Streszczenie

Fulerenole, o ogólnym wzorze $C_{60}(OH)_n$ (n=2-44) będące rozpuszczalnymi w wodzie, hydroksylowanymi pochodnymi fulerenów C_{60} stały się w ostatnim czasie obiektem licznych badań nad możliwością zastosowania ich w naukach biomedycznych. Fulerenole cechują się wysokim powinowactwem elektronowym, wobec czego łatwo przyłączają rodniki oraz podstawniki nukleofilowe (Grebowski i wsp., 2013a, Krokosz i wsp., 2014). Dane literaturowe wskazują, że fulerenole nie wykazują cytotoksyczności w zakresie stężeń stosowanych do ochrony przed wolnymi rodnikami (Grebowski i wsp., 2013a). Istnieje wiele przekonujących dowodów na temat antyoksydacyjnych właściwości rozpuszczalnych w wodzie pochodnych fulerenów (Katoi wsp., 2009; Caii wsp., 2010; Injac i wsp., 2013; Grebowski i wsp., 2013a) jednakże wciąż dysponujemy zbyt małą wiedzą na temat mechanizmu działania tych cząsteczek oraz ewentualnych działań niepożądanych. Stąd istnieje konieczność dalszych badań nad wpływem fulerenoli na błony biologiczne w celu weryfikacji toksyczności i możliwości wykorzystania tych nanomateriałów zanim stanie się możliwe ich zastosowanie terapeutyczne.

Wyniki najnowszych badań wskazują na rosnące zainteresowanie badaczy wysoko hydroksylowanymi fulerenolami z liczbą grup hydroksylowych (-OH) powyżej 30 w aspekcie ich właściwości antyoksydacyjnych. Wynika to również z faktu, iż wzrost hydroksylacji cząsteczki fulerenu przyczynia się do zmniejszenia jego cytotoksyczności i wzrostu rozpuszczalności w roztworach wodnych. Fizykochemiczne właściwości fulerenoli zależą również od liczby grup hydroksylowych oraz ich usytuowania na powierzchni klatki fulerenu (Guirado-López R, Rincón M, 2006; Grebowski i wsp., 2013a).

Do tej pory nie wyjaśniono jednak czy znaczna liczba grup hydroksylowych przyłączona do węglowej klatki fulerenu (C_{60}) może wpływać na zdolność do zmiatania reaktywnych form tlenu (RFT). Odpowiedz na to pytanie umożliwia wyznaczenie stałych szybkości reakcji produktów radiolizy wody z fulerenolem.

Metoda radiolizy impulsowej jest podstawową techniką stosowaną do wyznaczania wartości stałych szybkości reakcji zarówno reaktywnych form tlenu jak i azotu (Houée-Levin i Bobrowski, 2013; Samuni i wsp., 2012). Wartości stałych szybkości reakcji z głównymi produktami radiolizy wody otrzymane metodą radiolizy impulsowej są pomocne przy

przewidywaniu czy dany związek może okazać się skutecznym antyoksydantem. Przejściowe produkty radiolizy wody reagują z biomolekułami powodując tworzenie wtórnych produktów radiolizy wody np. rodników białkowych, które z kolei reagując z materiałem genetycznym mogą prowadzić do jego uszkodzenia (Schuessler i Jung, 1989). Białka reagują z produktami radiolizy wody: e_{aq}^-, H•, •OH z dość dużymi stałymi szybkości reakcji miedzy 10^9-10^{11} $dm^3mol^{-1}s^{-1}$ (Buxton i wsp., 1988). Z punktu widzenia zmian w strukturze biomolekuł pełniących szereg rożnych funkcji w komórce najniebezpieczniejszy jest rodnik hydroksylowy (•OH). Posiada on bardzo wysoki potencjał utleniający w środowisku obojętnym E^0(•OH/OH^-) = 1,8 V (Buxton i Mulazzani, 1999). Ponadto brak w komórkach mechanizmów enzymatycznych usuwających rodniki •OH. W związku z tym może on modyfikować praktycznie wszystkie składniki budujące komórki (DNA, białka, lipidy i cukry) (Grębowski i Krokosz, 2010).

