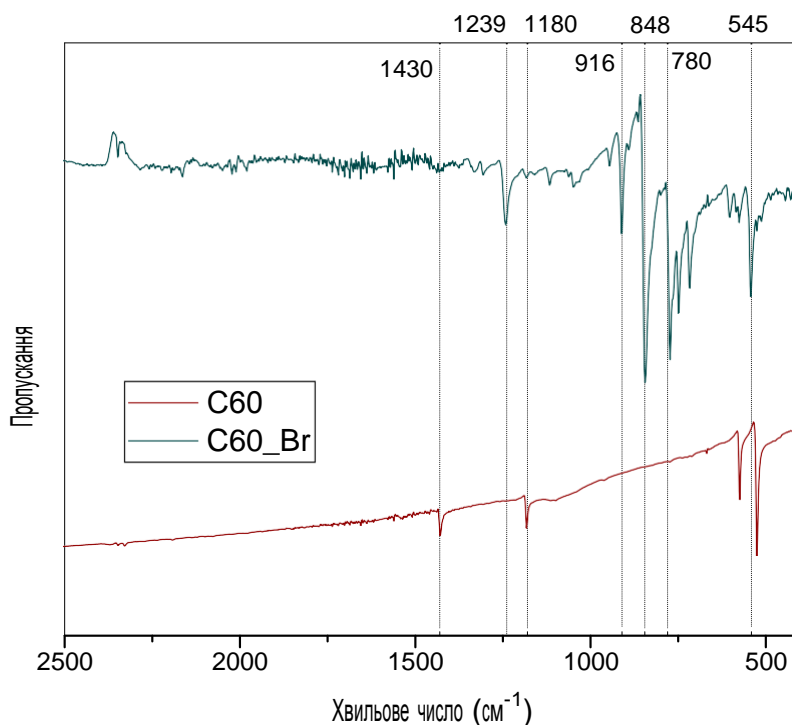


Рис. 12. ІЧ спектр фулерену та бромованого похідного

Молекула фулерену має дуже високу симетрію. Незважаючи на 174 ступені свободи, ікосаедральна симетрична структура сполуки є причиною відносно невеликої кількості смуг поглинання в ІЧ спектрі. Характеристичні смуги фулерену: 1430, 1180 (первинні тангенціальні коливання зв'язків С-С), 576, 527 см⁻¹ (радіальні коливання зв'язків С-С). Найбільш характерним є pentagonal 'pinch' mode при 1430 см⁻¹ [66].

Спектр продукту бромовання відповідає аналогічному, представленому в літературі [67], наявні характеристичні смуги: 1239 (С-С зв'язки), 916, 848 (С-С та ССВг коливання), 780 (ССС коливання), 545 (ССС та ССВг коливання) см⁻¹

тощо [68]. При цьому, в спектрі відсутні характеристичні коливання фулерену C_{60} , що може свідчити про взаємодію безпосередньо між фулереном та бромом. Отже, можна стверджувати, що в результаті утворюється бромпохідне $C_{60}Br_x$. Можлива кількість броду у отриманій сполуці може варіюватись: було повідомлено про структури з високою симетрією з формулами: $C_{60}Br_6$, $C_{60}Br_8$, $C_{60}Br_{14}$ та $C_{60}Br_{24}$ [69]. За описаних умов найбільш ймовірним є утворення $C_{60}Br_{14}$ або $C_{60}Br_{24}$.

2.2 Амінування наночастинок

У результаті взаємодії фулерену, бромованого фулерену та карбон флуороксиду з етилендіаміном утворились сполуки, ІЧ спектри яких наведено на рисунках 13, 14, 15.

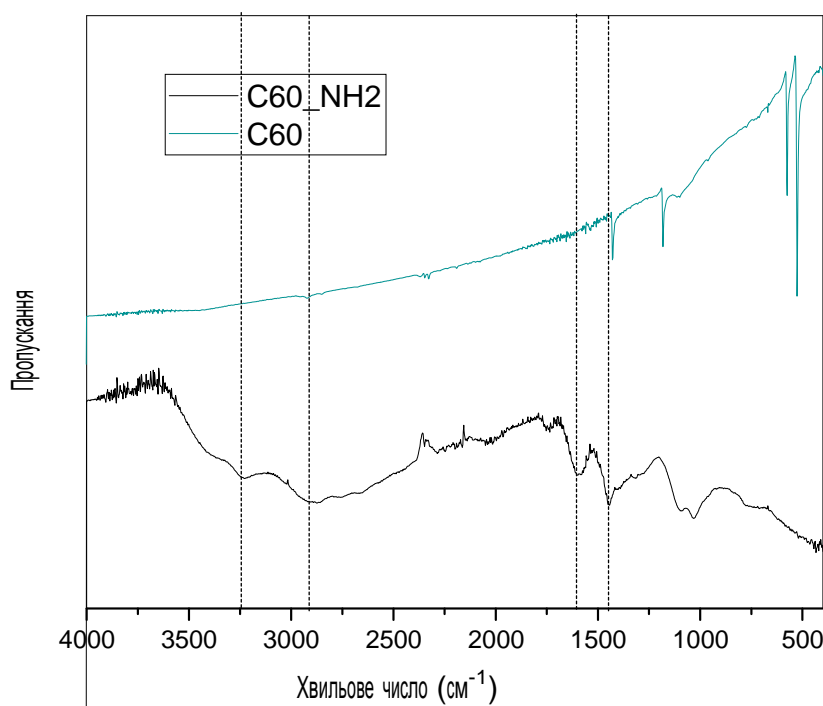


Рис. 13. ІЧ спектр фулерену та амінованого зразка

Відсутність характеристичних смуг фулерену (рис. 13) в амінованому зразку вказує на руйнування конденсованої структури фулерену для утворення

похідного, аналогічно до бромовання. При аналізі спектрів амінованих зразків, було помічено утворення нових смуг: наприклад, низка смуг при 1500 cm^{-1} (відповідають валентним коливанням C-N зв'язків). Оскільки при виділенні зразків амінофулеренів використовувалась соляна кислота, помітні широкі смуги при $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$, що відповідають валентним коливанням -NH_3^+ та -CNH_2^+ демонструють наявність протонованих аміногруп на поверхні фулерену. Деформаційні коливання відповідних груп знаходяться в області $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ [70].

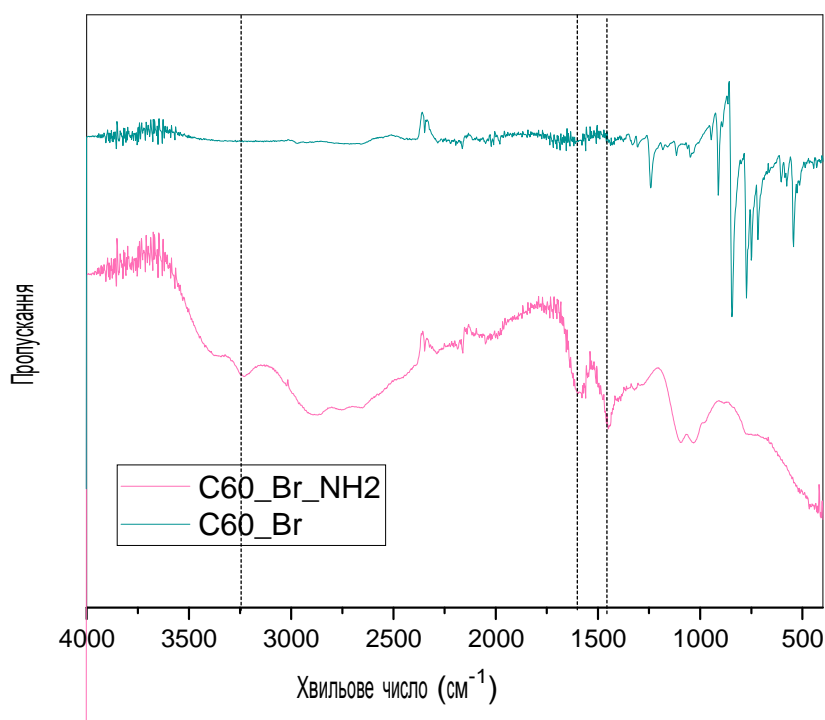


Рис. 14. ІЧ спектр бромфулерену та амінованого зразка

Для бромфулерену важливою є відсутність характеристичних піків бромованого зразка. Це свідчить про повне заміщення броду в ядрі фулерену на етилендіамін. Крім того, варто відмітити значну подібність ІЧ спектрів амінофулеренів, отриманих амінуванням та бромованням. Можливі відмінності можуть полягати хіба що у симетричності структур та брутто-формулах.

