

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



**Яковлев Руслан Юрьевич**

**ДЕТОНАЦИОННЫЙ НАНОАЛМАЗ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НОСИТЕЛЬ  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

02.00.04 – физическая химия

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., проф. Лисичкин Георгий Васильевич,

Заслуженный изобретатель РФ,

д.б.н., проф. Леонидов Николай Борисович

Рязань – 2016

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	18
1.1. Системы доставки лекарственных веществ.....	18
1.1.1. Носители в системах доставки лекарственных веществ.....	18
1.1.2. Углеродные наночастицы в системах доставки лекарственных веществ.....	19
1.2. Общие сведения об алмазе.....	22
1.2.1. Сведения о нанодиамазах.....	22
1.3. Получение и выделение ДНА.....	25
1.4. Химический состав ДНА.....	26
1.5. Химия поверхности ДНА.....	27
1.6. Химическое модифицирование поверхности ДНА.....	28
1.6.1. Восстановление ДНА.....	29
1.6.2. Окисление ДНА.....	29
1.6.3. Галогенирование ДНА.....	31
1.6.4. Амнирование ДНА.....	32
1.7. Иммуобилизация БАВ на поверхности ДНА.....	32
1.7.1. Адсорбционный метод.....	32
1.7.2. Ковалентная прививка.....	37
1.7.2.1 Ковалентная прививка глицина на углеродных наночастицах.....	40
1.8. Деагрегация порошков ДНА и приготовление гидрозолей.....	43
1.8.1. Спектрофотометрия суспензий ДНА.....	46
1.8.2. Определение концентрации гидрозолей ДНА.....	46
1.9. Визуализация нанодиамаза <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....	47
1.10. Биораспределение ДНА в организме.....	50
1.11. Биологическая активность и токсичность ДНА.....	52
1.12. Применение ДНА в биомедицинских приложениях.....	55
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	57
2.1. Объекты исследования.....	57
2.1.1. Детонационные нанодиамазы.....	57
2.1.2. Иммуобилизуемые соединения.....	57
2.1.3. Экспериментальные животные.....	59
2.2. Физико-химические методы исследования и приборы.....	60
2.3. Методики функционализации поверхности ДНА.....	63

2.3.1 Гидрирование .....	63
2.3.2 Окисление.....	63
2.3.3 Гидроксилирование .....	65
2.3.4. Галогенирование.....	66
2.2.4.1. Фторирование.....	66
2.3.4.2. Хлорирование.....	66
2.3.5. Аминирование.....	66
2.4. Ковалентная прививка соединений на поверхность ДНА .....	67
2.4.1. Этилен- и гексаметилендиамин.....	67
2.4.2. Трийодбензиловый спирт .....	67
2.4.3. Глицин .....	68
2.4.4. Цистеин.....	68
2.4.5. Янтарная кислота.....	69
2.4.6. Амикацин.....	69
2.4.7. Протеолитические ферменты .....	69
2.4.8. Пирофосфатаза.....	70
2.5. Мечение наноалмаза тритием .....	71
2.6. Деагрегация порошков ДНА и получение гидрозолей ДНА.....	72
2.6.1. Определение концентрации гидрозолей ДНА .....	72
2.7. Спектрофотометрия и люминесценция гидрозолей ДНА.....	73
2.8. Изучение трансмембранной проницаемости ДНА <i>in vitro</i> .....	74
2.8.1. Диффузия через модельную синтетическую мембрану – целлофан .....	74
2.8.2. Диффузия через биомембрану.....	75
2.9. Изучение биораспределения ДНА с рентгеноконтрастной меткой .....	76
2.9.1. Изучение биораспределения ДНА <i>in vivo</i> методом РКТ .....	76
2.9.2. Изучение биораспределения ДНА <i>ex vivo</i> методом ИСП-МС <sup>3</sup> , .....	77
2.10. Изучение <i>ex vivo</i> биораспределения ДНА с тритиевой меткой' .....	78
2.11. Изучение специфической активности ДНА <i>in vitro</i> .....	78
2.11.1. Биологическая активность ДНА в тесте люминесцентных бактерий .....	78
2.11.2. Антиоксидантная активность .....	79
2.11.3. Активность и стабильность иммобилизованных на ДНА ферментов.....	80
2.11.3.1. Активность протеолитических ферментов.....	80
2.11.3.2. Стабильность иммобилизованных на ДНА ферментов .....	82
2.11.3.3. Активность пирофосфатазы.....	83
2.12. Проникновение ДНА в клетки .....	84

2.13. Митохондриальная активность ДНА .....	86
2.14. Антибактериальная активность конъюгата ДНА-амикацин.....	86
2.15. Методики <i>in vivo</i> .....	87
2.15.1. Экспериментальные животные .....	87
2.15.2. Острая токсичность ДНА.....	89
2.15.3. Побочные эффекты ДНА .....	89
2.15.4. Антигипоксическая активность конъюгата ДНА-глицин .....	90
2.15.5. Противоинсультная активность конъюгата ДНА-глицин .....	91
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	92
ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	92
3.1. Физико-химические свойства промышленных ДНА.....	92
3.1.1. Примеси в ДНА.....	101
3.1.1. Биологическая активность промышленных ДНА .....	109
3.2. Унифицирование физико-химических свойств ДНА .....	110
3.2.1. Очистка ДНА .....	111
3.2.1.1. Очистка от примесей серы и нитрат-аниона .....	111
3.2.1.2. Очистка ДНА от примесей железа .....	112
3.2.2. Деагрегация ДНА .....	112
3.3. Характеристики модифицированных ДНА .....	116
3.3.1. Гидрированный ДНА .....	116
3.3.2. Окисленный ДНА .....	120
3.3.3. Определение функциональных групп на поверхности модифицированных ДНА .....	131
3.3.3.1. Кислотные группы .....	131
3.3.3.2. Аминогруппы .....	131
3.3.5. Получение [ <sup>3</sup> H]-ДНА.....	132
3.4. Гидрозоли ДНА .....	134
3.4.1. Деагрегация .....	134
3.4.2. Количественное определение ДНА в гидрозоле .....	135
3.4.2.1. Спектрофотометрическое определение .....	135
3.4.2.2. Флуориметрическое определение .....	139
3.4.3. Стерилизация гидрозолей ДНА.....	142
3.5. Иммунизация соединений на поверхности ДНА .....	143
3.5.1. Адсорбционная иммунизация амикацина .....	143
3.5.2. Прививка этилен- и гексаметилендиамина к поверхности ДНА .....	145
3.5.3. Синтез конъюгатов ДНА с БАВ методом ковалентной прививки .....	148

3.5.3.1. Конъюгат ДНА-амикацин .....	148
3.5.3.2. Конъюгат ДНА-янтарной кислоты.....	150
3.5.3.3. Конъюгат ДНА-цистеин.....	152
3.5.3.4. Конъюгаты ДНА с протеолитическими ферментами.....	154
3.5.3.5. Конъюгат ДНА-пирофосфатаза.....	156
3.5.3.6. Конъюгат ДНА-глицин.....	159
3.5.4. Особенности взаимодействия глицина с поверхностью ДНА .....	161
3.6. Способы визуализации ДНА.....	165
3.6.1. Синтез наноалмаза с тритиевой меткой .....	166
3.6.2. Синтез конъюгата ДНА с триодбензиловым спиртом.....	166
3.6.3. Синтез ДНА-СООН .....	166
3.7. Трансмембранная проницаемость ДНА <i>in vitro</i> .....	167
3.8. Антиоксидантная активность ДНА .....	171
3.8.1. Влияние ДНА на интенсивность перекисного окисления липидов .....	171
3.8.2. Изучение антирадикальной активности .....	172
3.9. Активность и стабильность систем ДНА-фермент.....	173
3.9.1. Активность иммобилизованных ферментов .....	173
3.9.2. Стабильность иммобилизованных ферментов .....	174
3.9.2.1. Термостабильность трипсина и устойчивость при различных рН.....	174
3.9.2.2. Стабильность папаина в водно-спиртовых средах .....	175
3.9.2.1. Термостабильность химотрипсина и стабильность при хранении .....	176
3.10. Биораспределение ДНА.....	178
3.10.1. ДНА с рентгеноконтрастной меткой <i>in vivo</i> .....	178
3.10.2. ДНА с рентгеноконтрастной меткой <i>ex vivo</i> .....	178
3.10.3. ДНА с тритиевой меткой <i>ex vivo</i> .....	180
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....	186
4.1. Влияние химии поверхности ДНА на динамику проникновения в клетку.....	186
4.2. Определение острой токсичности ДНА (крысы) .....	186
4.3. Изучение побочных действий ДНА (мыши) .....	186
4.3. Митохондриальная активность ДНА .....	187
4.4. Антибактериальная активность конъюгата ДНА-амикацин .....	188
4.5. Специфическая активность конъюгата ДНА-глицин <i>in vivo</i> .....	189
4.5.1. Антигипоксическая активность .....	189
4.5.2. Противоинсультная активность .....	189
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	190

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....	197
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	199

## Приложение

### МЕТОДИКИ И РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ (дополнение)

РАЗДЕЛ 1. ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	229
1.1. Гамма-активационный анализ ДНА.....	229
РАЗДЕЛ 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ.....	235
2.1. Работа с экспериментальными животными.....	235
2.2. Влияние химии поверхности ДНА на динамику проникновения в клетку.....	236
2.3. Митохондриальная активность модифицированных ДНА.....	241
2.4. Антибактериальная активность конъюгата ДНА-амикацин.....	243
2.5. Результаты изучения побочных действий ДНА (мышь).....	244
2.6. Определение острой токсичности конъюгата ДНА-глицин и его компонентов.....	248
2.6.1. ДНА.....	248
2.6.2. Глицин.....	249
2.6.3. Конъюгат ДНА-глицин.....	250
2.7. Расшифровка томограмм кролика после введения ДНА.....	252
2.8. Специфическая активность конъюгата ДНА-глицин.....	256
2.8.1. Антигипоксическая активность.....	257
2.8.2. Противоинсультная активность.....	259

## Список сокращений

- ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия;
- АМАБАВ – амплификация модифицирующей активности БАВ;
- АРМЭ – адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция;
- АФБК – аминифенилборная кислота;
- АШ – алмазная «шихта»;
- БАВ – биологически активное вещество;
- БСА – бычий сывороточный альбумина;
- ВВ - взрывчатые вещества;
- ГАА – гамма-активационный анализ;
- ДНА – детонационный наноалмаз;
- ДНА-(R) – детонационный наноалмаз с привитым 3,4,6-трийодфениламетанолом;
- ДРС – динамическое рассеяние света;
- ЖСС – жидкостная сцинтилляционная спектрометрия;
- ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой;
- ИСП-АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия с с индуктивно-связанной плазмой;
- КФГ – кислотные функциональные группы;
- ЛВ – лекарственное вещество;
- ЛС – лекарственное средство;
- ЛФ – лекарственная форма;
- МБК - минимальная бактерицидная концентрация;
- МТАТ – метод термической активации трития;
- МТТ анализ – анализ по оценке жизнеспособности клеток с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ), основанный на определении активности дегидрогеназы митохондрий;
- МЭП – молекулярный электростатический потенциал;
- НА – наноалмаз;
- НАА – нейтронно-активационный анализ;
- ОКР – область когерентного рассеяния;
- ПМР – протонный магнитный резонанс;
- РРаза – неорганическая пирофосфатаза;
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;
- РФА – рентгенофазовый анализ;
- РФЛА – рентгенофлюоресцентный анализ;

РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

ТГА – термогравиметрический анализ;

УДА – ультрадисперсный алмаз;

УНТ – углеродные нанотрубки;

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания;

УФС – ультрафиолетовая спектрофотометрия;

ФС – фармакопейная статья;

ФГ – функциональные группы (химические);

ЦФ – центрифугирование;

ЭА – элементный анализ;

EDC - 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид;

NHS - N- гидроксисукцинимид;

(R) - 3,4,6-трийодфениламетанол;

TNBS - 2,4,6-тринитробензолсульфоокислота.