Stała szybkości reakcji dla fulerenolu o osiemnastu grupach hydroksylowych- $C_{60}(OH)_{18}$ z rodnikiem hydroksylowym (•OH) wyznaczona przez Guldiego i Asmusa (1999) przy użyciu radiolizy impulsowej wynosi $2{,}4 \cdot 10^9$ $dm^3mol^{-1}s^{-1}$. Autorzy proponują, że zmiatanie rodnika •OH przez fulerenol $C_{60}(OH)_{18}$ zachodzi przez przyłączenie rodnika •OH do wiązania podwójnego rdzenia węglowego fulerenolu. Nie jest jednak określona stała szybkości reakcji dla wysoko hydroksylowanego fulerenu oraz nie jest wyjaśnione czy znaczna liczba grup HO- w cząsteczce $C_{60}(OH)_x$, x>30 może wpływać na wartość stałych szybkości reakcji z produktami radiolizy wody o właściwościach utleniających (•OH) i redukujących (e_{aq}^-). Liczba wiązań podwójnych w cząsteczce fulerenolu zmniejsza się wraz z przyłączaniem kolejnych grup hydroksylowych, można więc oczekiwać, że reaktywność z rodnikowymi produktami radiolizy wody będzie zależała od stopnia hydroksylacji fulerenolu (Grebowski i wsp., 2014).

Celem niniejszej pracy doktorskiej było wyznaczenie stałych szybkości reakcji fulerenolu - $C_{60}(OH)_{36}$ z elektronem uwodnionym (e_{aq}^-), rodnikiem hydroksylowym (•OH) i oszacowanie energii aktywacji tej reakcji oraz zbadanie oddziaływań pomiędzy $C_{60}(OH)_{36}$ a błoną komórkową erytrocytów.

Pierwszym etapem prac eksperymentalnych prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była charakterystyka fizykochemiczna fulerenolu ($C_{60}(OH)_{36}$). Otrzymany w Zakładzie Radiobiologii wysoko hydroksylowany fulerenol analizowano z

wykorzystaniem metod spektroskopowych, takich jak: spektroskopia UV-Vis, fluorescencja, spektroskopia IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, spektroskopia masowa (MALDI-TOF) oraz analiza elementarna. Przeprowadzona analiza potwierdziła obecność 36 ugrupowań hydroksylowych (-OH) przyłączonych do „węglowej klatki" C_{60} (Grebowski i wsp., 2013b)

Wartości stałych szybkości reakcji $C_{60}(OH)_{36}$ z rodnikiem $^{\bullet}OH$ i e_{aq}^{-} wyznaczono z wykorzystaniem metody radiolizy impulsowej. Napromieniowania wykonano przy użyciu liniowego akceleratora elektronów ELU-6e o energii wiązki elektronów 6-8 MeV we współpracy z Międzyresortowym Instytutem Techniki Radiacyjnej (MITR) Politechniki Łódzkiej.

Odziaływanie fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z błoną plazmatyczną erytrocytów określano przy użyciu metod elektroforetycznych, mikroskopowych i spektroskopowych. Na podstawie wykonanych pomiarów analizowano: kształt komórek, poziom hemolizy, wyciek K^{+}, agregację/fragmentację białek błonowych, aktywność ATPaz jonozależnych zlokalizowanych w błonie erytrocytarnej, płynność błony plazmatycznej za pomocą znaczników fluorescencyjnych lokujących się w różnych regionach błony erytrocytu.

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w trzech spójnych tematycznie artykułach oryginalnych oraz uzupełnione jedną pracą przeglądową. Uzyskano następujące wyniki:

1. Stała szybkości reakcji wysoko hydroksylowanego fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z rodnikiem $^{\bullet}OH$ wynosi $2{,}0 \bullet 10^{9}$ dm^{3} mol^{-1} s^{-1} i jest podobna do wartości uzyskanej przez Guldiego i Asmusa (1999) dla fulerenolu $C_{60}(OH)_{18}$ (Grebowski i wsp., 2014).
2. Wartość stałej szybkości reakcji fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z elektronem uwodnionym e_{aq}^{-} wynosi $2{,}5 \bullet 10^{9}$ dm^{3} mol^{-1} s^{-1} i jest około 5-krotnie wyższa od stałej szybkości reakcji dla $C_{60}(OH)_{18}$ (Mohan i wsp., 1998; Grebowski i wsp., 2014)
3. Energia aktywacji dla reakcji fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z rodnikiem $^{\bullet}OH$ wyznaczona z równania Arrheniusa wynosi 22,7 kJ mol^{-1} (Grebowski i wsp., 2014)
4. W badaniach dotyczących zmian struktury błony plazmatycznej poddanej działaniu fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ wykazano, że badany związek zwiększa płynność błony plazmatycznej erytrocytów człowieka, zarówno w jej obszarze powierzchniowym, jak