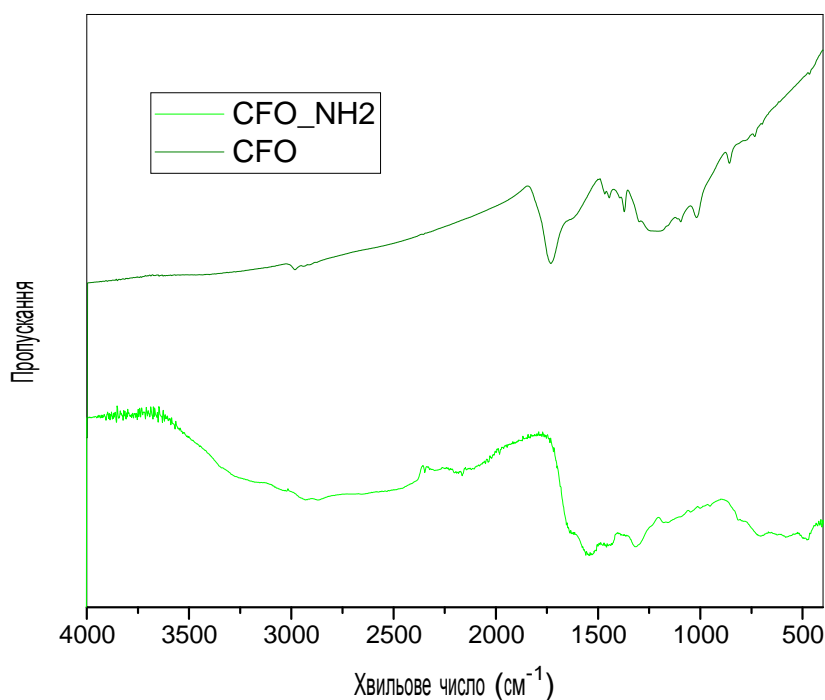


Рис. 15. ІЧ спектр карбон флуороксиду та амінованого зразка

Для карбон флуороксиду смуга поглинання карбонільного зв'язку при 1730 см^{-1} зникла, натомість у спектрі амінованого зразка можна помітити наявність смуг амідних зв'язків при $1400\text{-}1600\text{ см}^{-1}$ та валентні коливання N-H зв'язків при 3000 см^{-1} . Це свідчить про успішну функціоналізацію поверхні карбон флуороксиду аміногрупами.

Отримані дані дають підстави стверджувати, що модифікація поверхні наночастинок відбувається за такими схемами:

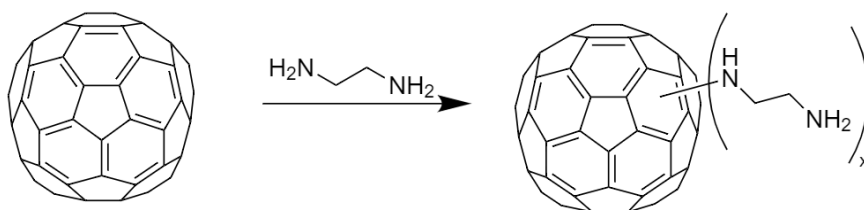


Рис.16. Модифікація фулерену [63]

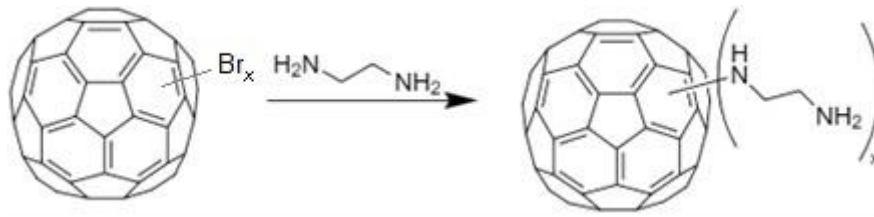


Рис. 17. Модифікація бромфулерену

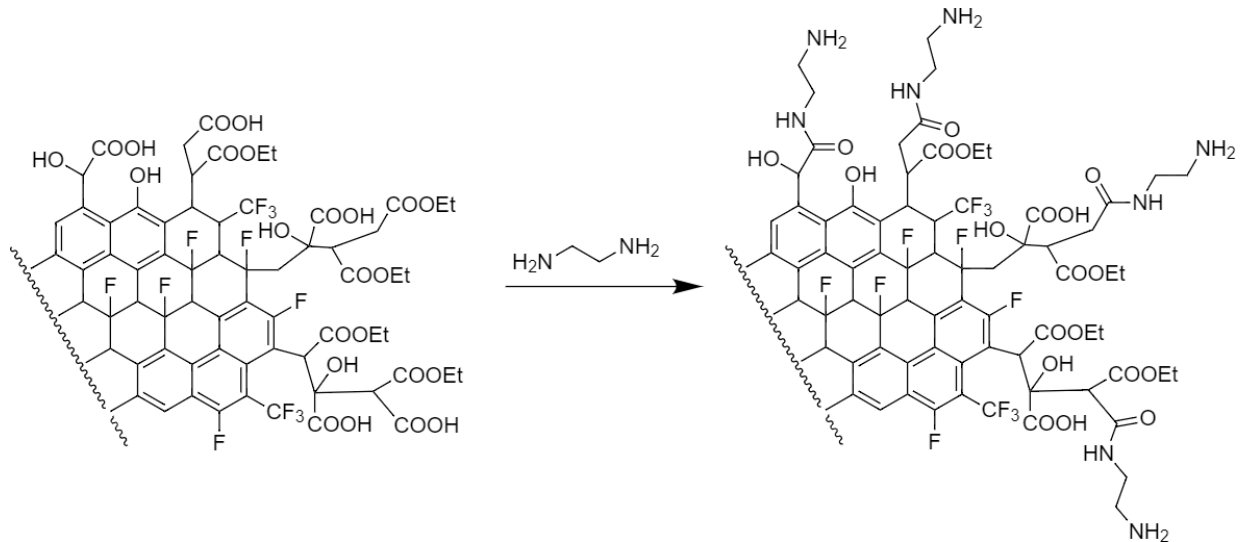


Рис 18. Модифікація карбон флуорокису

2.3 Модифікація поверхні лігандами та Гадолінієм

Для аналізу отриманих структур було записано ІЧ спектр ліганду DOTA-GA. При тривалому зберіганні на повітрі активний ангідрид ліганду DOTA-GA може частково гідролізувати та гідратуватись, що може погіршувати результат реакції з амінованими субстратами. Про це свідчить уширення смуг поглинання в інфрачервоному спектрі (рис. 15) Відповідно, рекомендовано зберігання за низьких температур та з мінімальним доступом до повітря.

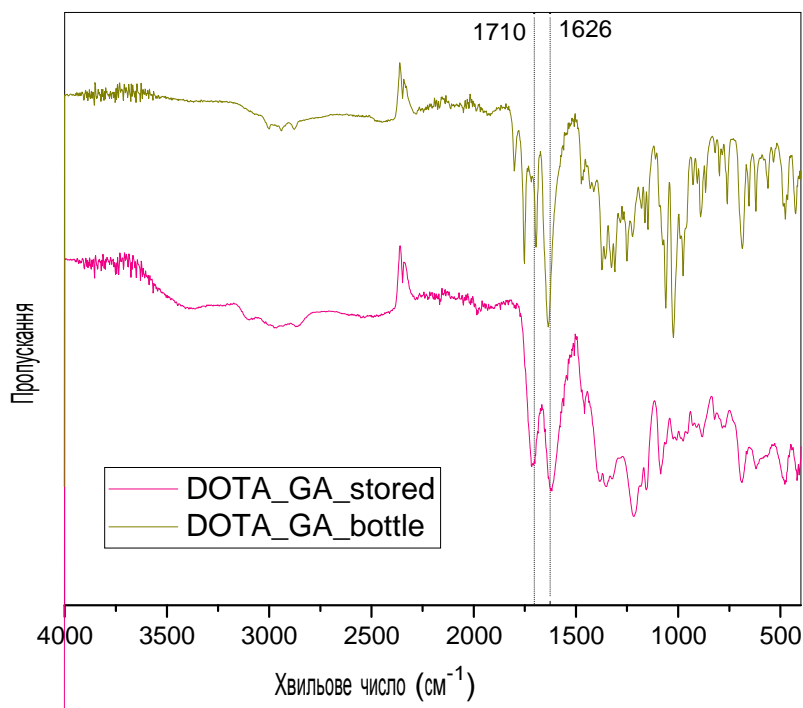


Рис 19. ІЧ спектри DOTA-GA

Смуга при 1712 cm^{-1} відповідає валентному коливанню $\text{C}=\text{O}$ зв'язку карбоксильної групи, відповідно, смуга при 1677 cm^{-1} відповідає валентному коливанню $\text{C}=\text{O}$ зв'язку ангідриду. Смуга при 1626 cm^{-1} відповідає деформаційним коливанням $\text{N}-\text{H}$ зв'язків.

Подальша модифікація полягає у приєднанні DOTA-GA при утворенні амідного зв'язку та приєднанні Gd^{3+} за схемою, описаною в літературі [25].