TRP - трифенилфосфоний

## ВВЕДЕНИЕ

*АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.* Нанотехнологии в настоящее время являются одним из наиболее перспективных направлений развития современной науки, техники и медицины. При переходе в наноразмерную область значительную роль в свойствах вещества начинает играть состояние поверхности наночастиц материала. Развитие этих представлений сложилось в новое направление науки – наномедицину, в которой одной из главных задач является создание систем доставки лекарственных веществ (ЛВ). Получение системы носитель-лекарственное вещество призвано обеспечить направленный (адресный) транспорт последнего в очаг развития патологического процесса. Считается, что повышение локальной концентрации ЛВ в органе-мишени позволяет повысить эффективность его действия за счет уменьшения терапевтической дозы, снижения токсических и побочных процессов. В настоящее время разработки систем доставки ЛВ ведутся по двум направлениям: пассивный направленный транспорт (облегченное преодоление естественных биобарьеров) и специфическая доставка («узнавание» патологической ткани или органа).

Для создания систем доставки ЛВ предложены большое число наноносителей, из которых наиболее перспективными выделяют углеродные носители – фуллерены, нанотрубки, графен. В последние годы такими стали рассматриваться и детонационные наноалмазы (ДНА) [1, 2, 3].

ДНА в промышленном масштабе получают детонацией взрывчатых веществ (ВВ) при утилизации боеприпасов. ДНА представляют собой ультрадисперсные углеродные материалы со средним размером частиц 5 нм, которые состоят из алмазного ядра, нарушенной углеродной оболочки и поверхностного слоя, образованного различными функциональными группами (ФГ). ДНА уже нашли применение в создании гальванических покрытий, полимерных композициях, смазочных материалах, полировальных пастах, а также в системах магнитной записи [4, 5]. За счет ФГ поверхность ДНА можно направленно модифицировать и прививать на нее различные соединения, в том числе, биологически активные и лекарственные.

В последние годы ДНА стали привлекать пристальное внимание исследователей во всех развитых странах в качестве эффективных наноносителей в системах доставки биологически активных веществ (БАВ) и ЛВ [6]. Это связано с оптимальной совокупностью их физико-химических и биофармацевтических свойств. При этом, ДНА, как правило, не обладают канцерогенными или мутагенными свойствами, нетоксичны и биосовместимы. Высказано мнение, что ДНА может являться «идеальным наноносителем для создания систем доставки» ЛВ [7].

Основными проблемами углеродных наночастиц, в том числе и ДНА, в создании систем доставки ЛВ на их основе являются сложность стандартизации, унификации и визуализации в

медико-биологических экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Изучение абсорбции ДНА в организме, их фармакокинетики и фармакодинамики невозможно без разработки надёжных и точных методов количественного и качественного определения ДНА в гидрозолях, биологических жидкостях, тканях, органах и целостном организме. Решение этих задач является крайне актуальным не только для наномедицины, но и химии, нанотехнологии и биофармации и позволит использовать ДНА в качестве эффективного носителя БАВ и ЛВ.

Диссертационная работа выполнялась на основании Договоров о научном сотрудничестве между РязГМУ им. акад. И.П.Павлова и МГУ им. М.В.Ломоносова (от 11.03.2010 г. и 11.03.2015 г.), Договора о международном научном сотрудничестве между РязГМУ им. акад. И.П.Павлова и Университетом им. Франсуа Рабле, г. Тур, Франция (от 31.03.2009 г.), планов НИР РязГМУ им. акад. И.П. Павлова (№ гос.регистрации 01200602290) и НИР Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (№ гос.регистрации 01201165050). Работа поддержана грантами РФФИ: № 11-03-00543 «Наноалмаз детонационного синтеза как носитель биологически активных соединений и лекарственных веществ», № 12-03-09206 «Участие в 2012 MRS Spring Meeting, International symposium “Nanodiamond particles and related materials – from basic science to applications», № 13-08-00647 «Конструирование гибридных функциональных материалов на основе высокодисперсных неорганических матриц (детонационный наноалмаз, гидроксилалатит, наносеребро)», № 14-03-00423 «Полифункциональные материалы на основе детонационного наноалмаза: синтез и свойства», № 15-04-06795 «Исследование физико-химических и физиологических свойств протеолитических ферментов и их ингибиторов, иммобилизованных на наноалмазах», № 16-08-01156 «Конструирование и сборка гибридных функциональных материалов на основе детонационного наноалмаза и лекарственных веществ»; а также грантом Института международного образования по Программе Фулбрайта для выпускников ВУЗов и аспирантов 2011 года для участия в работе 1-ой Всероссийской летней школы Фулбрайта в области точных наук и технологий «Наноматериалы и нанотехнологии» (Казань); грантами региональных конкурсов Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «У.М.Н.И.К. - 2011» и «У.М.Н.И.К. на СТАРТ» (2015 г.).

**ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Целью данной работы является установление роли химических, физико-химических и биофармацевтических факторов применения ДНА как перспективного носителя для систем доставки БАВ и ЛВ.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- провести углубленные исследования промышленно выпускаемых ДНА, изучить их примесный состав, разработать способы очистки от технологических примесей, методы стандартизации и унифицирования;

- оптимизировать методы химического модифицирования поверхности ДНА для повышения эффективности иммобилизации лекарственных и биологически активных веществ;
- разработать способы иммобилизации диагностических соединений, БАВ и ЛВ на поверхности ДНА;
- разработать способы дезагрегации частиц ДНА, способы приготовления их стабильных гидрозолей и стерилизации;
- разработать способы визуализации и количественного определения ДНА в воде, биологических жидкостях, тканях и органах;
- изучить диффузию частиц ДНА через модельную и биологическую мембраны;
- изучить методами электронной микроскопии проникновение частиц ДНА и его конъюгатов с лекарственными веществами в клетку;
- изучить на моделях *in vitro* и *in vivo* токсическое действие ДНА и его конъюгатов с ЛВ;
- изучить методами рентгеновской компьютерной томографии (РКТ), индуктивно-связанной плазмы с масс-спектрометрией (ИСП-МС) и жидкостной сцинтилляционной спектрометрии (ЖСС) абсорбцию (биораспределение) ДНА в организме экспериментальных животных;
- изучить на химических и биологических моделях *in vitro* и *in vivo* специфическую активность ДНА и его конъюгатов с ЛВ.

#### НАУЧНАЯ НОВИЗНА

1) Методами ПЭМ, ДРС, ДСК, ИКС и РФЭС выявлена физико-химическая неэквивалентность, методами ИСП-МС и ГАА - примесная (химическая) неэквивалентность и методом измерения бактериальной люминесценции - биологическая неэквивалентность промышленных образцов ДНА разных марок различных фирм-производителей. Разработан способ унифицирования и стандартизации поверхности ДНА путем его высокотемпературного гидрирования. Разработаны способы кислотно-щелочной очистки ДНА от примесей железа, серы, нитрат-анионов.

2) Разработан способ дезагрегации (до 10-15 нм) и получения стабильных (более 1 года) гидрозолей ДНА с помощью комплексного подхода, включающего химическое модифицирование, ультразвуковую обработку и центрифугирование. Разработан способ определения концентрации ДНА в гидрозолях с помощью спектрофотометрии и флуориметрии в диапазонах 4-1000 и 0,5-117 мкг/мл, соответственно.

3) Оптимизированы методики химического модифицирования поверхности ДНА (гидрирования, хлорирования, окисления) для повышения эффективности иммобилизации лекарственных и биологически активных веществ.

4) Синтезированы конъюгаты ДНА с лекарственными и биологически активными веществами: аминокислотами глицином и цистеином, противотуберкулезным антибиотиком

амикацином, интермедиатом цикла Кребса янтарной кислотой, а также с ферментами (трипсин, химотрипсин, папаин, неорганическая пирофосфатаза). В определенных диапазонах  $pH$  и температуры обнаружено повышение стабильности ферментов при их иммобилизации на ДНА.

5) Разработан способ визуализации *ex vivo* модифицированных ДНА с йодной меткой (трийодбензиловый спирт) на основе ИСП-МС анализа. Впервые синтезирован ДНА с тритиевой меткой и применен для визуализации частиц *ex vivo* с помощью метода жидкостной сцинтилляционной спектроскопии (ЖСС).

6) Выявлены закономерности диффузии ДНА на модельной и биомембране (вывернутой кишке крысы) от размера агрегатов и приложения внешней ультразвуковой обработки. Коэффициенты диффузии находятся в диапазоне  $(0,5-1) \cdot 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/с. Обнаружен симбатный характер прохождения частиц ДНА через биомембрану.

7) Впервые показано, что динамика проникновения ДНА в клетки зависит от вида иммобилизованного на нем ЛВ. Показано, что ДНА проникают в клетки уже через 15 мин инкубации, накапливаются в клетках в виде цепочечных агрегатов, находятся в цитозоле без мембраны и не оказывают токсического действия на структурные элементы клетки.