i w obszarze hydrofobowym. Usunięcie fulerenolu powodowało wzrost mikrolepkości błony w obszarze powierzchniowym do wartości sprzed dodania fulerenolu. Natomiast anizotropia w obszarze hydrofobowym nie zmieniała się po usunięciu fulerenolu z zawiesiny erytrocytów. Wynika z tego, że fulerenol adsorbuje się do zewnętrznych obszarów błony, prawdopodobnie przez słabe wiązania wodorowe. Cząsteczki fulerenolu mimo charakteru hydrofilowego wnikają w głębsze rejony błony erytrocytu. Świadczą o tym wyniki uzyskane przy użyciu sondy DPH, które mówią o wzroście płynności w głębszych obszarach błony (Grebowski i wsp., 2013c).

5. Fulerenol wyraźnie hamował aktywność ATPaz jonozależnych błony plazmatycznej erytrocytu. Po odpłukaniu fulerenolu obserwowano zwiększenie o ok. 10% aktywności Na^+/K^+-ATPazy i Ca^{2+}-ATPazy w stosunku do prób, w których fulerenolu nie odpłukiwano. Natomiast usunięcie fulerenolu nie cofało inhibicji Mg^{2+}-ATPazy (Grebowski i wsp., 2013c).

6. $C_{60}(OH)_{36}$ nieznacznie hamował autohemolizę i wypływ potasu z erytrocytów pod wpływem przedłużonej inkubacji w 37˚C. Dla stężenia fulerenolu 150 mg/L ilość uwolnionego potasu zmniejszyła się o 20% w stosunku do erytrocytów przechowywanych bez fulerenolu (Grebowski i wsp., 2013b).

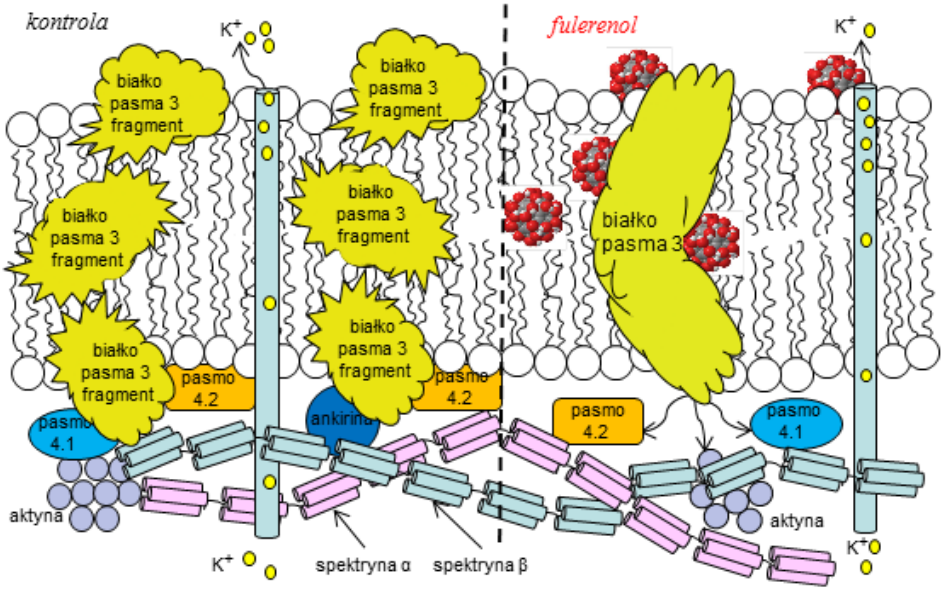
7. Elektroforetyczny rozdział białek błonowych erytrocytów wykazał, że przechowywanie błon erytrocytarnych przez 48 godz. w temp. 37˚C prowadziło do znacznej degradacji białka pasma 3. Fulerenol w stężeniach 50-150 mg/L chronił białko pasma 3 przed degradacją (Grebowski i wsp., 2013b).