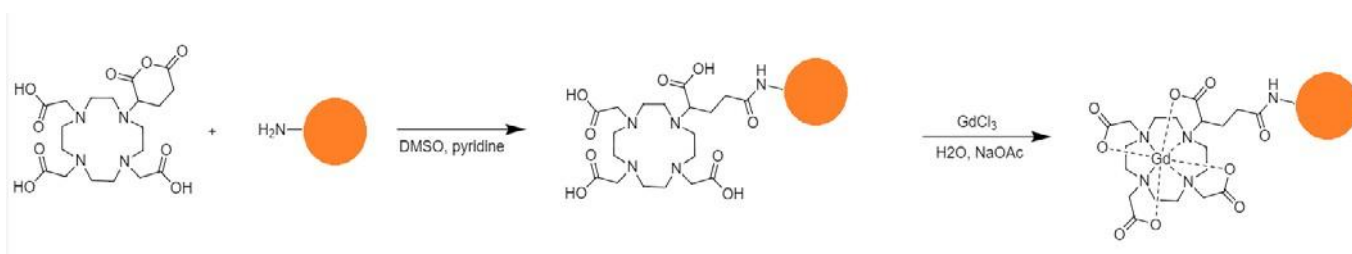


Рис. 20. Схема модифікації поверхні лігандами

Характеристичні смуги (наприклад, у ділянці $1200\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ – коливання зв'язків $\text{C}-\text{O}$ та $\text{N}-\text{H}$) DOTA-GA спостерігаються у модифікованих субстратах. На

існування карбоксилату в аніонній формі вказує наявність асиметричної та симетричної смуг поглинання при 1573 та 1400 cm^{-1}

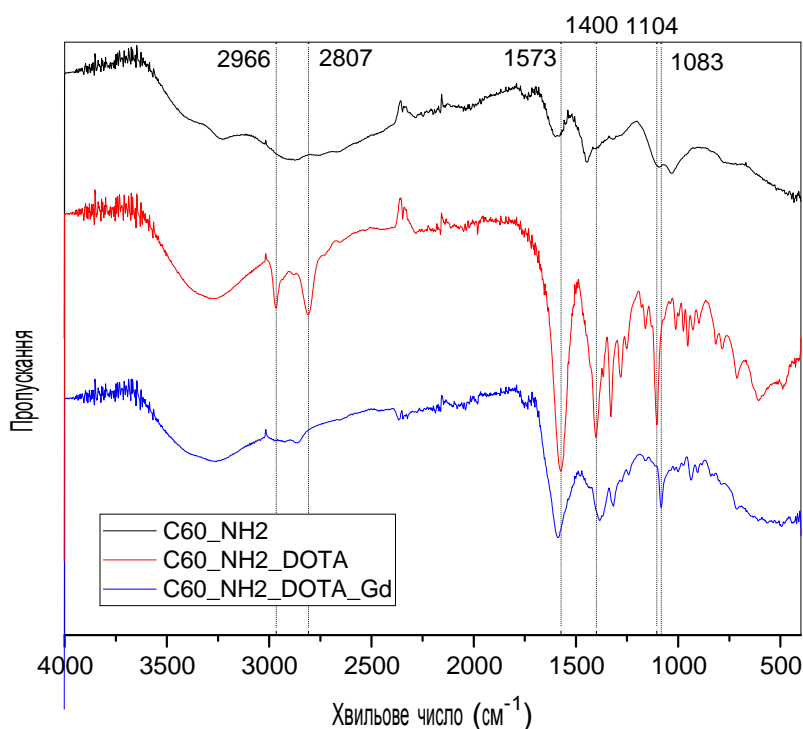


Рис. 21. ІЧ спектри наногібридів на основі фулерену, отриманих прямим амінуванням

З отриманих спектрів можна зробити висновок, що бромовання з подальшим амінуванням дає результати аналогічні прямому амінуванню (рис. 22). Характеристичні піки є однаковими для двох випадків. Також можна спостерігати характеристичні піки ліганду DOTA.

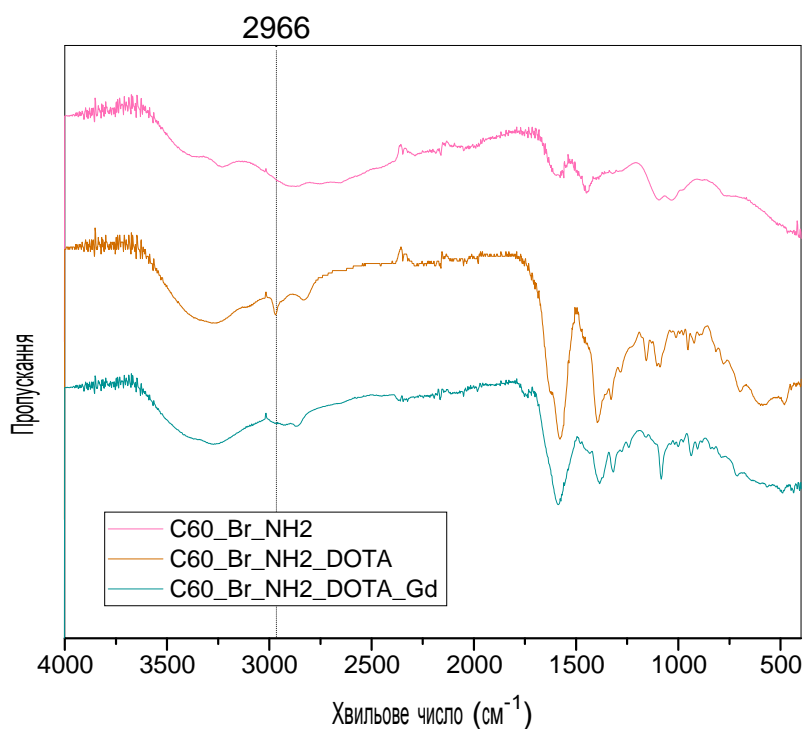


Рис. 22. ІЧ спектри наногібридів на основі фулерену, отриманих бромованням з подальшим амінуванням

Цікавим є те, що при додаванні йону Гадолінію спостерігається зсув смуг (1083 та 1104 cm^{-1}), що свідчить про комплексоутворення та може слугувати його підтвердженням.

Для наночастинок на основі карбон флуороксида, окрім вже перелічених властивостей, можна помітити зміну інтенсивності смуг, особливо в області $\text{C}=\text{O}$ зв'язків, що також пояснюється відповідними перетвореннями. Спостерігається поява широких піків при 3000-3500 cm^{-1} , які відповідають валентним коливанням $\text{N}-\text{H}$ зв'язків. Також з'являються деформаційні коливання $\text{N}-\text{H}$ зв'язків при 1400 cm^{-1} .

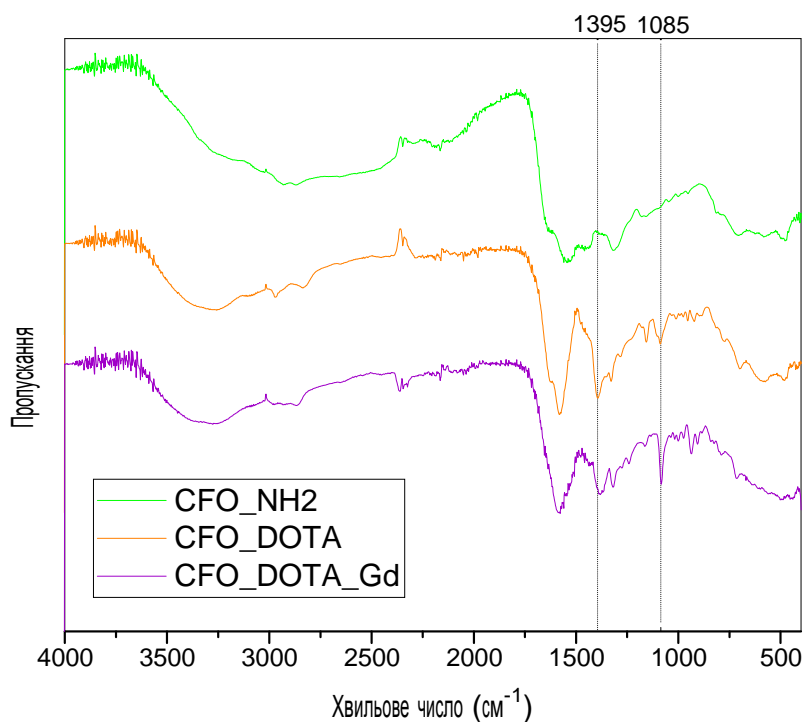


Рис. 23. ІЧ спектри наногібридів на основі карбон флуороксиду

Виходячи з наведених даних, можна зробити висновок про те, що модифікація поверхні наночастинок проходить досить успішно.

2.2 Властивості наногібридів

Дослідження електрофоретичного та динамічного розсіювання світла використовувалось для визначення властивостей отриманих наногібридів: розміру, заряду поверхні. Так, було досліджено дзета-потенціал для амінованих частинок та для частинок, функціоналізованих відповідним лігандом та йоном Гадолінію.