8) Впервые на трех видах экспериментальных животных (мыши, крысы, кролики) при разных путях введения изучено биораспределение ДНА в течение 6 месяцев с использованием нескольких методов визуализации. Установлено, что ДНА способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, имеют максимальное накопление в легких и постепенно выводятся из организма. Определены значения LD<sub>50</sub> ДНА и конъюгата ДНА-глицин (крысы, внутрибрюшинное введение), составившие 3,4 и 2,7 г/кг, соответственно, что позволяет отнести данные вещества к IV классу малотоксичных веществ.

9) На штаммах *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* показано снижение минимальной бактерицидной концентрации конъюгата ДНА-амикацин в 2-4 раза по сравнению с амикацином. Показано, что ДНА и конъюгат ДНА-глицин в дозах 20-100 мг/мл обладают дозозависимой антирадикальной активностью, при этом конъюгат ДНА-глицин ингибирует хемилюминесценцию в системе 3-оксипиридин-пероксидаза-пероксид водород (до 25,75 раза), превосходя по этому показателю нативный глицин и лекарственный препарат сравнения – мексидол.

10) Впервые выявлены и изучены антиоксидантная, антигипоксическая и противоинсультная активность синтезированного конъюгата ДНА-глицин в сравнении с нативным глицином, ДНА и лекарственными препаратами сравнения. Показано, что конъюгат ДНА-глицин в каждом случае при меньшей дозировке превосходит действие глицина, а, в ряде случаев, проявляет новый вид фармакологической активности, не выявленной у глицина. Обнаружено явление изменения интенсивности и спектра специфической активности

лекарственного вещества при его мобилизации на поверхности наночастицы (ДНА) – рабочее название «эффект амплификации модифицирующей активности БАВ». Предложена гипотеза о механизме этого явления за счет образования супрамолекулярного комплекса при межмолекулярном взаимодействии иммобилизуемого ЛВ с поверхностью ДНА.

Научная новизна и приоритет исследований подтверждены 22 патентами, в том числе, 19 патентами РФ, 2 Европатентами и 1 патентом США.

#### *ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ*

Полученные в работе данные могут быть использованы для синтеза конъюгатов ДНА-ЛВ и визуализации ДНА в организме *ex vivo* с применением методов ИСП-МС и ЖСС, позволяющие количественно определять концентрацию ДНА во всех органах и тканях экспериментального животного.

На основании проведенных исследований разработаны и запатентованы новые способы, вещества и лекарственные средства:

- антибактериальное средство и способ его получения (патент РФ № 2476215, 2013);
- антигипоксикант и способ его получения (патент РФ № 2506074, 2014);
- седативное средство и способ его получения (патент РФ № 2506075, 2014);
- противосудорожное средство и способ его получения (патент РФ № 2508098, 2014);
- анксиолитик и способ его получения (патент РФ № 2519755, 2014);
- антидепрессант и способ его получения (патент РФ № 2519759, 2014);
- антиоксидант и способ его получения (патент РФ № 2519760, 2014);
- антипсихотическое средство и способ его получения (патент РФ № 2519761, 2014);
- средство, обладающее противоишемным действием, и способ его получения (патент РФ № 2521404, 2014);
- способ количественного определения углеродных наноструктур в биологических образцах и их распределения в организме (патент РФ № 2528096, 2014);
- способ селективной доочистки наноалмаза (патент РФ № 2506095, 2014);
- способ определения биологической неэквивалентности наноалмазов (патент РФ № 2538611, 2015);
- меченые тритием наноалмазы и способ их получения (патент РФ № 2538862, 2015);
- конъюгат наноалмаза с пирофосфатазой и способ его получения (патент РФ № 2542411, 2015);
- способ количественной оценки химически связанного органического вещества с наноалмазом (патент РФ № 2555350, 2015);
- система доставки биологически активных веществ в организм и способ ее получения (патент РФ № 2560697, 2015);
- конъюгат наноалмаза с глицином и способ его получения (патент РФ № 2560700, 2015);

- средство для лечения и профилактики нарушений сна (патент РФ № 2566713, 2015);
- средство для лечения и профилактики алкоголизма (патент РФ № 2574001, 2016).

### *ВНЕДРЕНИЕ*

Результаты диссертационной работы внедрены:

- в научно-производственную деятельность ФГУП «СКТБ «Технолог» (г. Санкт-Петербург) как способ доочистки наноалмазов от нитрат-анионов и серосодержащих соединений, а также как способ контроля за содержанием этих примесей в промышленных партиях ДНА (Акт о внедрении от 12.04. 2016);
- в учебный и образовательный процесс кафедры фармацевтической технологии РязГМУ им. И.П.Павлова (Акт внедрения от 23.03.2016);
- издано и утверждено с грифом УМС ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России учебно-методическое пособие «Наноалмазы в фармации и медицине».

### ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Заключается в анализе научной литературы, планировании, подготовке и выполнении экспериментальных исследований, обсуждении полученных результатов и оформлении их в виде научных публикаций и патентных заявок, обеспечении условий для практического применения этих результатов, участие во всех биологических и фармакологических исследованиях.

### ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

- доказательство физико-химической и биологической неэквивалентности промышленных марок ДНА компаний–производителей «PlasmaChem» (ФРГ), «Adamas nanotechnologies» (США), ЗАО «Алмазный центр» (РФ);
- методики эффективной очистки промышленных марок ДНА от примесей железа, серы и нитрат-анионов;
- использование высокотемпературного гидрирования для унифицирования поверхности промышленных марок ДНА;
- обнаружение повышения устойчивости гидрозолей ДНА с размерами частиц от 15 до 100 нм при использовании комплексного подхода, включающего химическое модифицирование, ультразвуковую обработку и центрифугирование;
- способ определения концентрации ДНА в гидрозолях с помощью методов спектрофотометрии и флуориметрии в диапазонах 4-1000 и 0,5-117 мкг/мл, соответственно;
- результаты исследований по оптимизации прививки на поверхность ДНА биологически активных и/или лекарственных веществ, имеющих  $-NH_2$ ,  $-COOH$  или  $-SH$  функциональные группы;

- методика визуализация ДНА в организме экспериментальных животных *ex vivo* с помощью йодной метки (привитый трийодбензиловый спирт) или тритиевой метки методами ИСП-МС и ЖСС, соответственно;
- закономерности диффузии ДНА через модельную и биомембрану;
- результаты исследования динамики проникновения ДНА в клетки, биораспределение ДНА в организме и его выведение;
- результаты исследования острой токсичности и побочного действия ДНА и конъюгата ДНА-глицин (крысы, внутрибрюшинное введение);
- повышение бактерицидной активности конъюгата ДНА-амикацин по сравнению с амикацином на штаммах *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*;
- выявление высокой антирадикальной, антигипоксической и противоинсультной активности конъюгата ДНА-глицин.

#### СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Степень достоверности результатов исследования обусловлена тем, что для экспериментальных работ результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования, выводы работы согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации, установлено совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике.

*АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.* Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждались на конференциях, симпозиумах, съездах:

*международных:* Int. Workshop on Science and Application of Nanoscale Diamond Materials (Zakopane, Poland, 2010); Int. Symposium «Modern problems of surface chemistry and physics» (Kyiv, Ukraine, 2010); Mediterranean – East-Europe Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed (Uzhgorod, Ukraine, 2011); Int. Conference Advanced Carbon Nanostructures (St. Petersburg, 2011; 2013; 2015); MRS Spring Meeting & Exhibit Symposium (San Francisco, USA, 2012); Int. Conference Diamond and Carbon Materials (Granada, Spain, 2012; Riva del Garda, Italy, 2013); 12<sup>th</sup> Int. Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014) (Moscow, 2014); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва; 2010-2012); 12-я Международная научно-практическая конференция «Прорывные направления в науке, технике и медицине, системный кризис, вовлечение молодежи в научно-технический прогресс» (8-ые Фёдоровские чтения) (Москва, 2011); Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новый свет, Крым, 2011); 7-я Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы нового поколения» (Иваново, 2012);

Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2013); 4-я Международная научная конференция «Наноструктурные материалы-2014 (НАНО-2014) Беларусь-Россия-Украина» (Минск, 2014);

*российских:* Всероссийская конференция (с международным участием) «Химия поверхности и нанотехнология» (Хилово, 2009; 2012); Научно-практическая конференция «Фармацевтическая наука и практика: достижение и перспективы» (Кемерово, 2009); Ежегодная научная конференция РязГМУ (Рязань, 2009-2013); Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2010; 2013); Всероссийская конференция молодых ученых, специалистов, аспирантов и студентов «Инновации в химии: достижения и перспективы» (Москва, 2010); Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых учёных (с международным участием) «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2010); Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2010); 7-й Всероссийский форум «Здоровье нации – основа процветания России» (Москва, 2011); 19-й Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Волгоград, 2011); Всероссийская выставка научно-технического творчества молодежи (Москва, 2011); Выставка инновационных проектов, посвященная 300-летию со дня рождения М.В.Ломоносова (МГУ, Москва, 2011); Всероссийская летняя школа Фулбрайта в области точных наук и технологий «Нanomатериалы и нанотехнологии» (Казань, 2011); конкурс «УМНИК» (Рязань, 2011); Научно-практическая конференция с международным участием «Испытание «Растворение» в фармацевтической практике. Современные подходы, концепции и биофармацевтические аспекты» (Москва, 2011); Всероссийская молодежная научная школа «Биоматериалы и нанобиоматериалы: Актуальные проблемы и вопросы безопасности» (Казань, 2012); Всероссийская молодежная конференция «Химия поверхности и нанотехнология» в рамках Фестиваля науки» (Казань, 2012); Научная конференция «Биофармация – 50 лет в пути. Развитие, перспективы, проблемы» (Москва, 2012); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Здравоохранение: образование, наука, инновации» (Рязань, 2013); Второй съезд аналитиков России (Москва, 2013); Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития научного знания в XXI в.» (Тамбов, 2014); Межрегиональная научная конференция РязГМУ (с международным участием) (Рязань, 2014); 8-й Конкурс проектов молодых ученых при Международной выставке химической промышленности и науки «Химия+» (Москва, 2014); Общественный коллоквиум «Сладковские чтения» (ИНЭОС РАН, Москва, 2014); Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2015); Всероссийская научная конференция

студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2015), Ломоносовские чтения (Москва, 2016).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По результатам работы опубликовано 15 статей в рецензируемых журналах, в том числе 12 статей в журналах входящих в перечень ВАК РФ, 50 тезисов докладов, 1 учебно-методическое пособие и получено 22 патента, в том числе, 19 патентов РФ, 2 Европатента и 1 патент США.