8. Przeprowadzone obserwacje mikroskopowe oraz pomiary cytometryczne dla erytrocytów inkubowanych z fulerenolem wykazały niewielkie zmiany w morfologii komórek polegające na tworzeniu się echinocytów. Przechowywanie erytrocytów prowadziło do transformacji echinocytarnej i zlepiania się komórek. Fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$ w nieznacznym stopniu nasilał te zmiany przy stężeniu 150 mg/L (Grebowski i wsp., 2013b).

Podsumowanie i wnioski

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki potwierdzają oddziaływanie fulerenolu na białka transbłonowe cytoszkieletu, a w szczególności na białko pasma 3 oraz ATPazy. Fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$ zmieniał w niewielkim stopniu morfologię komórek, a wiec organizację wewnątrzkomórkową erytrocytów, poprzez asocjację z białkami cytoszkieletu. W pracy wykazano, że $C_{60}(OH)_{36}$ w zakresie wysokich stężeń do 150 mg/L nie wykazywał znaczącego efektu toksycznego wobec erytrocytów. Co więcej z przeprowadzonych badań wynika, że zmiany w morfologii erytrocytów wywołane fulerenolem w wysokich stężeniach (do 150 mg/L) nie prowadzą do zwiększonej hemolizy erytrocytów ani do wycieku potasu, a nawet w niewielkim stopniu im zapobiegają.

Proponowany mechanizm wpływu fulerenolu na białka cytoszkieletu erytrocytów człowieka przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Oddziaływanie fulerenolu z zespołem białek pasma 3 i lokalizacja fulerenolu w podwójnej warstwie lipidowej. Fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$, przez interakcje z zespołem białka pasma 3, nie tylko zapobiega jego degradacji, ale może również wpływać na miejsca wiązania spektryny, białek pasma 4,1 i 4,2 lub aktyny, co prowadzi do zmian w cytoszkielecie, wpływających na morfologię erytrocytów. Źródło: (Grebowski i wsp., 2013)

Wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wskazują, że zmniejszenie liczby wiązań π wraz ze wzrostem liczby grup OH przyłączonych do klatki węglowej C_{60} nie spowodowało znaczących zmian w wartościach stałej szybkości reakcji fulerenolu z rodnikiem $^{\bullet}OH$. Stała szybkości dla reakcji fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z rodnikiem $^{\bullet}OH$ wynosi $2{,}0 \cdot 10^{9}$ dm^3mol^{-1} s^{-1}, i jest porównywalna do stałej szybkości z $C_{60}(OH)_{18}$. Najbardziej

prawdopodobnym mechanizmem reakcji rodnika •OH z fulerenolem jest tworzenie π-kompleksu, który może dysocjować ponownie do reagentów lub ulegać przegrupowaniu do σ-kompleksu. Natomiast, stała szybkości reakcji dla fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z e_{aq}^- wynosi $2.5 \cdot 10^9$ dm^3 mol^{-1} s^{-1} i jest około 5-krotnie większa niż stała szybkości reakcji e_{aq}^- z $C_{60}(OH)_{18}$. Wysoko hydroksylowane fulereny z liczbą grup –OH powyżej 30 mogą okazać się skutecznymi antyoksydantami (Grebowski i wsp., 2014).

Determination of the reaction rate constants of highly hydroxylated fullerene $C_{60}(OH)_{36}$ with water radiolysis products and the mechanism of its effect on human erythrocytes

Abstract

Fullerenols, with the general formula $C_{60}(OH)_n$ (n=2-44), as soluble in water hydroxylated fullerene derivatives, have recently become the object of many studies concerning the possibilities of their application in the biomedical sciences. Fullerenols have a high electron affinity and they can easily bind nucleophilic radicals and substituents (Grebowski et al., 2013a; Krokosz et al., 2014). Literature data indicate that fullerenols have no cytotoxicic effects in the concentration range used for the protection against free radicals (Grebowski et al., 2013a). There are many convincing evidence on the antioxidant properties of water-soluble derivatives of various fullerenes (Kato et al., 2009; Cai et al., 2010; Injac et al., 2013; Grebowski et al., 2013a), however, we still lack the knowledge about the mechanisms of action of these molecules and possible side effects. Hence, there is a necessity of studies concerning the effects of fullerenols on biological membranes to verify their toxicity and the possibility of using these nanoparticles before their therapeutic use in biomedicine becomes possible.