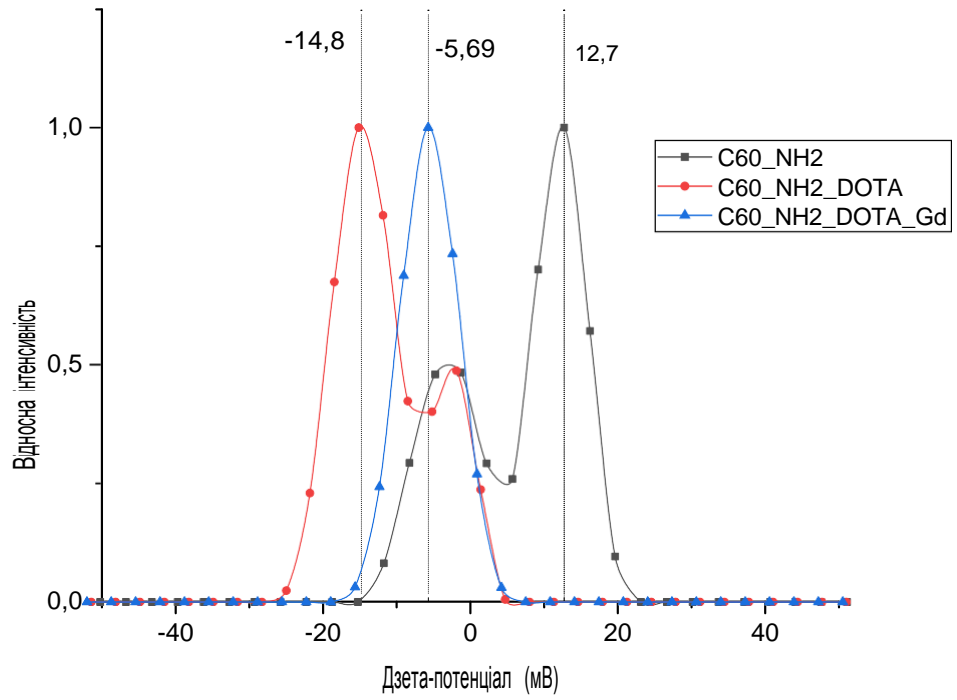


Рис. 24. Дзета-потенціал для фулеренових наночастинок

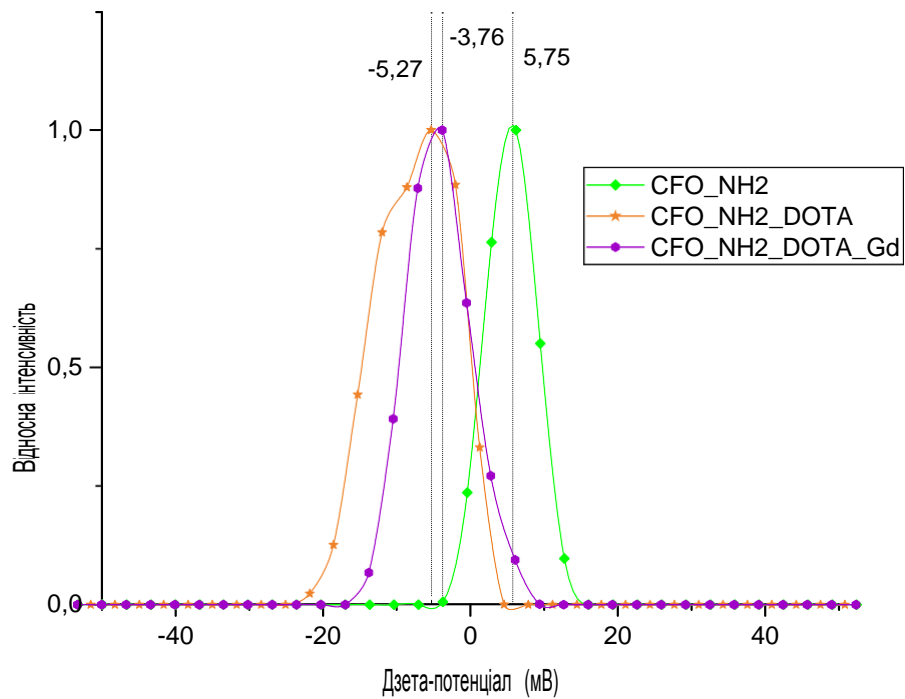


Рис. 25. Дзета-потенціал наночастинок на основі карбон флуороксиду

Аміновані наночастинки, очікувано, мають позитивний дзета-потенціал, що відповідає протонуванню алфатичних аміногруп на поверхні. Від'ємний дзета-потенціал для частинок, модифікованих DOTA та комплексом Гадолінію, свідчить про дисоціацію карбоксильних груп на поверхні. Факт наявності від'ємного дзета-потенціалу в ацетатному буфері вказує на велику кількість лігандів DOTA на поверхні модифікованої наночастинки – більшої, ніж залишкових аліфатичних аміногруп. Аналогічні дослідження для AGuIX® також дають у результаті від'ємний дзета-потенціал при рН=4.7. При лужному рН потенціал зменшуватиметься, однак осадження не відбувається, розчин лишається стійким.

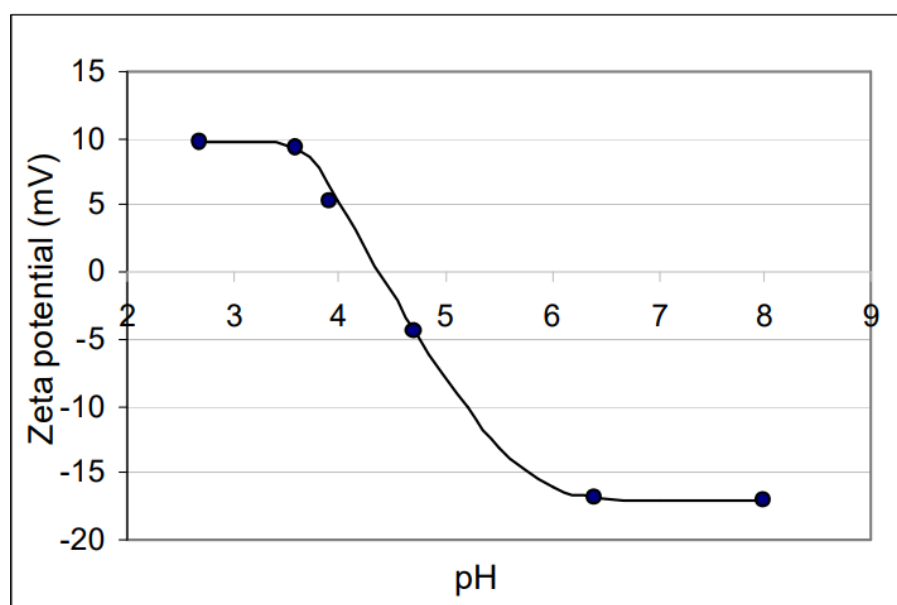


Рис. 26. Дзета-потенціал наночастинок AGuIX® при різних рН [49]

Розміри наночастинок також було проаналізовано методом електрофоретичного та динамічного розсіювання світла. Аналіз вихідних амінованих наночастинок цим методом не дав даних у зв'язку з їх невеликими розмірами. Молекула фулерену має розмір приблизно 1 нм, але після приєднання великих лігандів відбувається збільшення діаметру, відповідно, роздільна здатність прибору дозволяє отримати необхідні дані. Менший розмір

наночастинок (до 10 нм) є важливим для можливості проникнення та накопичення у ракових клітинах.