#### **Структура диссертации.**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов и выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 227 страницах машинописного текста, включает 42 таблицы и 90 рисунков, имеет приложение объемом 40 страниц. Список цитируемой литературы содержит 390 наименований.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Системы доставки лекарственных веществ

В 1959 г. будущий нобелевский лауреат Р. Фейнман прочитал лекцию, в которой указал на особые свойства материалов и устройств на атомном и молекулярном уровне [8]. Эти представления стали основой нового научного направления – нанотехнологии (термин ввел Норио Танигучи в 1974 г. [9] и независимо от него в 1986 г. Эрик Дрекслер [10]), или нанонауки [11].

В настоящее время под термином «нанотехнологии» понимают «создание и использование материалов, устройств и систем, структура которых регулируется в нанометровом масштабе, т.е. в диапазоне размеров атомов, молекул и надмолекулярных образований» [12]. Развитие этих исследований применительно к БАВ и ЛВ привело к созданию новых направлений в химии, медицине и фармации – нанохимии, наномедицины и фармацевтическим нанотехнологиям [13, 14].

Одной из основных целей нанонауки является создание на основе наночастиц систем доставки ЛВ [13]. Доставка ЛВ обычно предполагает направленный транспорт лекарственного средства (ЛС) в заданную мишень – область организма, органа, клетки или клеточную органеллу. Наночастицы позволяют повысить биодоступность ЛС и снизить их токсичность [15]. Важнейшим содержанием фармацевтических нанотехнологий является открытие, изучение и применение наночастиц как средств доставки ЛВ, и как новой лекарственной формы (ЛФ) [16].

#### 1.1.1. Носители в системах доставки лекарственных веществ

К настоящему времени в литературе описано более 400 видов наночастиц, из которых наиболее изученными являются липосомы, полимерные наночастицы, нанокристаллы, частицы металлов, мицеллы, эмульсии, дендримеры, белки, конъюгаты, ДНК и др. [17]. Условно все носители ЛВ в системах доставки можно разделить на три группы: нанокапсулы (наноконтейнеры) – ЛВ инкапсулировано в частицу; наносферы – ЛВ равномерно распределено в матрице; наночастицы – ЛВ находится на поверхности. В качестве примера нанокапсул можно привести различные виды липосом, мицеллы, углеродные нанотрубки (УНТ). Наносферы, в основном, представлены полимерными наночастицами, твердыми липидами, также пористыми полыми наночастицами  $\text{SiO}_2$  [18]. Наноносителями, где ЛВ находится на поверхности, являются различные нанокристаллы, частицы металлов, графен и его производные, фуллерены. Однако необходимо отметить, что при изменении механизма образования наночастиц и способа получения систем доставки ЛВ наноносители могут переходить из одной группы в другую.

Например, применяя липиды при использовании метода инверсии фазы, можно вместо наносфер получить нанокапсулы [19].

Исходя из многообразия наночастиц, используемых в качестве носителя в системах доставки ЛВ, становится очевидным, что все они имеют свои плюсы и минусы, которые могут инвертироваться под конкретное ЛВ с определенной ЛФ. Поэтому нахождение, изучение и практическое использование оптимального носителя для разработки эффективной и низкотоксичной системы доставки ЛВ является крайне актуальной и сложной комплексной научно-исследовательской химической, физико-химической, биофармацевтической и фармако-технологической задачей.

### **1.1.2. Углеродные наноносители в системах доставки лекарственных веществ**

Среди всего многообразия изучаемых наноматериалов в биомедицинских исследованиях в последние годы привлекают повышенное внимание углеродные наноструктуры: фуллерены, графен и его оксид, углеродные нанотрубки (УНТ), карбин и детонационный наноалмаз (ДНА) [20]. Другие структурные модификации углерода – лонсдейлит, усы, волокна, луковичный углерод, стеклообразный углерод, аморфный углерод – пока не нашли применения в биомедицинских приложениях.

Интерес к углеродным наноструктурам в биологии и медицине, в первую очередь, обусловлен их физико-химическими и биофармацевтическими характеристиками: возможностью направленной функционализации поверхности, варьированием размера частиц и низкой токсичностью. Не последнюю роль сыграла история их открытия. УНТ были описаны в статье, опубликованной в 1991 г. в Nature [21], открытие фуллеренов ознаменовалось Нобелевской премией по химии в 1996 г., в 2010 г. за получение и исследование свойств графена присуждена Нобелевская премия по физике. Получение в 1960 г. в СССР карбина признано научным открытием. Синтез ДНА в СССР в 1960-х годах был засекречен и только в 2011 г. это достижение было отмечено Международной премией Rusnanoprize [22].

Углеродные наноструктуры являются одними из основных претендентов на роль «идеальных» носителей для систем доставки ЛВ, так как их поверхность можно направленно функционализировать для оптимальной ковалентной или адсорбционной иммобилизации БАВ и ЛВ. Они могут пассивно проникать через мембраны различных типов клеток [23]. Варьирование размера и формы углеродных частиц может также влиять на скорость проникновения частиц в клетку. Изучение фуллеренов, УНТ, графена и ДНА демонстрирует, в ряде случаев, пониженный токсический эффект по сравнению с другими наночастицами [24, 25].

Карбин, обладая высокой биологической совместимостью и нетоксичностью, в литературе не рассматривается как носитель БАВ и ЛВ, возможно, из-за отсутствия возможности

функционализации и прививки веществ на его поверхность. Однако он успешно применяется в медицинских технологиях, прежде всего, в России как покрытие сосудов и имплантов. Например, были разработаны волокна «Витлан» с карбиновым покрытием, из которого были созданы протезы кровеносных сосудов: прочных, эластичных, нетоксичных, с высокими тромборезистивными свойствами. Карбиноподобный углерод, а также алмазоподобные углеродные пленки, содержащие структурные элементы карбина, нашли применение при изготовлении неотторгающихся прочных шовных нитей, а также для покрытия трущихся поверхностей искусственных суставов [26].

Особое внимание к углеродным наноструктурам в качестве носителей ЛВ в настоящее время обращено на нанотрубки, фуллерены и графен. Исследования, проведенные на УНТ с инкорпорированными молекулами противоопухолевых соединений, таких как доксорубицин [27, 28], 10-гидроксикамптотецин [29], паклитаксел [30], метатрексат [31] и цисплатин [32] показали снижение цитотоксического действия и сохранение фармакологической активности ЛС. Применение УНТ с инкорпорированной RNAi для генной терапии [33] показало увеличение задержки развития опухоли по сравнению с липосомальной ЛФ. Инкорпорирование в УНТ противогрибкового антибиотика амфотерицина В повысило его эффективность при лечении лейшманиоза [34], а иммобилизация антибактериального и противоволепрозного препарата дапсона (диафенилсульфона) позволила уменьшить окислительный стресс при сохранении активности ЛС [35]. При этом было обнаружено, что функционализация поверхности УНТ (–COOH и –OH группы) повышает их биосовместимость [36]. Однако при всех достоинствах УНТ и, главное, возможности их использования в качестве наноконтейнера ЛВ с дополнительным внешнем модифицированием поверхности во многих работах отмечена их токсичность *in vitro* и *in vivo* [37].

Разработка систем доставки ЛВ на основе фуллерена и его производных предполагает поверхностную функционализацию наночастицы с дальнейшей ковалентной прививкой ЛВ. Было показано, что образование на поверхности фуллерена –COOH и –OH групп способствует уменьшению количества свободных радикалов в организме, что может быть клинически значимым эффектом, в частности, при лечении болезни Паркинсона [38]. Обнаружено, что фуллеренолат натрия обладает низкой токсичностью и способен предотвращать агрегацию амилоидных фибрилл, что может быть использовано при лечении болезни Альцгеймера [39]. Свойство производных полифторобифосфонатных производных фуллерена накапливаться в костях открывает новые возможности для терапии остеопороза [40, 41].

Одним из основных направлений разработки систем доставки ЛВ на основе углеродных наноструктур, в том числе, фуллеренов является диагностика и химиотерапия опухолевых заболеваний. Было обнаружено, что ковалентно привитый к фуллерену C<sub>60</sub> доксорубицин

проявил 1,5-2-кратное увеличение токсичности по отношению к линиям опухолевых клеток человека *in vitro* и привел к уменьшению объема опухолей в 2,5 раза на мышах *in vivo* при увеличении продолжительности их жизни на 63% [42]. Конъюгат фуллерена C<sub>60</sub> с паклитакселем проявил значительную противоопухолевую активность на человеческих эпителиальных клетках карциномы легких A549 [43]. Однако, исследование безопасности фуллерена C<sub>60</sub> выявило его потенциальную собственную канцерогенность и генотоксичность [44]. При этом отмечается, что поверхностная функционализация фуллерена, также как и УНТ, может как повышать, так и понижать его токсическое воздействие на живой организм.

Графен и наиболее часто используемый в биомедицинских приложениях оксид графена экспериментально широко изучаются как возможные наноносители в системах доставки ЛВ за счет развитой удельной поверхности, позволяющей эффективно иммобилизовать ЛВ [45]. В работе [46] отмечается, что именно функционализация поверхности графена и его производных может придать этим наноструктурам повышенную растворимость, биосовместимость и обеспечить мультифункциональное связывание с различными ЛВ. В ряде работ на функционализированный оксид графена иммобилизовали доксорубицин [47, 48], камптомецин [49], SN38 (аналог камптомецина) [50], цисплатин [51], гены и siRNA [52]. При этом загрузка доксорубицина этими соединениями доходила до 235%, что превышает загрузку на полимерных носителях, где она, как правило, не превышает 100% [53]. Оксид графена проявил ультравысокое поглощение опухолями мышей *in vivo* и повышенную цитотоксичность при отсутствии влияния на биохимию крови и видимых побочных эффектов на гистологических срезах [54]. Отмечается, что оксид графена, обладая антибактериальной активностью, связанной с окислительным и мембранным стрессом, может вызывать внутриклеточную инактивацию белков, перекисное окисление липидов, дисфункцию митохондрий и, в итоге, апоптоз или некроз [46]. Поэтому применение графена и его оксида в фармации и фармакологии, в том числе, в системах доставки ЛВ требует дополнительных исследований биобезопасности.