The growing number of papers concerning fullerene derivatives show an increasing interest of researchers in highly-hydroxylated fullerenols (with the number of hydroxyl groups (-OH) more than 30) in terms of their antioxidative properties. It is also related with the fact that the increased hydroxylation of the fullerene molecule contributes to the reduction of its cytotoxicity and increase of solubility in water solutions. Physico-chemical properties of fullerenol depend on the number of attached hydroxyl groups and their location on the surface of the fullerene cage (Guirado-López R, Rincón M, 2006; Grebowski et al., 2013a).

So far, however, it is not clear whether a substantial number of hydroxyl groups attached to the fullerene carbon cage can affect the ability to scavenge reactive oxygen species (ROS). One of the techniques applied to answer to the above question is the method of pulse radiolysis enabling the estimation of the reaction rate constant values of water radiolysis products with fullerenol.

Pulse radiolysis method is a major technique used to determine the reaction rate constants values for either reactive oxygen or nitrogen (Houée-Levin and Bobrowski, 2013; Samuni et al., 2012). The reaction rate constants for reaction with the main products of water radiolysis determined with the use of pulse radiolysis is helpful in anticipating potential antioxidative properties of the compound tested. Primary products of the water radiolysis react with biomolecules causing the formation of secondary products of water radiolysis such as protein radicals, which in turn can damage DNA (Schuessler and Jung, 1989). The proteins react with water radiolysis products, such as e_{aq}^-, H$^\bullet$and $^\bullet$OH, which are characterized by relatively large reaction rate constants of between 10^9-10^{11} dm^3 mol^{-1} s^{-1} (Buxton et al., 1988). The most dangerous water radiolysis product is hydroxyl radical ($^\bullet$OH) causing damage in biomolecules playing many significant physiological functions in the cell. Hydroxyl radical has a very high oxidation potential in a neutral water solutions, $E^0(^\bullet OH/OH^-)$ = 1,8 V (Buxton and Mulazzano, 1999). In addition, there are no defending mechanisms within a cell enabling to remove hydroxyl radicals. Therefore, it can modify virtually all cellular components (DNA, proteins, lipids and carbohydrates) (Gręboswki and Krokosz, 2010).

The rate constant for the reaction of fullerenol with 18 hydroxyl groups - $C_{60}(OH)_{18}$ with the hydroxyl radical ($^\bullet$OH) was determined by Guldi and Asmus (1999) with the use of pulse radiolysis and it was equal to $2.4 \bullet 10^9$ dm^{3}mol^{-1}s^{-1}. The authors suggested that the scavenging of the $^\bullet$OH radicals by fullerenol $C_{60}(OH)_{18}$ occured through the attachment of the $^\bullet$OH radical to the double bonds of fullerene carbon cage. However, the reaction rate constant for the highly hydroxylated fullerenol has not yet been specified as well as it has not been explained whether a substantial number of HO- groups present in the $C_{60}(OH)_x$, x>30, molecules may influence the reaction rate constants with water radiolysis products, with oxidizing ($^\bullet$OH) and reducing (e_{aq}^-) properties. The number of double bonds in the molecule of fullerenol decreases with the subsequent attachment of the hydroxyl groups, therefore it can be expected that the reactivity of fullerenol with radical products of water radiolysis depends on the degree of hydroxylation (Grebowski et al., 2014).

The aim of this PhD thesis was to determine the reaction rate constants of highly hydroxylated fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ with hydrated electron (e_{aq}^-) and the hydroxyl radical ($^\bullet$OH) as well as to estimate the energy of activation of reaction between $C_{60}(OH)_{36}$ and ($^\bullet$OH), and to investigate the interaction between $C_{60}(OH)_{36}$ and plasma membrane of erythrocytes.