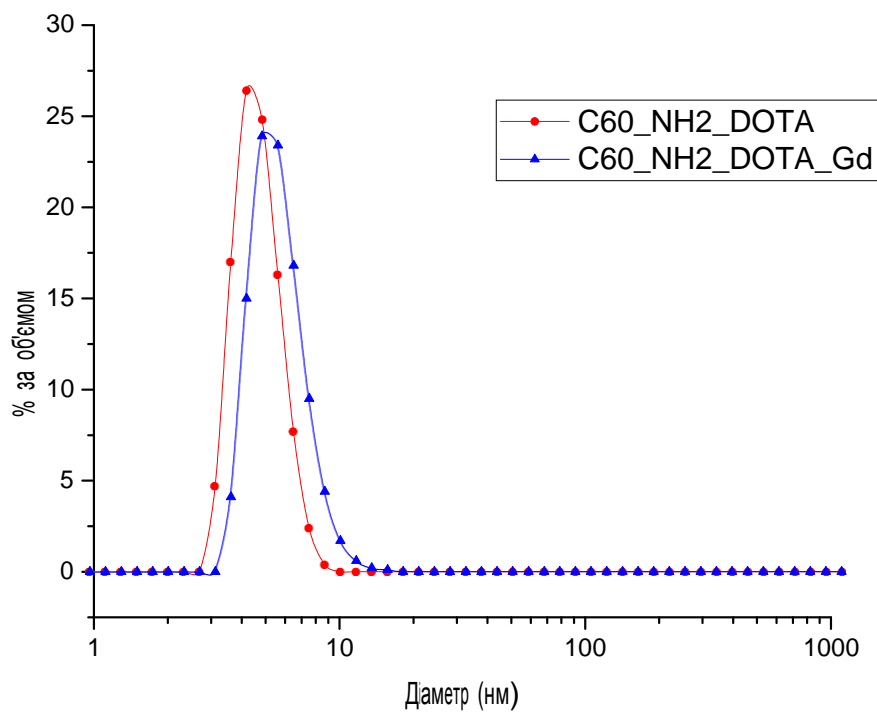


Рис. 27. Розміри наночастинок на основі фулерену

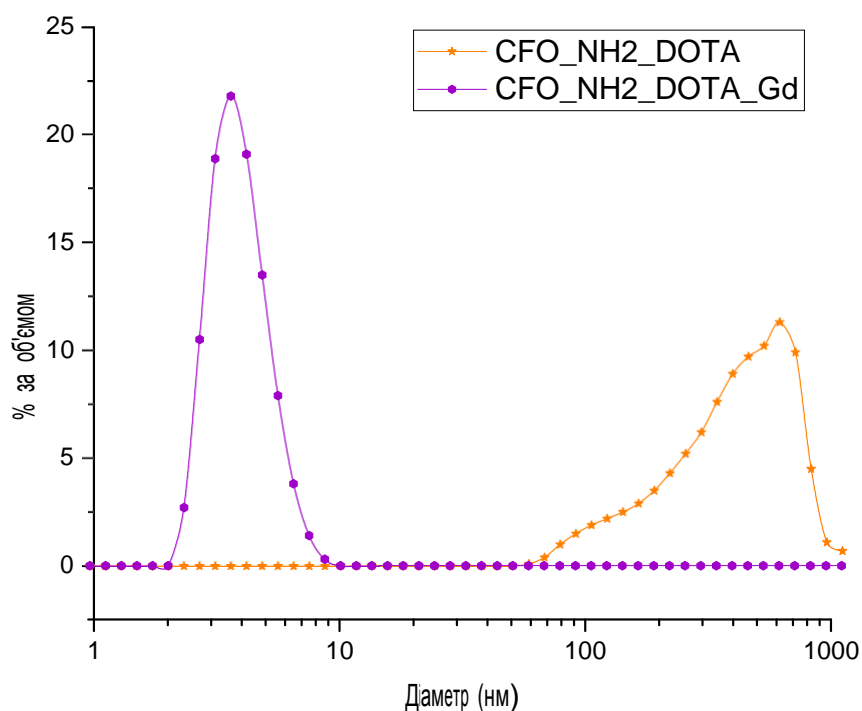


Рис. 28. Розміри наночастинок на основі карбон флуороксиду

Наявність великих структур у модифікованих DOTA карбон флуороксидних наночастинках може вказувати на утворення міцел, які руйнуються при утворенні комплексів з Гадолінієм.

Окрім того, колоїдні властивості отриманих наночастинок є задовільними для подальших досліджень щодо їх застосувань у біовізуалізації. Для перевірки колоїдної стабільності наногібридів з гадолінієвими комплексами у «фізіологічних умовах» проби їх розчинів було розведено розчином, що містив 1% мас хлориду натрію та 0,1% мас гідрокарбонату натрію та залишено на декілька діб. Розчини як до, так і після зберігання являли собою світло-коричневі прозорі рідини, а їх центрифугування не призводило до утворення осадів.

Також, аміновані та модифіковані наночастинок було проаналізовано методом УФ та видимої спектроскопії. Концентрації всіх зразків, окрім амінофулеренів, склали 0,1 мг/мл, для амінофулеренів, отриманих обома

шляхами, концентрація складала 0,01 мг/мл. Спектри не мають характеристичних піків, поглинання різко спадає при збільшенні довжини хвилі. Отримані результати вказують на забарвлення отриманих наночастинок та на особливості будови їхніх ядер (різкий спад на ділянці 200-300 нм дає можливість підтвердити наявність невеликих ароматичних доменів у структурі [61]).

Іншим цікавим спостереженням є те, що для зразків, модифікованих DOTA, спостерігається більш різкий спад поглинання на ділянці 200-250 нм. Це можна пояснити поглинанням ліганду. В його структурі відсутні хромофорні групи, що пояснює поглинання саме на цій ділянці УФ-спектру.

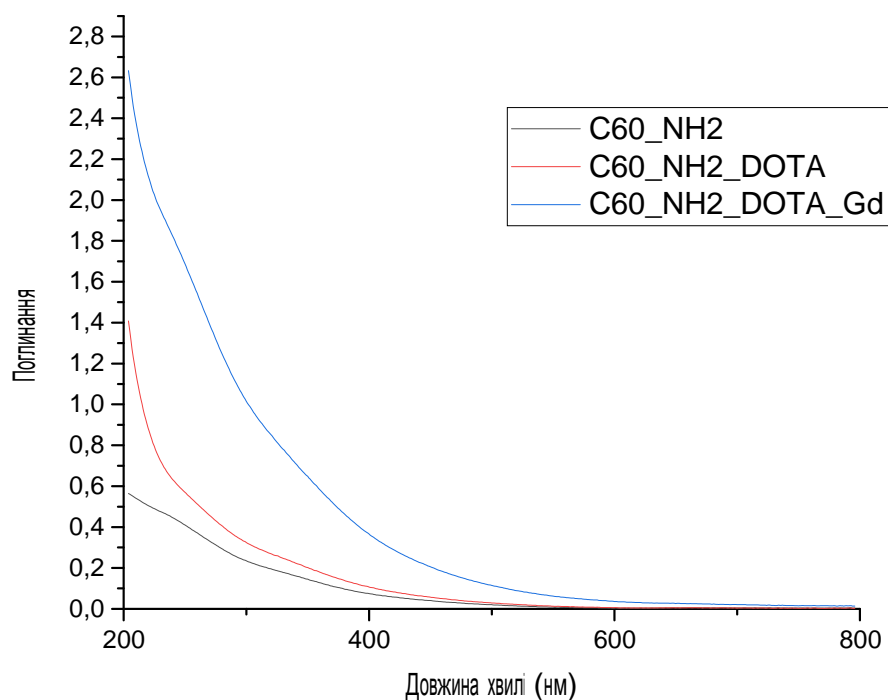


Рис. 29. УФ та видимі спектри наногібридів на основі фулерену, отриманих прямим амінуванням

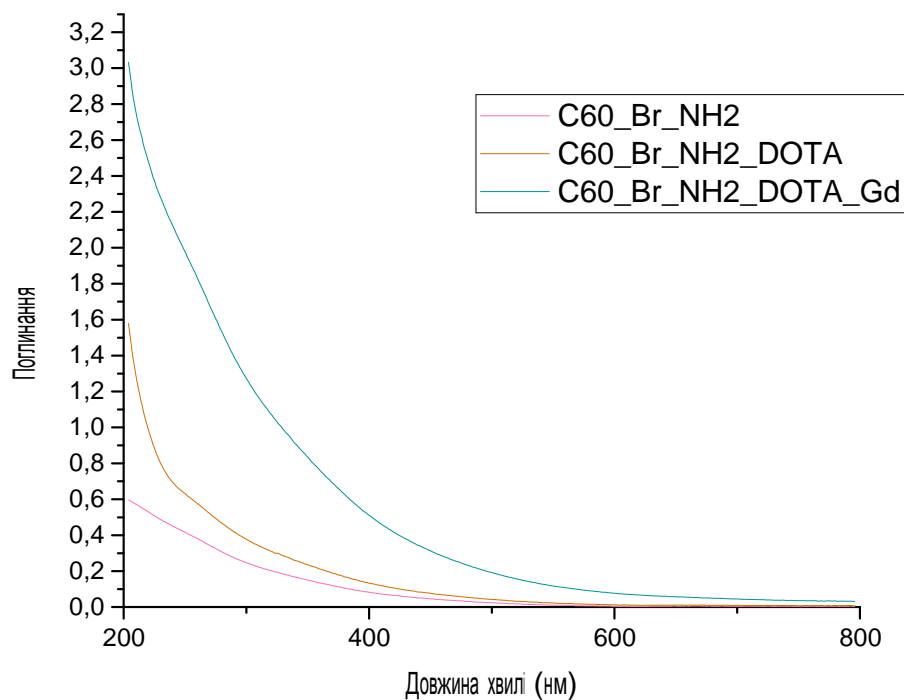


Рис. 30. УФ та видимі спектри наногібридів на основі фулерену, отриманих бромованням з подальшим амінуванням

Також, варто звернути увагу на подібність оптичних властивостей фулеренових зразків, отриманих бромованням та амінуванням. Це вкотре свідчить про подібність хімічних структур отриманих наногібридів.

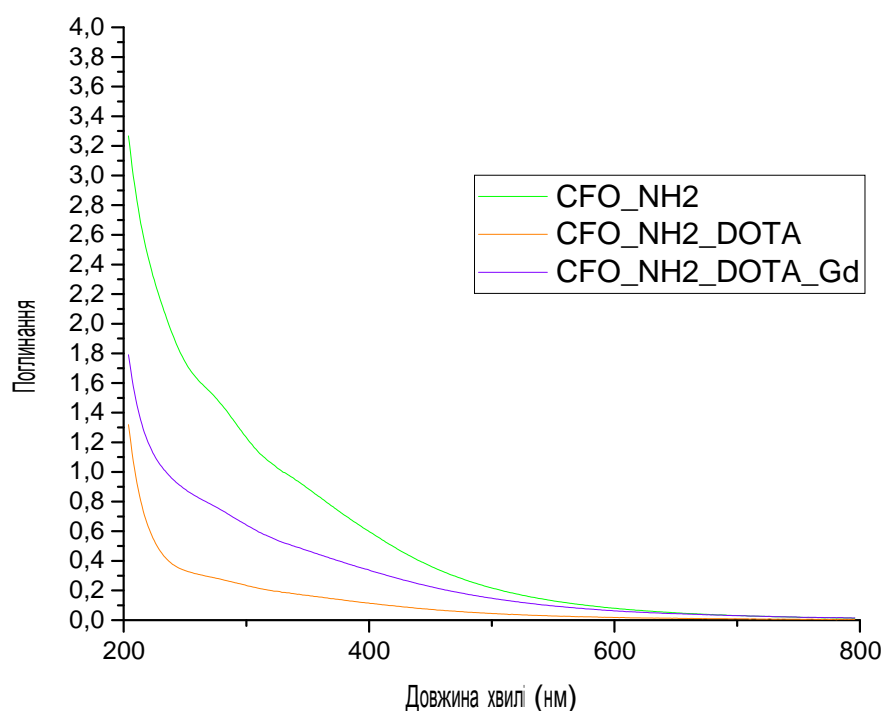


Рис 31. УФ та видимі спектри наногібридів на основі карбон флуороксиду

Окрім того, УФ та видимі спектри дають можливість приблизно оцінити кількість замісників DOTA на поверхні. На ділянці спектру при 400 нм поглинання відбувається виключно за рахунок ядер наночастинок – ліганд DOTA в силу особливостей будови не має поглинати на цьому проміжку. Це дозволяє приблизно оцінити відношення кількості ядер наночастинок до лігандів на поверхні. Для цього було пораховано відношення поглинання амінованих зразків до зразків з лігандом при 400 нм. Це відношення зберігатиметься і для концентрацій.