Для рассмотренных углеродных наноструктур общей закономерностью является присутствие на их поверхности связей C=C с  $sp^2$ -гибридизацией атомов углерода как у УНТ или графена или переходной  $sp^2$ - $sp^3$ -гибридизацией как у фуллеренов [55]. Отмечено, что влияние электронной структуры сопряженной  $\pi$ -системы на живые организмы при введении углеродных наноструктур приводит к окислительному и мембранному стрессу клеток [56]. Поэтому функционализация поверхности углеродных наноструктур позволяет оказывать существенное влияние на их токсическое действие.

В ряде работ [57, 24] показано, что среди углеродных наноструктур наименьшим токсическим действием обладает ДНА. В последнее время интерес исследователей к выбору оптимального носителя для ЛВ смещается от выше рассмотренных углеродных наноструктур к

ДНА благодаря оптимальному комплексу его физико-химических, биофармацевтических и фармако-токсикологических характеристик [58].

## 1.2. Общие сведения об алмазе

Алмаз – аллотропная модификация углерода, известная человечеству с древних времен [59]. Он состоит из атомов углерода в состоянии  $sp^3$ -гибридизации и кристаллизуется, как правило, в кубической сингонии, отвечающей плотной упаковке атомов. Твердость алмаза по шкале Мооса максимальна и равняется 10. Жесткость алмаза, определяемая объемным модулем упругости, равна 443 ГПа, причем для наноалмаза она выше по сравнению с макрокристаллом [60]. При этом алмаз хрупок и легко способен раскалываться по плоскостям, параллельным граням октаэдра. Он имеет большую ширину запрещенной зоны, высокую теплопроводность, высокую термическую и радиационную стойкость, а также химически инертен [61, 62]. Благодаря этим свойствам алмаз находит применение во множестве областей науки и техники [63]. Разнообразное использование алмаза и широкий интерес к нему многих исследователей и промышленников обусловили разнообразие способов получения синтетических (искусственных) алмазов.

Для замены природных алмазов разработаны разные способы получения синтетических аналогов: синтез при сверхвысоких статических давлениях и температурах [64], синтез в динамических условиях [65, 66], газофазный синтез (CVD-синтез) [67, 68]. Эти методы позволяют получать из различных углеродсодержащих исходных веществ (графит, углеводороды, углеводы, оксид углерода, взрывчатые вещества (ВВ)) алмазы, отличающиеся по своим характеристикам.

### 1.2.1. Сведения о наноалмазах

Алмазы, имеющие характерные размеры от нескольких до сотен нм, получили название наноалмазы, или ультрадисперсные алмазы (УДА) [69]. В литературе описаны следующие способы их получения:

- синтез при сверхвысоких давлениях и температурах [70];
- химическое осаждение из C-содержащих паров или газов (CVD) [71];
- лазерная абляция [72];
- синтез в автоклаве из сверхкритических флюидов [73];
- хлорирование карбидов [74],
- электронно- и ионно-лучевое облучение углеродсодержащего материала [75];
- кавитационный синтез [76];
- детонационный синтез [77].

Только детонационный синтез получил промышленное применение (десятки тонн/год), в синтезе наноалмазов – ДНА благодаря своей скорости, относительной простоте и дешевизне получения больших количеств наноалмаза.

Носителем основных свойств ДНА являются частицы со средним размером 4-6 нм. Они, полученные в неравновесных условиях при высоких давлениях ( $\sim 20$  GPa) и температурах ( $\sim 3000$  K) в области существования стабильной алмазной фазы и подвергнутые процедуре химической очистки, имеют «шубу» из поверхностных кислородсодержащих и других функциональных групп (ФГ). Благодаря высокоразвитой поверхности и наличию ФГ ДНА обладает большой сорбционной ёмкостью. Сорбционные свойства ДНА зависят от наличия зарядов на поверхности агрегатов наноалмазных частиц. При этом знак и величина заряда зависят от концентрации и константы диссоциации этих групп,  $pH$  раствора и концентрации фонового электролита [78].

Строение алмазной наночастицы описывают следующим образом (Рис. 1) [78, 79]. В центре имеется ядро, в котором атомы углерода находятся в состоянии  $sp^3$ -гибридизации кубической сингонии гранецентрированной решетки алмаза [80] с максимально возможной морфологической симметрией 3L44L36L29PC [81].

То, что в центре частицы находится алмазное ядро (диаметр  $\sim 3$  нм) подтверждают данные дифракции электронов [82]. На границе алмазного ядра имеются переходные структуры углерода с фрагментами деформированной алмазной структуры, луковичного углерода, графита, аморфного углерода и др., причем их содержание зависит от условий синтеза, очистки и дальнейшей обработки [83, 79].

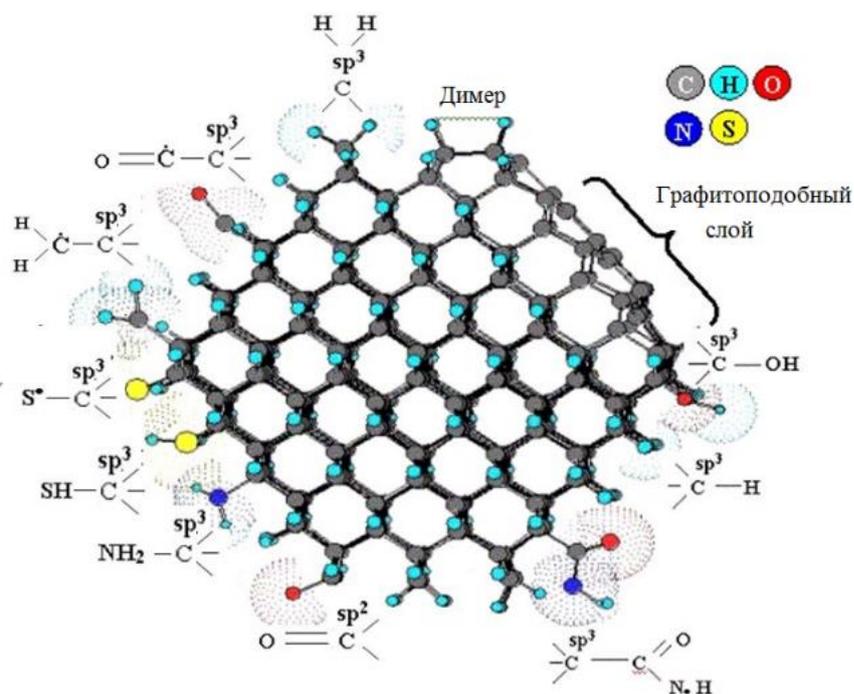


**Рисунок 1.** Модель структуры частицы наноалмаза [78, 79].

«Оборванные» связи (иначе – нескомпенсированные валентности) атомов углерода на поверхности такой частицы локализуются функциональными группами. Так как на поверхности обнаруживается углерод в  $sp^2$ -гибридизации, считается [5], что на поверхности наноалмазной частицы имеются фуллереноподобные «шапки».

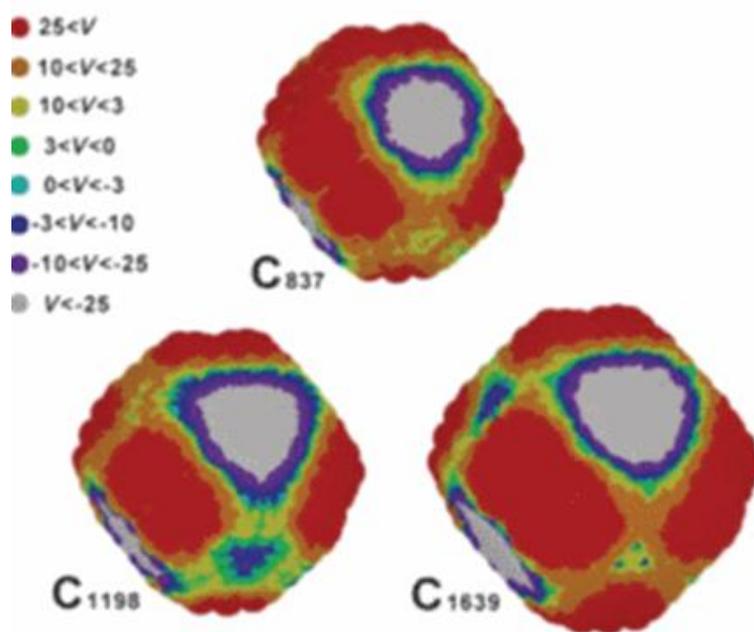
Математические расчеты показывают, что при среднем диаметре частицы УДА 4,2 нм доля поверхностных атомов составляет  $\sim 15\%$  [68]. О.А. Шендеровой [5] было проведено математическое моделирование строения частицы УДА с учетом описанного строения и его

элементного состава. Схематическое изображение полученной модели ДНА с функциональными группами приведено на Рис. 2.



**Рисунок 2.** Модель функционального слоя наноалмазной частицы [5].

В работах [84, 85] расчетным методом показано, что у частиц ДНА грани имеют разный электростатический потенциал, который способствует образованию из отдельных частиц агрегатов и обеспечивает их электростатическое связывание с молекулами иммобилизованных веществ (Рис. 3).



**Рисунок 3.** Распределение электростатического потенциала на поверхности частиц ДНА [84].

В зависимости от формы и структуры ДНА грани (111) и (100) поверхности меняются и вместе с ними меняется и их электростатический потенциал (Рис. 3). Согласно работе [84] у частицы ДНА в виде усеченного октаэдра грани (100) и края граней (100)/(111) имеют сильный положительный потенциал. У графитированной (111) грани обнаруживается сильный отрицательный потенциал или более нейтральный потенциал из-за незначительной асимметрии усеченного октаэдра ДНА. Именно подобная структура частицы ДНА приводит к образованию агрегатов через отрицательно заряженную грань  $(111)^-$  с нейтральными  $(111)^0$  или  $(110)^0$  гранями [84].

### 1.3. Получение и выделение ДНА

Детонационные наноалмазы образуются из конденсированных ВВ с отрицательным кислородным балансом (например, тринитротолуол), т.е. разлагающихся с выделением «свободного углерода» при детонации зарядов в охлаждающей среде. Синтез проводят во взрывных камерах объёмом от 1 до 20 м<sup>3</sup>, которые изготавливают из низко- или высоколегированных сталей [86]. Подрыв осуществляют в трёх вариантах: в газовой среде, в воде или при орошении водой, или в ледяной бронировке. Подрываемый заряд представляет собой смесь, содержащую 50-70 масс. % тротила и гексогена.