The first stage of experiments carried out within the framework of this PhD dissertation was the physicochemical characterization of fullerenol. Highly hydroxylated fullerenol synthesized in the Department of Radiobiology was analyzed with the use of spectroscopic methods such as UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, mass spectroscopy (MALDI-TOF) and elemental analysis. The analysis undertaken confirmed the presence of 36 hydroxyl groups (-OH) attached to the "carbon cage" $C_{60}(OH)_{36}$.

The rate constants for the reactions between $C_{60}(OH)_{36}$ and $^{\bullet}OH$ and e_{aq}^{-} radicals were determined using the method of pulse radiolysis. Irradiation was performed with a linear electron accelerator ELU-6e with the electron beam energy of 6-8 MeV in the cooperation with the Institute of Applied Radiation Chemistry (MITR), Technical University of Lodz.

Interaction of fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ with the plasma membrane of erythrocytes was determined with electrophoretic, spectroscopic and microscopic methods. The following parameters were analyzed: the shape of cells, the level of hemolysis, leakage of K^{+}, aggregation/fragmentation of membrane proteins, the ATPase activity in erythrocyte membrane and the plasma membrane fluidity using fluorescence probes.

Scientific research carried out in this doctoral dissertation was published in three original, thematically coherent papers and supplemented by the review paper. Results were as follows:

1. The reaction rate constant of highly hydroxylated fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ with $^{\bullet}OH$ radical is $2.0 \bullet 10^{9}$ dm^{3} mol^{-1} s^{-1} and is similar to the value obtained by Guldi and Asmus (1999) for fullerenol $C_{60}(OH)_{18}$ (Grebowski et al., 2014).
2. The reaction rate constant of highly hydroxylated fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ with hydrated electron (e_{aq}^{-}) is $2.5 \bullet 10^{9}$ dm^{3} mol^{-1} s^{-1} and is about five times higher than the value for the fullerenol $C_{60}(OH)_{18}$ (Mohan et al., 1998; Grebowski et al., 2014).
3. The energy of activation for the reaction of fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ with $^{\bullet}OH$ radical determined with the Arrhenius equation is 22.7 kJ mol^{-1} (Grebowski et al., 2014).
4. The studies concerning the changes in the structure of plasma membrane treated with fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ demonstrated that the tested compound caused an increase

in the fluidity of human erythrocyte plasma membrane, both in its surface area, as well as hydrophobic area. Washing out fullerenol caused a decrease in the fluidity of membrane in the surface area compared to the untreated membranes. In contrast, anisotropy of the membrane hydrophobic area was not changed after the washing out fullerenol from the erythrocyte suspension. This suggest that fullerenol may adsorb to the outer areas of the membrane, which probably occurs through the weak hydrogen bonds. Despite the hydrophilic nature of the fullerenol nanoparticles, they can easily penetrate the deeper regions of the erythrocyte membrane. This is evidenced by the results obtained for DPH fluorescent probe, which indicated the increase of fluidity in the deeper areas of the membrane (Grebowski et al., 2013c).

5. Fullerenol inhibited the ATPase activity of erythrocyte plasma membrane. The 10% increase of the activity of Na^+/K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase after washing out the fullerenol was observed. However, washing out the fullerenol did not reversed the inhibition of Mg^{2+}-ATPase (Grebowski et al., 2013c).

6. $C_{60}(OH)_{36}$ slightly inhibited the autohemolysis and potassium efflux from erythrocytes under the influence of prolonged incubation at 37˚C. When fullerenol was added at the concentration of 150 mg/L the amount of released potassium reduced by 20% compared to the erythrocytes stored without fullerenol (Grebowski et al., 2013b)

7. Electrophoresis of erythrocyte membrane proteins has shown that the storage of erythrocyte membranes for 48 h at 37˚C resulted in a significant degradation of 3 band protein. Fulerenol at a concentration of 50-150 mg/L protected the 3 band protein against degradation (Grebowski et al., 2013b).

8. Microscopic observations and flow cytometry measurements revealed minor changes in cell morphology of erythrocytes involving the formation of echinocytes. Storage of erythrocytes led to the transformation into echinocytes and agglutination of cells. Fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$ slightly potentiated these changes at a concentration of 150 mg/L (Grebowski et al., 2013b).