Відношення поглинання для амінованих фулеренів – 6,4 до 1, для бромованих та амінованих фулеренів – 5,4 до 1, для карбон флуороксиду – 5,25 до 1. Відповідно, можна зробити висновки, про склад зразків:

Табл. 3. Состав зразків з УФ та видимих спектрів

Назва зразка	% ядер	% замісника
C60_NH2_DOTA	15,6	84,4
C60_NH2_DOTA_Gd	53,8	46,2
C60_Br_NH2_DOTA	18,5	81,5
C60_Br_NH2_DOTA_Gd	68,6	31,4
CFO_NH2_DOTA	19	81
CFO_NH2_DOTA_Gd	56,5	43,5

Можна помітити зменшення вмісту замісника після додавання Гадолінію. Це пояснюється або недостатнім очищенням зразків після додавання DOTA, або частковим відщепленням лігандів при проведенні комплексоутворення. Тим не менш, достатня кількість лігандів присутня на поверхні, що вказує на успішний синтез наногібридів.

РОЗДІЛ 3. Експериментальна частина

3.1 Матеріали та реагенти

- фулерен C₆₀, 98% (Sigma-Aldrich)
- карбон флуороксид, синтезований за схемою, описаною в літературі [61]
- DOTA-GA anhydride, reagent grade
- GdCl₃·6H₂O, «ч. д. а.»
- бром, «ч.»
- етанол 96%, «ч.»
- дистильована вода
- залізні ошурки
- CaCl₂, «ч. д. а.»
- гексан, «ч. д. а.»
- етилендіамін, «ч.»
- ацетонітрил, «ч. д. а.»
- розчин HCl визначеної концентрації, було приготовлено з фіксаналу
- NaOH, «ч.»
- орто-ксилол, «ч. д. а.»
- ізопропанол, «ч. д. а.»
- диметилсульфоксид, «ч. д. а.»
- піридин, «ч. д. а.»
- ацетатний буфер готували за наважкою ацетату натрію («ч. д. а.») та з безводної оцтової кислоти («ч. д. а.»)

3.2 Методи дослідження

3.2.1 Інфрачервоні спектри

Усі спектри було записано за допомогою спектрометра Nicolet Nexus 470. Параметри приладу: робочий діапазон 8000-400 см⁻¹, роздільна здатність – 0,5 см⁻¹.

При записі спектрів у режимі пропускання (CFO, фулерен), якщо не вказано інше, використовують діапазон 4000-400 cm^{-1} , кількість сканів – 32, роздільна здатність – 4 cm^{-1} . Для того, щоб мати можливість порівнювати інтенсивності смуг поглинання у спектрах, дотримуються умов: розмір отвору, для якого записують фоновий спектр, відповідає розміру зразку, зразок повністю перекриває отвір, діапазон чутливості приладу для запису фону та зразку однаковий.

Пробопідготовка:

- зразок фулерену було спресовано у таблетки з KBr (1-2% зразку за масою).
- зразок карбон флуороксиду було записано при нанесенні зразка на скельце KBr шляхом натирання. Фон записують відносно скельця KBr. Кількість сканів 128 або 1024.

ІЧ спектри порушеного повного внутрішнього відбиття (ППВВ, attenuated total reflection, ATR) було записано для перетертих порошкоподібних зразків без пробопідготовки та розведення за допомогою приставки ППВВ Smart Orbit (виробництво фірми Thermo Scientific), оптичний елемент – алмаз, кут падаючого променя $\theta=45^\circ$. Діапазон 4000-400 cm^{-1} , кількість сканів – 128, роздільна здатність – 4 cm^{-1} . Фон було записано відносно оптичного елементу без зразку.

3.2.2 Динамічне та електрофоретичне розсіювання світла

Дзета-потенціали та розподіл за розмірами було виміряно на приладі Zetasizer Nano ZS (Malvern) у режимі зворотного розсіювання (173°) в режимі динамічного розсіювання світла. Водні розчини для дослідження було поміщено в кювети DTS1070 (1 см).

3.2.3 Спектроскопія поглинання в УФ та видимій області

Дослідження було проведено на спектрофотометрі Evolution 600 «Thermo scientific», у діапазоні 200-800 нм. Водні розчини було поміщено в кварцову кювету (1 см) для запису спектру.

3.3 Синтез наногібридів

3.3.1 Бромовання фулерену з подальшим амінуванням

10 мл залізних ошурок було змішано з 2 мл бромю. За 10 хвилин до суміші було додано 300 мг фулерену. Отримана суміш була незначно розігріта при постійному перемішуванні упродовж 40 хвилин. За 10 хвилин після перенесення на часове скло, надлишок бромю випарувався. Отриманий продукт було додано до суміші етанол:вода 1:2. Осад виділено центрифугуванням. Подальша очистка до незабарвлених змивних вод.

Осад масою 1,1 г було висушено під вакуумом над хлоридом кальцію. Було отримано коричневий порошок з легким запахом бромю.

330 мг отриманого продукту було додано до 33 мм етилендіаміну при перемішуванні. Після бурної реакції утворений розчин перемішувався 10 хвилин. Надлишок етилендіаміну було випарувано під вакуумом при 40°C. Промито водою, відокремлено ацетонітрилом – цикл очистки повторено двічі. Отриманий осад було повністю розчинено в 0.1М HCl. Після додавання ацетонітрилу водну фазу було відокремлено та розбавлено водою. Цикл висаджування ацетонітрилом-диспергування в воді було повторено декілька разів, продукт висушено в вакуум-ексикаторі над лугом. Отримано порошок масою 112 мг.

3.3.2 Амінування фулеренів

Фулерен було промито гексаном, дисперговано ультразвуковим випромінюванням та відцентрифугувано. Осад було виділено. Цикл очистки повторено тричі.

100 мг темно-коричевого порошку без запаху було змішано з 100 мл етилендіаміну. Темно-зелений розчин лишили при перемішуванні на ніч. Надлишок етилендіаміну було відокремлено після сушки під вакуумом при 40°C. До 5 мл залишку було додано ацетонітрил, отриманий осад було відокремлено та дисперговано в воді. Цикл очистки повторено двічі.

Отриманий осад було повністю розчинено в 0.1М HCl. Після додавання ацетонітрилу водну фазу було відокремлено та розбавлено водою. Цикл висаджування ацетонітрилом-диспергування в воді було повторено декілька разів. Отриманий 1 мл коричневої олії було висушено в вакуум-ексикаторі над лугом. В результаті було отримано близько 100 мг темного порошку

3.3.3 Амінування карбон флуороксиду

300 мг карбон флуороксиду було змішано з 15 мл етилендіаміну. Суміш було нагріто до 110°C та залишено на годину при постійному перемішуванні. Надлишок етилендіаміну було випаровано в тоці Аргону при 120°C.

Отримана олія була розчинена в воді та відцентрифугована, надлишок SiC відокремлено. Після додавання надлишку ацетонітрилу водну фазу було виділено центрифугуванням та розбавлено водою. Цикл очистки повторено декілька разів.

Отримана олія об'ємом приблизно 0.7 мл була висушена під вакуумом над NaOH. В результаті було отримано чорний гігроскопічний порошок.

3.4 Модифікація лігандом DOTA та Gd³⁺

50 мг отриманих амінованих зразків було розчинено в 2,5 мл води. До отриманого розчину було додано суспензію 500 мг DOTA-GA в 25 мл диметилсульфоксиду. Після 10 хвилин перемішування було додано по 1,5 мл піридину. Після доби перемішування продукт було виділено додаванням ацетонітрилу. Отриманий осад було розчинено в воді та знов виділено після додавання ацетонітрилу. Осад було розчинено у 2 мл 1М розчину ацетату натрію, розведено водою та виділено після додавання ацетонітрилу. Цикл промивання з

водою та ацетонітрилом повторено декілька разів. При поганому відокремленні було додано ацетат натрію. Отримані коричневі олії було висушено в вакуум-ексикаторі над NaOH. Було отримано коричневі порошки масами:

C60_NH2_DOTA3: 276 мг

C60Br_DOTA3: 300 мг

CFO_DOTA3: 190 мг

По 50 мг отриманих проб було змішано з 5 мл 0,02М розчину хлориду Гадолінію, 3,5 мл води та 1,5 мл 1М розчину ацетату натрію. Суміш було нагріто до 80°C впродовж 3 годин при перемішуванні. Продукт багатократно промито осадженням ацетонітрилом. Висушено в вакуум-ексикаторі над NaOH. Було отримано по 10 мг коричневих порошоків.