Продуктом детонации ВВ является алмазосодержащий конденсированный углерод, иначе «алмазная шихта» (АШ) [87]. Ее подвергают химической очистке для выделения ДНА и его подготовки к дальнейшему использованию. Такая подготовка представляет собой обработку АШ сильными окислителями в жестких условиях. Для этого используют как газофазную, так и жидкофазную окислительную обработку [88]. Так, в работе [89] осуществлялось газофазная обработка АШ пропусканием через неё воздуха, насыщенного озоном, при 100-140 °С. При такой обработке, несмотря на достаточно хорошую очистку АШ от неалмазного углерода, остается значительное количество несгораемых примесей, в основном, оксидов и карбидов железа, количество которых может достигать 25% масс. В работе [90] показано, что окисление АШ кислородом воздуха в присутствии катализатора приводит к селективному окислению неалмазного углерода, после которого остается катализатор и алмазный углерод. После окисления АШ наноалмаз получают либо в виде сухого однородного порошка, либо в виде его стабилизированной водной суспензии при жидкофазном способе выделения.

От несгораемых примесей избавляются обработкой АШ при повышенных температурах (до 200 °С) жидкими окислителями. Обычно используют смесь активного окислителя –  $\text{HNO}_{3(\text{к})}$  с высококипящими кислотами ( $\text{HClO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [91]. При такой обработке удаляются как неалмазный углерод, так и металлы (Fe, Cr, Al, Ti и др.). Такой способ окисления приводит к

образованию гидрозолей ДНА, которые долгое время не агрегируют, что перспективно для создания непрерывного технологического процесса выделения ДНА из АШ [92].

В работе [90] описана обработка АШ нагреванием в серной кислоте (25-110°C, 1-1,5 ч) с добавлением смеси  $H_2SO_4+CrO_3+H_2O$  в массовом соотношении 30:15:55, соответственно. Содержание несгораемых примесей снижается до 0,9% масс., а содержание ДНА в продукте повышается до 98,5% масс. Однако описанный способ выделения ДНА из АШ трудоёмок, а отходы, содержащие соединения хрома (VI), высокотоксичны.

Очистка АШ азотной кислотой и перекисью водорода в одну стадию приводит к удалению до 99,9% масс. неалмазного углерода и до 90% масс. неуглеродных примесей [90]. К достоинствам этих систем можно отнести их доступность и простоту технологического процесса очистки ДНА.

В настоящее время на мощностях ФГУП «СКТБ «Технолог» (г. Санкт-Петербург) налажена промышленная линия выделения ДНА из алмазной шихты азотной кислотой под давлением при температурах 200-250 °C [87]. При этом одновременно происходит окислительное растворение металлических включений с образованием водорастворимых солей. Давление необходимо для обеспечения жидкофазности процесса и поддержания высокой концентрации растворенной двуокиси азота, являющейся, по современным представлениям, собственно окисляющим агентом. Азотная кислота при высоких температурах выступает как источник окислов азота и обеспечивает поддержание кислотности среды, необходимой для обеспечения высокой скорости окисления.

#### **1.4. Химический состав ДНА**

Помимо алмазной фазы ДНА может содержать значительное количество неалмазных примесей. В ДНА обнаруживаются гетероатомы – О (5 % масс. и более), N (1-3 % масс.) и H (около 0,2-1 % масс.). Атомы О и Н входят в состав поверхностных функциональных групп и их количество зависит от степени окисленности. Также их часть может находиться в молекулах  $H_2O$ ,  $CO_2$  и др., адсорбированных на поверхности ДНА. Атомы азота независимо от условий синтеза входят как в состав алмазного ядра, так и в некоторые азотсодержащие функциональные группы ( $NH_2$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$ ).

Несгораемые примеси представляют собой соли, оксиды и карбиды различных примесных элементов, например, Fe, Cr, K, Zn, Ti и др. Характер и количество примесей в ДНА может варьироваться в зависимости как от производителя, так и от партии к партии [93, 94]. Тип и состав примесей определяются многими параметрами, такими как тип ВВ и охлаждающих

агентов, применяемых в процессе детонационного синтеза, материалами поверхности детонационной камеры, а также природой окислителей, режимом выделения и очистки ДНА.

В последнее время разрабатываются различные подходы к определению примесей в наноалмазе [95], в том числе, такими методами, как масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) [96], атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) [97], атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) [98], рентгено-флуоресцентный анализ (РФЛС) [95], нейтронно-активационный анализ (НАА) [99] и т.д. Однако, до сих пор не установлено полное соответствие между предложенными методами анализа и примесным составом ДНА.

Используемые в настоящее время методы изучения примесного состава ДНА имеют свои достоинства и недостатки. Например, многоэлементные методы ИСП-МС и НАА обладают очень низким пределом обнаружения: от сотен нг до нескольких пг [100, 93]. Однако, для фармакопейного анализа такая высокая чувствительность не требуется и на практике не используется. Также методы ИСП-МС, ИСП-АЭС, ААС требуют применения стандартов на каждый определяемый элемент. Поэтому поиск новых, приемлемых для биомедицинских приложений и фармакопейного анализа, методов определения примесного состава ДНА является актуальной задачей.

### 1.5. Химия поверхности ДНА

Частицу ДНА, как и любого твердого тела [101], можно представить в качестве надмолекулы с остовом [102], представляющим кристаллическое алмазное ядро, нарушенную углеродную оболочку, окруженную химически связанным покровом («шубой») из ФГ, который и определяет химическое состояние поверхности ДНА (Табл. 1) [68].

Таблица 1. Сравнение размеров частиц среди соединений углерода [68].

Частицы	Название	Размер	$\frac{C_{\text{общ}}}{C_{\text{пов}}}$
Молекулы	адамантан	3,5 Å	1
	конденсированные полиадамантаны	до 1 нм	1,3 – 13
Коллоидные частицы	наноалмаз	1 – 100 нм	13 - 1·10 <sup>3</sup>
Кристаллы	микрористаллы алмаза	0,1 – 100 мкм	1·10 <sup>3</sup> - 1·10 <sup>6</sup>
	макрористаллы алмаза	> 0,1 мм	> 1·10 <sup>6</sup>

По размеру кристаллитов и по доле поверхностных атомов углерода в общем числе атомов углерода в частице ДНА практически являются коллоидным состоянием алмазного вещества. При среднем диаметре частицы  $\sim 4$  нм доля поверхностных атомов составляет  $\sim 15\%$ . Поэтому свойства ДНА должны определяться состоянием их поверхности в большей степени, чем свойства крупных кристаллов алмаза, у которых доля поверхностных атомов чрезвычайно мала [68]. Это принципиально различает макро-, микро- и наноалмазы.

Оболочка частиц ДНА включает в себя широкий набор ФГ. Методом ИКС обнаружены кислородсодержащие (карбокисильные  $-\text{COOH}$ , гидрокисильные  $-\text{OH}$ , эфирные  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ , ангидридные  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$  и др.), азотсодержащие (амидные  $-\text{NH}-$ , аминные  $-\text{NH}_2$ , нитрогруппы  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ , циано  $-\text{CN}$ ), серосодержащие (сульфоные  $-\text{SO}_2-$ ) и др. [103, 80]. Авторами работы [104], наряду с выше указанными функциональными группами, было обнаружено также незначительное содержание метильных и метиленовых групп. Часто на поверхности ДНА присутствует адсорбированная вода [105], которая может сохраняться даже при прогреве порошка ДНА более  $100^\circ\text{C}$  [80].

## 1.6. Химическое модифицирование поверхности ДНА

Как правило, ДНА разных производителей имеют различные свойства из-за различий сырья, условий синтеза и применяемых методов очистки. Поэтому различны и их характеристики, а результаты исследований, проводимых с ДНА, не всегда воспроизводимы (эффекты физико-химической и бионезквивалентности) [93]. Для стандартизации химических и физико-химических характеристик поверхности ДНА его необходимо унифицировать. Унифицированная поверхность ДНА служит эффективной базой для прививки разнообразных химических соединений, в том числе ЛВ и БАВ [83]. Она получается путем химического модифицирования поверхности. Основными реакциями модифицирования поверхности ДНА являются реакции окисления, восстановления, галогенирования и аминирования [106].

Различные описанные в литературе способы окисления и восстановления поверхности ДНА представлены в Табл. 2. Используемые функциональные надстройки на поверхности ДНА представлены в Табл. 3.

Таблица 2. Способы окисления и восстановления поверхности ДНА [107].

Окисление / карбоксилирование	Восстановление
1. Кислотная обработка: - $\text{HNO}_3$ и $\text{H}_2\text{SO}_4$ [108]; - $\text{HNO}_3$ ( [109]; - $\text{HCl}$ [110];	1. Обработка водородной плазмой [114]; 2. Отжиг в газообразном водороде [115]; 3. Обработка водяным паром [116]; 4. Боран, $\text{BH}_3$ [117];

- $\text{HClO}_4$ [111]; - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и $\text{KMnO}_4$ [88]; - $\text{H}_2\text{SO}_4$ и $\text{KMnO}_4$ [111]. 2. Отжиг в среде: озона [112]; воздуха [113].	5. Алюмогидрид лития, $\text{Li}[\text{AlH}_4]$ [118]; 6. Реакция Фентона [119].
--	---

Таблица 3. Функциональные группы, атомы и соединения, ковалентно закрепленные на поверхности ДНА при химическом модифицировании [107].

Аминогруппа [120, 121] Амины [122, 123]. Силаны [117, 124]	Карбоксил [125, 123] Арил [126] Азид [127] Бензохинон [128] Тимидин [129] Цианид [118]	Фтор [120, 130] Алкил [120, 123] Перфтороктиловый эфир [131] Алифатические группы [123] Хлоркарбонил [129]	Хлор [116, 132] Эфир [131] Фенил [123] Галиды [118] Тиолы [118]
--	---	--	---

### 1.6.1. Восстановление ДНА

Гидрирование поверхности является одним из наиболее широко изучаемым и применяемым процессом как для ДНА, так и для синтетических алмазов [133]. В работе [79] авторы проводили гидрирование наноалмаза при 800 °С в течение 5 ч. В результате увеличивалось количество С–Н групп на поверхности ДНА, что подтверждено элементным анализом и методом ИКС. В работе [134] было показано, что после обработки поверхности ДНА водородом не все гидроксильные группы восстанавливаются, а получается бифункциональная поверхность, на которой имеются как –Н, так и –ОН группы. В работе [135] утверждается, что гидроксильные группы могут быть удалены при более высоких температурах или при более длительном времени гидрирования, а также обработкой в водородной плазме.