Summary and conclusions

Obtained results confirm the influence of fullerenol on transmembrane proteins of the cytoskeleton of human erythrocytes, particularly the protein 3 band and ATPase. The results show that changes in the morphology of red blood cells caused by high concentrations of fullerenol (up to 150mg/L) did not lead to increased red blood cell hemolysis or the leakage of potassium. It was shown that $C_{60}(OH)_{36}$ at high concentrations had no significant toxic effect toward the erythrocytes. Fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$ slightly altered the cellular morphology of erythrocytes, and thus, the intracellular organization of erythrocytes, through the association with cytoskeletal proteins. The proposed mechanism of fullerenol influence on human erythrocyte cytoskeletal proteins is presented in Fig. 1

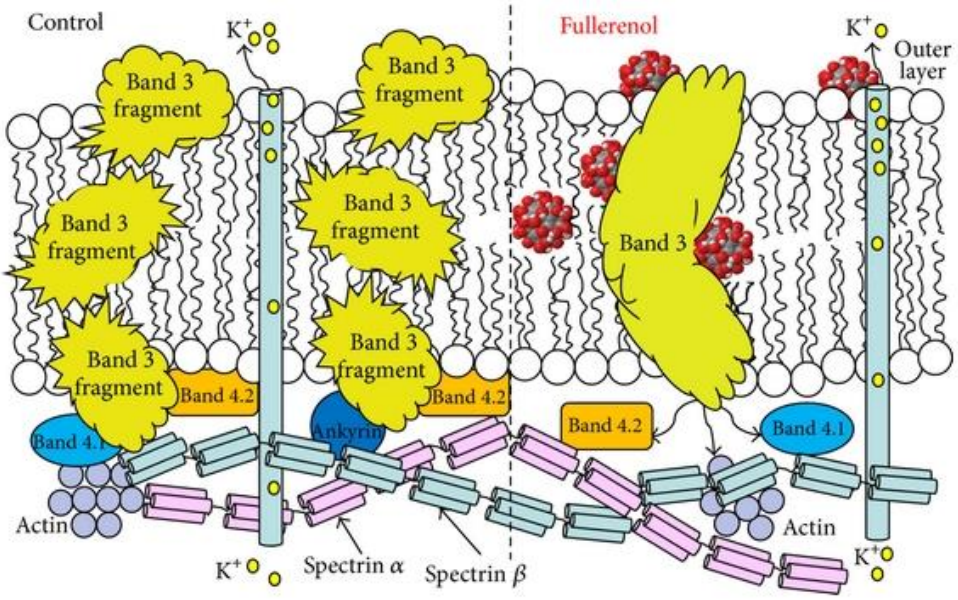


Fig. 1. Fullerenol interactions with the band 3 protein and the location of fullerenol in the lipid bilayer. Fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$, by associating with band 3 protein, does not only prevent its degradation, but can also influence the binding sites of spectrin, band 4.1 and 4.2 proteins or actin, leading to changes in the cytoskeleton affecting erythrocyte morphology. Adapted from: (Grebowski et al., 2013b)

The results obtained in this PhD thesis suggest that the decreased number of π bonds, along with an increased number of OH groups attached to the carbon cage of fullerenol, did not result in any significant changes in the rate constant for the reaction with hydroxyl radicals. The rate constant for the reaction of fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ with $^{\bullet}OH$ radical was $2.0 \bullet 10^{9}$ dm^3 mol^{-1} s^{-1}, which was comparable to the rate constant for $C_{60}(OH)_{18}$. The

most probable mechanism of the reaction of •OH with fullerenol was via the formation of a π-complex that could dissociate to reform the reactants in competition with the rearrangement to the σ-complex.

The rate constant determined for the reaction of $C_{60}(OH)_{36}$ with e_{aq}^- was $2.5 \bullet 10^9$ $dm^3mol^{-1}s^{-1}$ and it was approximately 5-fold greater than the rate constant for the reaction with $C_{60}(OH)_{18}$. Highly hydroxylated fullerenes with the number of attached -OH groups more than 30 may be effective antioxidants (Grebowski et al., 2014).