3.5 Приготування розчинів наночастинок

Наважки наногібридів після модифікації DOTA та Гадолінієм масою 2.0 мг було змішано з 20 мкл 1М ацетату натрію, 20 мкл 1М оцтової кислоти та водою (до 2,0 мл). Всі зразки повністю розчинилися при незначному перемішуванні, утворення осадів при центрифугуванні (10 хв, 10000 об/хв) не відбувалося.

Для проведення вимірювань методом динамічного світлорозсіювання та запису оптичних спектрів поглинання одержані розчини було розведено водою в 10 разів.

Для перевірки колоїдної стабільності наногібридів з гадолінієвими комплексами у «фізіологічних умовах» проби їх розчинів було розведено у 10 разів розчином, що містив 1% мас хлориду натрію та 0,1% мас гідрокарбонату натрію та залишено на декілька діб. Розчини як до, так і після зберігання являли собою світло-коричневі прозорі рідини, а їх центрифугування (10 хв, 10000 об/хв) не призводило до утворення осадів.

ВИСНОВКИ

1. Взаємодія фулерену C_{60} , бромованого фулерену $C_{60}Br_{24}$ та флуорооксиду карбону з етилендіаміном дозволяє отримати водорозчинні аміновані наночастинки, будову яких підтверджено методом ІЧ-спектроскопії.
2. Реакція цих частинок з ангідридом DOTA-GA зумовлює закріплення на їх поверхні хелатуючих макроциклічних лігандів, здатних до утворення міцних комплексів з Gd^{3+} .
3. За даними динамічного та електрофоретичного світлорозсіювання розмір частинок з закріпленими лігандами та їх гадолінієвих комплексів становить близько 4 нм, а їх зета-потенціал складає $-4 - -15$ мВ при $pH = 4.7$. Таке значення потенціалу зумовлює стійкість золів частинок, зокрема у «фізіологічних» умовах.
4. Оптичні спектри поглинання одержаних частинок типові для карбон-вмісних речовин, світлопоглинання яких зумовлено наявністю порівняно невеликих ароматичних доменів. Порівняння інтенсивності світлопоглинання амінованих та функціоналізованих частинок дозволило провести оцінку вмісту поверхневих гадолінієвих комплексів: 30 – 50% від маси зразка.
5. Властивості досліджених частинок відповідають базовим вимогам до наночастинок для застосування в МРТ-біовізуалізації та терапії, що вказує на перспективність їх подальших досліджень в цій галузі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. (1946). Nuclear induction experiment. *Physical Review*, 70:474–85.
2. Bloch F, Hansen WW, Packard M. (1946). Resonance absorption by nuclear magnetic moment in a solid. *Physical Review*, 69:37–8.
3. Gibby, WA. (2005). Basic principles of magnetic resonance imaging. *Neurosurgery clinics of North America*, 16, 1-64.
4. VM Runge, JA Clanton, CM Lukehart, CL Partain, and AE James, Jr. (1983). Paramagnetic agents for contrast-enhanced NMR imaging: a review. *American Journal of Roentgenology*, 141:6, 1209-1215
5. Bloembergen N, Purcell EM, Pound RV. (1948). Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Physical Review*, 73:679-710
6. Dwek RA. (1973). *Nuclear magnetic resonance in biochemistry. Applications to enzyme systems.* Oxford: Clarendon
7. Brasch, R. C. (1983). Work in progress: methods of contrast enhancement for NMR imaging and potential applications. A subject review. *Radiology*, 147(3), 781–788.
8. Davis PL, Kaufman L, Crooks LE, Miller TR. (1981). Detectability of hepatomas in rat livers by nuclear magnetic resonance imaging. *Investigative Radiology*, 16(5), 354–358
9. Bousquet, J. C., Saini, S., Stark, D. D., Hahn, P. F., Nigam, M., Wittenberg, J., & Ferrucci, J. T. (1988). Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex. *Radiology*, 166(3), 693–698
- 10.L. Christofer Adding, Gerard L. Bannenberg, Lars E. Gustafsson. (2001). Basic Experimental Studies and Clinical Aspects of Gadolinium Salts and Chelates. *Cardiovascular Drug Reviews*, 19(1), 41–56
- 11.Kobayashi, K., Usami, N., Porcel, E., Lacombe, S., & Le Sech, C. (2010). Enhancement of radiation effect by heavy elements. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1-3), 123–131.

12. Carlos F. G. C. Geraldes, Sophie Laurent. (2009). Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 4, 1–23
13. Gries, H. (2002). Extracellular MRI Contrast Agents Based on Gadolinium. *Contrast Agents I*, 1–24.
14. Moore DA, Wallace RA US Patent 5,137,711 Paramagnetic DTPA and EDTA alkoxyalkylamide complexes as MRI agents
15. Stetter, H., & Frank, W. (1976). Complex Formation with Tetraazacycloalkane- N,N',N'',N''' -tetraacetic Acids as a Function of Ring Size. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 15(11), 686–686
16. Magerstädt, M., Gansow, O. A., Brechbiel, M. W., Colcher, D., Baltzer, L., Knop, R. H., ... Naegele, M. (1986). Gd(DOTA): An alternative to Gd(DTPA) as a T1,2 relaxation agent for NMR imaging or spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 3(5), 808–812
17. Platzek J., Blaszkiewicz P., Gries H., Luger P., Michl G., Mühler-Fahrnow A., Raduechel B., Suelzle D. (1997). Synthesis and Structure of a New Macrocyclic Polyhydroxylated Gadolinium Chelate Used as a Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging. *Inorganic Chemistry*, 36, 26, 6086-6093
18. Dishino D. D., Delaney E. J., Emswiler J. E., Gaughan G. T., Prasad J. S., Srivastava S. K., Tweedle M. F. (1991) Synthesis of nonionic gadolinium chelates useful as contrast agents for magnetic resonance imaging: 1,4,7-tris(carboxymethyl)-10-substituted-1,4,7,10-tetraazacyclododecanes and their corresponding gadolinium chelates. *Inorganic Chemistry* 30, 6, 1265-1269
19. Botta M., Aime S., Barge A., Bobba G., Dickins R. S., Parker D., Terreno E. (2003). Ternary Complexes between cationic GdIII Chelates and Anionic Metabolites in Aqueous Solution: An NMR Relaxometric Study. *Chemistry European Journal*, 9,9, 2102–2109
20. Toth E., Kiraly R., Platzek J., Raduechel B., Bruecher E. (1996). Equilibrium and kinetic studies on complexes of 10-[2,3-dihydroxy-(1-hydroxymethyl)-propyl]-

- 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate *Inorganica Chimica Acta* 249, 2, 191-199
21. Schumann H, Boettger UA, Zietzke K, Hemling H, Kociok-Koehn G, Pickardt J, Hahn FE, Zschunke A, Schiefner B, Gries H, Raduechel B, Platzek J (1997) 1,4,7,10,13,16,19,22-Octaazacyclotetracosane-1,4,7,10,13,16,19,22-octaacetic Acid (H₈O_{TEC}) and 1,4,7,10,14,17,20,23-Octaazacyclohexacosane-1,4,7,10,14,17,20,23-octaacetic Acid (H₈O_{HEC}): Synthesis and Characterization of Two Large Macrocyclic Polyamine Polycarboxylic Ligands and Some of Their Copper(II) and Lanthanide(III) Complexes. *Chemische Berichte*, 130(2), 267–277.
22. Schumann H, Bottger UA, Weisshoff H, Ziemer B, Zschunke A CCDC 111379: Experimental Crystal Structure Determination, 2000, DOI: 10.5517/cc3qwwk
23. Caravan P. (2006). Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium-based MRI contrast agents. *Chemical Society Reviews*. 35, 512-523
24. Werner, E. J., Datta, A., Jocher, C. J., & Raymond, K. N. (2008). High-Relaxivity MRI Contrast Agents: Where Coordination Chemistry Meets Medical Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(45), 8568–8580
25. Bernhard, C., Moreau, M., Lhenry, D., Goze, C., Boschetti, F., Rousselin, Y., ... Denat, F. (2012). DOTAGA-Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents. *Chemistry - A European Journal*, 18(25), 7834–7841
26. Soto C. M., Ratna B. R. (2010). Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 426–438.
27. Ma Y., Nolte R. J., Cornelissen J. J. (2012). Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 811–825
28. Pokorski J. K., Steinmetz N. F. (2011). The Art of Engineering Viral Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 8, 29–43.
29. Bruckman M. A., Yu X., Steinmetz N. F. (2013). Engineering Gd-loaded nanoparticles to enhance MRI sensitivity via T1 shortening. *Nanotechnology*, 22, 24(46), 462001