В работе [136] установлено, что при повышении температуры гидрирования ДНА от 400 до 900 °С меняется степень восстановления его поверхности, вплоть до графитизации наноалмаза [137]. Однако температура гидрирования до 800-850 °С не приводит к графитизации ДНА [79]. При этом влияние времени гидрирования на степень восстановления поверхности ДНА при одной и той же температуре в литературе не описано. В разных работах время гидрирования ДНА упоминалось или как 2 ч при 800 °С [138], или как 5 ч при 800 °С [139] или 850 °С [134].

### 1.6.2. Окисление ДНА

Окисление поверхности ДНА применяется для создания на ней карбоксильных или гидроксильных групп, пригодных для дальнейшей ковалентной прививки БАВ и ЛВ [83]. Для получения на поверхности ДНА кислородсодержащих групп, как правило, используют процессы окисления как в жидкой, так и в газовой фазах [140, 104].

Очевидно, что для достижения высокой воспроизводимости результатов прививки ЛВ к ДНА его поверхность должна быть максимальной однородной. Поэтому первоначальный

контроль поверхности после реакций модифицирования должен способствовать повышению качества функционализированного ДНА и его применимость в биомедицинских приложениях [106].

Наиболее распространенной для прививки БАВ и/или ЛВ является карбоксильная группа –COOH. Для того, чтобы создать наиболее однородный слой –COOH групп на поверхности ДНА, необходимо достижение максимального окисления. Этот процесс может приводить к потерям алмазного углерода и уменьшению размера алмазного ядра [141]. Жесткое окисление проводится с помощью смесей кислоты-окислителя и высококипящих минеральных кислот. Для этого использовались смеси разных объемов конц. серной, азотной и хлорной кислоты или HCl, HNO<sub>3</sub> [109] и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [142]. Также используют т.н. «Пиранью» – смесь серной кислоты и перекиси водорода [143], перекись водорода или смесь конц. серной и азотной кислот 3:1 [144, 145].

Впервые на природном алмазном порошке Саппок и Боэм в работе [146] показали, что в чистом кислороде образование поверхностных оксидов на его поверхности начинается при 260 °С, а реакции термоокислительной деструкции становятся заметными выше 360 °С. Отметим, что максимальная концентрация присоединенного кислорода близка к концентрации атомов углерода, выходящих на поверхность алмаза. Это свидетельствует о полном насыщении углеродной поверхности кислородсодержащими группами.

При газофазном окислении ДНА воздухом наблюдаются эндотермический и экзотермические эффекты [147]. Первый эффект проявляется в интервале 40-150 °С и связан с десорбцией адсорбированных газов, воды и других летучих примесей. Достаточно слабый экзотермический эффект (200-525 °С) связан с деструкцией поверхностных функциональных групп (~200 °С) и газификацией остатка неалмазного углерода на поверхности алмазного ядра при взаимодействии с кислородом воздуха. При температуре 525 °С начинается взаимодействие алмазного ядра частицы наноалмаза с кислородом воздуха, которое заканчивается при ~760 °С полным сгоранием ДНА.

В работах [148] процесс окисления алмаза изучали в проточном режиме, окисление проводили озono-кислородными смесями с содержанием озона 1-5 % по объему. Взаимодействие озона с алмазными материалами при комнатных температурах идет достаточно слабо для химического модифицирования его поверхности. При этом выделяют 3 типа процессов, происходящих при взаимодействии с озоном. А именно, глубокое окисление с выделением оксидов углерода в газовую фазу, частичное окисление с образованием на поверхности кислородсодержащих комплексов и каталитическое разложение озона. Интенсивность каждого процесса, а также их соотношение зависят от температуры и типа материала. Наиболее активно реагируют с озоном углеродные материалы, обладающие развитой поверхностью, в частности, ДНА. Образование функциональных поверхностных групп интенсивно происходит в интервале

температур 273-298 К. Суммарное их содержание в результате озонирования возрастает на порядок, при этом с ростом температуры наиболее интенсивно изменяется на поверхности количество гидроксильных и карбоксильных групп.

Все три типа процессов, протекающих при контакте ДНА с озоном, происходят во всем интервале температур (150-350 К), хотя для каждого типа процесса существует своя оптимальная температурная область: глубокое окисление с образованием  $\text{CO}_2$  протекает при более высоких температурах (270-350 К), интервал 250-330 К оптимален для образования функциональных кислородсодержащих групп на поверхности, а при пониженных температурах (150-200 К) преобладают процессы каталитического разложения озона [148].

### 1.6.3. Галогенирование ДНА

В технических областях галогенирование используют для придания ДНА новых свойств. В частности, для создания гидрофобной поверхности ДНА применяют фторирование [149].

Для галогенирования обычно используют аминированный или гидрированный ДНА [83]. Поверхность галогенированного ДНА более реакционноспособна и атом галогена может взаимодействовать с функциональной группой прививаемого соединения [150].

В литературе имеется незначительное число работ, где фторированный ДНА используется для прививки молекул БАВ и/или ЛВ [121]. Однако, таким способом был впервые получен конъюгат ДНА с аминокислотой глицином, хотя авторами было отмечено, что фтор остается на поверхности конъюгата ДНА-глицин и это ограничивает использование фторированного наноалмаза как промежуточного модификатора для разработки систем доставки ЛВ [151, 152, 153]. Поэтому в настоящее время для активации поверхности ДНА перед прививкой БАВ и/или ЛВ актуален выбор другого галогена.

Хлорированный ДНА представляется более перспективным в качестве прекурсора прививки БАВ и ЛВ. Обработку ДНА обычно ведут молекулярным хлором в жидкой фазе при фотоиницировании [154] или в газовой фазе [139], хлористым тиоилом [155] или в плазме хлорсодержащего вещества, например,  $\text{CCl}_4$  [156].

Следует отметить, что хлорированный ДНА в настоящее время практически не используется для прививки на его поверхность БАВ и/или ЛВ. Соответственно, до сих пор не разработана с целью повышения количества прививаемых соединений методика, позволяющая хлорировать ДНА с максимальной эффективностью.

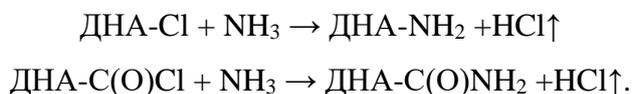
Бромирование и, тем более, йодирование ДНА в силу неустойчивости этих соединений крайне мало исследовались. Так, в работе [51] осуществлено бромирование алмазного микропорошка молекулярным бромом при нагревании до 50 °С в течение 8 ч. В работе [19] было проведено бромирование наноалмаза с помощью  $\text{AlBr}_3$ . Было показано, что ионное

бромирование позволяет практически полностью заместить поверхностные спиртовые группы на атомы брома. Однако, всегда остается проблема удаления используемого металлсодержащего катализатора, что при достаточно высокой величине  $S_{уд}$  ДНА может стать существенной проблемой.

#### 1.6.4. Аминирование ДНА

Первичные аминогруппы на поверхности ДНА являются удобным якорем для их связывания с биомолекулами, например, белками, ферментами или пептидными цепочками [2]. В литературе ДНА с прикрепленными соединениями, содержащими концевую аминогруппу, часто называют аминированными. Такие привитые соединения будут описаны в разделе 1.8.

Обычно аминирование проводят газообразным аммиаком при повышенной температуре (425 °С), используя уже хлорированную поверхность ДНА [157], по схеме:



При этом полного замещения поверхностных функциональных групп ДНА на аминогруппы не достигается [2].

### 1.7. Иммобилизация БАВ на поверхности ДНА

Выше отмечено, что ДНА имеют высокую удельную поверхность  $S_{уд}$  (250-350 м<sup>2</sup>/г), сверхмалый размер первичных частиц (4-6 нм), лабильный функциональный покров и химически инертное кристаллическое ядро. Наличие этих свойств делает ДНА перспективным носителем для создания систем доставки БАВ и ЛВ, люминесцентных маркеров для изучения клеточных взаимодействий и т.д. [158].

Иммобилизацию БАВ на поверхности ДНА можно осуществить двумя способами: адсорбцией или ковалентной прививкой. В литературе используют оба эти подхода, но чаще всего применяют более простой метод сорбции БАВ и ЛВ на поверхности ДНА, а не ковалентную прививку. При этом, как правило, не приводится сравнение двух способов иммобилизации БАВ и ЛВ по количеству прикрепленного вещества, его активности, стабильности и др.

#### 1.7.1. Адсорбционный метод

Адсорбционный метод получения систем доставки БАВ или ЛВ на основе ДНА имеет ряд преимуществ перед ковалентным связыванием: простота использования, возможность варьировать концентрацию активного вещества и создавать высококонцентрированные комплексы. Кроме этого, относительно легко может быть получена  $pH$ -зависимость

десорбционного высвобождения БАВ с поверхности ДНА. Литературные данные об адсорбированных на ДНА БАВ и ЛВ представлены в Табл. 4 [107].

Таблица 4. Биологически активные объекты, адсорбированные на ДНА [107].

<p><b>Белки / ферменты</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- апообелин [159]</li> <li>- люцифераза [159, 160]</li> <li>- костный морфогенетический белок-2 (BMP-2) [161]</li> <li>- каталаза [162]</li> <li>- гистон [162]</li> <li>- лизоцим [162, 108, 163, 164]</li> <li>- обелин [165]</li> <li>- лошадиный цитохром с [166]</li> <li>- лошадиный сердечный миоглобин [167]</li> <li>- бычий сывороточный альбумин [167, 168]</li> <li>- овальбумин [168]</li> <li>- фетуин [168]</li> <li>- рибонуклеаза В [168]</li> <li>- холестерин эстераза [162]</li> <li>холестерин оксидаза [162]</li> <li>- пероксидаза [162]</li> </ul>	<p><b>Лекарственные вещества</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- доксорубицин [169, 170]</li> <li>- паклитаксел (РТХ) [171]</li> <li>- эпирубицин [172]</li> <li>- дексаметазон (DEX) [173]</li> <li>- пурваланол А [173]</li> <li>- 4-гидрокситамоксифен [173]</li> </ul> <p><b>Антитела</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- иммуноглобулин G [128]</li> </ul> <p><b>Гормоны</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- бычий инсулин [174]</li> </ul>	<p><b>Прочие</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ДНК [175]</li> <li>- целлобиоза [110]</li> <li>- стекловидный углерод [176]</li> <li>- поли-L-лизин [177, 178, 166]</li> <li>- полиэтиленимин [122]</li> <li>- додецилсульфат натрия [179]</li> <li>- олеат натрия [111]</li> <li>- полиаллиламин [115]</li> <li>- родамин [122]</li> <li>- вирусы [180]</li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><b>Токсины</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- афлатоксин В1 [162]</li> <li>- альфа-бунгаротоксин [181]</li> </ul>	

В начале исследований по использованию ДНА в биомедицинских приложениях он за счет высокой сорбционной способности рассматривался, в основном, как перспективный адсорбент для молекул БАВ белковой природы. Также был опубликован ряд работ, в которых адсорбируемыми объектами помимо БАВ и ЛВ на поверхности ДНА были токсины, антитела и вирусы (Табл. 4).