30. Allen M., Bulte J. W., Liepold L., Basu G., Zywicke H. A., Frank J. A., Young M., Douglas T. (2005). Paramagnetic viral nanoparticles as potential high-relaxivity magnetic resonance contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine*, 54, 807–812
31. Liepold L., Anderson S., Willits D., Oltrogge L., Frank J. A., Douglas T., Young M. (2007). Viral capsids as MRI contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine*, 58, 871–879
32. Israelachvili J. N., Mitchell D. J., Ninham B. W. (1976). Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*, 72, 1525–1568.
33. Devoisselle J. M., Vion-Dury J., Galons J. P., Confort-Gouny S., Coustaut D., Canioni P., Cozzone P. J. (1988). Entrapment of gadolinium-DTPA in liposomes. Characterization of vesicles by P-31 NMR spectroscopy. *Investigative Radiology*, 23, 719–724
34. Fossheim S. L., Fahlvik A. K., Klaveness J., Muller R. N. (1999). Paramagnetic liposomes as MRI contrast agents: influence of liposomal physicochemical properties on the in vitro relaxivity. *Magnetic Resonance Imaging*, 17, 83–89
35. Tilcock C., Unger E., Cullis P., Macdougall P. (1989). Liposomal Gd-Dtpa - Preparation and Characterization of Relaxivity. *Radiology*, 171, 77–80
36. Unger E., Needleman P., Cullis P., Tilcock C. (1988). Gadolinium-DTPA liposomes as a potential MRI contrast agent. Work in progress. *Investigative Radiology*, 23, 928–932
37. Accardo A., Tesauro D., Aloj L., Pedone C., Morelli G. (2009). Supramolecular aggregates containing lipophilic Gd(III) complexes as contrast agents in MRI. *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 2193–2213.
38. Menjoge A. R., Kannan R. M., Tomalia D. A. (2010). Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discovery Today*, 15, 171–185

39. Adam G., Neuerburg J., Spuntrup E., Muhler A., Scherer K., Gunther R. W. (1994). Gd-DTPA-cascade-polymer: potential blood pool contrast agent for MR imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*; 4, 462–466.
40. Venditto V. J., Regino C. A. S., Brechbiel M. W. (2005). PAMAM Dendrimer Based Macromolecules as Improved Contrast Agents. *Molecular Pharmaceutics*; 2, 302–311
41. Malik N., Wiwattanapatapee R., Klopsch R., Lorenz K., Frey H., Weener J. W., Meijer E. W., Paulus W., Duncan R. (2000). Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release*, 65, 133–148
42. Dreaden E. C., Alkilany A. M., Huang X., Murphy C. J., El-Sayed M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemistry Society Reviews*, 41, 2740–2779
43. Debouttière P. J., Roux S., Vocanson F., Billotey C., Beuf O., Favre-Réguillon A., Lin Y., Pellet-Rostaing S., Lamartine R., Perriat P., Tillement O. (2006). Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced Functional Materials*, 16, 2330–2339
44. Warsi M. F., Chechik V. (2011). Strategies for increasing relaxivity of gold nanoparticle-based MRI contrast agents. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 9812
45. M. Herold, I. J. Das, C. C. Stobbe, D. (2000). Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement. *International Journal of Radiation Biology*, 76(10), 1357–1364
46. Jaganathan H., Godin B. (2012). Biocompatibility assessment of Si-based nano- and microparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 1800–1819
47. Du, Y., Sun, H., Lux, F., Xie, Y., Du, L., Xu, C., Zhang H., He N., Wang J., Liu Y., Leduc G., Doussineau T., Ji K., Wang Q., Lin Z., Wang Y., Liu Q., Tillement, O. (2020). Radiosensitization Effect of AGuIX, a Gadolinium-Based Nanoparticle, in

- Nonsmall Cell Lung Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12, 51, 56874–56885
48. Verry, C., Dufort, S., Villa, J., Gavard, M., Iriart, C., Grand, S., Charles, J., Chovelon, B., Cracowski, J.-L., Quesada, J.-L., Mendoza, C., Sancey, L., Lehmann, A., Jover, F., Giraud, J.-Y., Lux, F., Crémillieux, Y., McMahon, S., Pauwels, P.J., Cagney, D., Berbeco, R., Aizer, A., Deutsch, E., Loeffler, M., Le Duc, G., Tillement, O., Balosso, J. (2021). Theranostic AGuIX nanoparticles as radiosensitizer: A phase I, dose-escalation study in patients with multiple brain metastases (NANO-RAD trial). *Radiotherapy and Oncology*, 160, pp. 159-165
49. Mignot A, Truillet C, Lux F, Sancey L, Louis C, Denat F, Boschetti F, Bocher L, Gloter A, Stéphan O, Antoine R, Dugourd P, Luneau D, Novitchi G, Figueiredo LC, de Morais PC, Bonneviot L, Albela B, Ribot F, Van Lokeren L, Déchamps-Olivier I, Chuburu F, Lemercier G, Villiers C, Marche PN, Le Duc G, Roux S, Tillement O, Perriat P. (2013). A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chemistry*, 19(19): 6122-36
50. Truillet, C., Bouziotis, P., Tsoukalas, C., Brugière, J., Martini, M., Sancey, L., Brichart, T., Denat, F., Boschetti, F., Darbost, U., Bonnamour, I., Stellas, D., Anagnostopoulos, C. D., Koutoulidis, V., Mouloupoulos, L. A., Perriat, P., Lux, F., and Tillement, O. (2015) Ultrasmall particles for Gd-MRI and ⁶⁸Ga-PET dual imaging. *Contrast Media Molecular Imaging*, 10: 309– 319
51. Mao, S., Shuai, X., Unger, F., Simon, M., Bi, D., & Kissel, T. (2004). The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 281(1-2), 45–54
52. Wu, A. C. M., Bough, W. A., Conrad, E. C., & Alden, K. E. (1976). Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 128(1), 87–99
53. Kasaai, M. R., Arul, J., & Charlet, G. (2000). Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38(19), 2591–2598

54. Kapadnis, G., Dey, A., Dandekar, P. and Jain, R. (2019). Effect of degree of deacetylation on solubility of low-molecular-weight chitosan produced via enzymatic breakdown of chitosan. *Polymer International*, 68: 1054-1063.
55. Gonçalves, C., Ferreira, N., & Lourenço, L. (2021). Production of Low Molecular Weight Chitosan and Chitooligosaccharides (COS): A Review. *Polymers*, 13(15), 2466
56. Gibot, L., Chabaud, S., Bouhout, S., Bolduc, S., Auger, F. A., & Moulin, V. J. (2015). Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 370–379
57. Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesàro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 219–228
58. Tokumitsu, H., Ichikawa, H., & Fukumori, Y. (1999). Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization *Pharmaceutical Research*, 16(12), 1830–1835.
59. Park, H., Hyun Noh, S., Hye Lee, J., Jun Lee, W., Yun Jaung, J., Geol Lee, S., & Hee Han, T. (2015). Large Scale Synthesis and Light Emitting Fibers of Tailor-Made Graphene Quantum Dots. *Scientific Reports*, 5(1)
60. Chawda, N., Basu, M., Majumdar, D., Poddar, R., Mahapatra, S. K., & Banerjee, I. (2019). Engineering of Gadolinium-Decorated Graphene Oxide Nanosheets for Multimodal Bioimaging and Drug Delivery. *ACS Omega*, 4(7), 12470–12479
61. Alekseev, S., Korytko, D., Iazykov, M., Khainakov, S., & Lysenko, V. (2015). Electrochemical Synthesis of Carbon Fluorooxide Nanoparticles from 3C-SiC Substrates. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(35), 20503–20514.
62. Zheng J-P, Zhen M-M, Wang C-R, Shu C-Y. (2012). Recent Progress of Molecular Imaging Probes Based on Gadofullerenes. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40:1607–1615.

- 63.: I. Rašović (2017) Water-soluble fullerenes for medical applications, *Materials Science and Technology*, 33:7, 777-794
64. Wudl, F.; Hirsch, A.; Khemani, K. C.; Suzuki, T.; Allemand, P.-M.; Koch, A.; Eckert, H.; Srdanov, G.; Webb, H. M. (1992). A Survey of Chemical Reactivity of C₆₀: Electrophile and Diene-Polarophile Par Excellence. *Fullerenes: Synthesis, Properties, and Chemistry*, Hammond, G.S. and Kuck, V.J., Eds., ACS Symposium Series, 161-175.
65. Chun-Mao Lin, & Tan-Yi Lu. (2012). C₆₀ Fullerene Derivatized Nanoparticles and their Application to Therapeutics. *Recent Patents on Nanotechnology*, 6(2), 105–113
66. Saeedfar, K., Heng, L., Ling, T., & Rezayi, M. (2013). Potentiometric Urea Biosensor Based on an Immobilised Fullerene-Urease Bio-Conjugate. *Sensors*, 13(12), 16851–16866
67. Djordjević, A., Vojinović-Miloradov, M., Petranović, N., Devečerski, A., Lazar, D., & Ribar, B. (1998). Catalytic Preparation and Characterization of C₆₀Br₂₄. *Fullerene Science and Technology*, 6(4), 689–694
68. Popov, A. ., Senyavin, V. ., & Granovsky, A. . (2004). Vibrations of bromofullerene C₆₀Br₂₄: C60 cage confined into static bromine sphere. *Chemical Physics Letters*, 383(1-2), 149–155
69. Birkett, P., Hitchcock, P., Kroto, H. et al. (1992). Preparation and characterization of C₆₀Br₆ and C₆₀Br₈. *Nature* 357, 479–481.
70. Zhao, Y., Jin, B., Zheng, T. et al. (2022). Thermal decomposition mechanism of amino-fullerene nitrates with different amounts of nitrate groups. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.