В настоящее время доказано, что процесс адсорбции различных БАВ и/или ЛВ на поверхности ДНА зависит от его предварительной обработки т.е. от химической природы и состава ФГ [182, 150]. При этом химическая природа БАВ или ЛВ, как и их структурные и объёмные характеристики, могут также вносить существенный вклад в процесс их сорбции на частицы ДНА.

Например, в работе [183] сделан вывод, что модифицированные ДНА адсорбируют линейные и не связывают кольцевые молекулы ДНК. Однако, в работе [184] была показана возможность адсорбции кольцевой плазмиды pUC18 на поверхности ДНА в количестве 50% от ее исходной концентрации в растворе. По-видимому, это может быть связано с разным поверхностным функциональным составом ДНА, использованных для адсорбции веществ. Если авторы работы [183] использовали модифицированные ДНА (при этом методика и тип поверхностных групп не описаны), то в работе [184] ДНА вообще не модифицировались. Также

в работе [185] была изучена адсорбция кольцевых плазмид EGFP на поверхности ДНА для их доставки в клетки HeLa. Для этого на гидроксильную поверхность ДНА ковалентно прививали 3-йодопропилэтоксисилан, где впоследствии йод нуклеофильно замещался триэтиламино, с которым электростатически взаимодействовала кольцевая плаزمид EGFP. Адсорбция EGFP подтверждалась качественно с помощью УФС, количественные данные в работе не приводятся. Из анализа этих работ можно сделать вывод, что адсорбция различных веществ зависит от типа и характера используемой поверхности ДНА.

В качестве подтверждения этого вывода можно привести работу [168], где авторы изучали влияние стерических затруднений на степень адсорбции гликопротеинов на поверхность ДНА и предложили для повышения эффективности сорбции использовать линкерную цепочку между ДНА и адсорбируемым веществом. К гидроксильному ДНА прививали (3-аминопропил)-триметоксисилан, к аминогруппе которого присоединяли янтарную кислоту и, уже к последней, - аминифенилборную кислоту (АФБК), являющуюся специфическим реагентом на гликопротеины. При этом янтарную кислоту авторы не рассматривали в качестве БАВ или ЛВ, а использовали только в качестве линкерной молекулы. Также авторы провели синтез ДНА-АФБК без линкерной ножки. Было показано, что адсорбция гликопротеинов (фетуин, овальбумин и рибонуклеаза В поджелудочной железы быка) на поверхности с линкером (ДНА- линкер- АФБК) в 2 раза выше, чем без него (ДНА-АФБК), и в 4 раза выше, чем на гидроксильном ДНА, на котором наблюдается только неспецифическая адсорбция. При этом максимальное значение адсорбции для овальбумина возрастает с 150 мг/г (гидроксильный ДНА и ДНА-АФБК) до 350 мг/г (ДНА- линкер- АФБК), а для фетуина -- с 300 мг/г (гидроксильный ДНА) и 800 мг/г (ДНА-АФБК) до 1300 мг/г (ДНА-линкер-АФБК). Количество адсорбированных веществ в работе [168] определено методами ВЭЖХ и УФС.

В случае специфической адсорбции белков и ферментов на поверхности ДНА такие системы могут служить основой для создания биочипов. Например, в работе [186] предложено использовать ДНА, связанные с бактериальной люциферазой, для создания люминесцентного биочипа. При использовании цитохрома и бычьего сывороточного альбумина (БСА) было показано, что 1 мг ДНА может адсорбировать до 0,3-0,5 мг белка. Найдено, что ДНА полностью адсорбируют люциферазу из раствора в указанных пределах и при многократной промывке осадка водой и буфером 20 мМ Трис-НСl (рН = 7,0) десорбция не происходит. Было обнаружено, что фермент, адсорбированный на поверхности ДНА, способен проявлять свою каталитическую активность. На этой основе авторами работы [186] продемонстрирована возможность создания прототипа люминесцентного биочипа. Однако при этом наблюдается постепенная десорбция люциферазы, которая за десять промывок практически полностью удаляется с поверхности ДНА.

В работе [108] изучена адсорбция фермента лизоцима на поверхности ДНА, имеющим размеры агрегатов 100 нм. Используя метод УФС, авторы показали, что на 1 г окисленного ДНА сорбировалось  $80 \pm 10$  мкг лизоцима, что соответствует  $\sim 3700$  молекулам лизоцима на поверхности одного агрегата ДНА. Выявлено, что выживаемость бактерий *E.coli* при действии на них нативного и адсорбированного лизоцима составила около 40 и 30%, соответственно. Был сделан вывод о перспективности использования ДНА для детектирования взаимодействия наночастиц и биологических объектов, таких, как клетки и бактерии.

В большинстве работ по адсорбции различных БАВ и/или ЛВ на поверхности ДНА авторы не указывают параметры используемых гидрозолей ДНА до и после проведения адсорбции. К тому же в литературе крайне мало работ, связывающих размер агрегатов ДНА с характером или величиной адсорбции ЛВ и БАВ и их фармакологической активностью. Одним из немногих исключений является работа Е. Переведенцевой и др. [187], в которой авторы исследовали адсорбцию лизоцима на поверхности окисленного ДНА в зависимости от размера его частиц (5, 50, 100, 200, 300, 400 и 500 нм). Показано, что максимальная адсорбция фермента в 3 раза выше для ДНА с размерами 5 нм по сравнению с 100 нм частицами. Также в работе была изучена активность адсорбированного лизоцима в зависимости от размера частиц ДНА, которая определялась по смещению полос пика  $-NH$ -группы в ИК-спектре. Показано, что активность иммобилизованного фермента на ДНА с размерами частиц 5 и 50 нм составляла  $\sim 18\%$ , а для частиц 100 нм – 77% от активности нативного фермента. При дальнейшем увеличении размеров частиц ДНА активность монотонно снижалась и для частиц с размерами 500 нм составляла  $\sim 60\%$ . Используя эту модель, авторы сделали вывод, что ДНА с размером частиц порядка 100 нм и более являются наиболее удобными в качестве платформ для иммобилизации белков.

Ряд работ посвящен адсорбции на поверхности ДНА социально значимых ЛВ: противоопухолевого антибиотика доксорубина [188, 189, 190, 191], гормона инсулина и др. [174]. Создание систем доставки этих ЛВ на основе ДНА призвано повысить эффективность их накопления в опухолях, тем самым, снизив дозировку и токсическое действие.

В отдельных случаях первоначальные работы по адсорбции ЛВ заключались не только в получении их изотерм сорбции и десорбции, но и доходили до попыток создания ЛФ [188]. В таких работах не только всесторонне изучены химические и физико-химические свойства полученных систем доставки, но и целый спектр токсикологических характеристик, а также специфическая активность. Так, в работе [174] изучена адсорбция инсулина на поверхности ДНА. Было показано, что полученный комплекс имеет  $pH$ -зависимый характер десорбции инсулина в щелочной среде. Частицы ДНА в смеси с инсулином в воде в соотношении 4:1 адсорбировали до 80% инсулина на своей поверхности. После десорбции при  $pH \geq 7$  оставалось на поверхности ДНА до 31% инсулина. Однако количество инсулина на поверхности ДНА после

5 дней выдержки в растворе NaOH ( $pH = 10,5$ ) и в нейтральной водной среде оказалось равным 46 и 2%, соответственно. Связывание инсулина с поверхностью ДНА подтверждено методом ИКС и изменениями  $\xi$ -потенциалов гидрозолей ДНА. Важным выводом данной работы является то, что инсулин в адсорбированном состоянии инактивируется, однако его специфическая активность возвращается после десорбции с поверхности ДНА.

Одним из наиболее обширных циклов исследований является изучение адсорбции на поверхности ДНА антибиотика доксорубицина – инициатора клеточного апоптоза [192, 188, 189, 190]. Адсорбцию доксорубицина (в виде гидрохлорида) проводили на ДНА с размерами частиц 2-8 нм и высокой концентрацией –ОН и –СООН групп на поверхности. Такие ФГ обеспечивают необходимый функциональный покров для электростатического взаимодействия с катионом доксорубицина ( $\text{Dox-NH}_3^+$ ). Обнаружено, что при добавлении к полученной смеси 10 мг NaCl адсорбция доксорубицина увеличивалась до 10% масс. При удалении NaCl однократной декантацией и редиспергированием в дистиллированной воде наблюдается обратный эффект и на поверхности ДНА остается 1% масс. доксорубицина. Полученные результаты показывают, что изменение концентрации противоионов в растворе может стать удобным и эффективным способом варьирования концентрации веществ, адсорбированных на поверхности ДНА. Показано, что при создании такого комплекса происходит снижение токсического действия антибиотика, а его специфическая активность существенно увеличивается [190].

С применением атомного моделирования в работе [189] изучено влияние  $pH$  на взаимодействие доксорубицина с поверхностью ДНА. Обнаружено, что связывание молекул антибиотика происходит только при высоких значениях  $pH$  и требует, как минимум, 10% площади поверхности ДНА для дальнейшего титрования смеси. По результатам работы авторы сделали вывод о важности понимания механистической составляющей, лежащей в основе  $pH$ -контроля для создания систем доставки ЛВ на основе ДНА.

В работе [173] изучена адсорбция на ДНА ряда важных химиотерапевтических ЛВ: пурваланола А – средства от рака печени, 4-гидрокситамоксифена – средства от рака молочной железы и дексаметазона – противовоспалительного соединения широкого спектра действия. Адсорбцию ЛВ подтверждали методами УФС, ДРС и измерением  $\xi$  - потенциала частиц. Изучение методом клеточного анализа (МТТ) токсичности комплексов на примере 4-гидрокситамоксифена показало, что выживаемость клеток MCF 7 в случае адсорбированного вещества сокращается в 5-6 раз, а в случае нативного вещества - примерно в 7 раз по сравнению с контролем. В результате авторы сделали вывод, что применение ДНА в качестве транспортной платформы для доставки ЛВ не только решает проблему применения нерастворимых в водной среде ЛС, но и повышает адресность их доставки, снижает дозировку и токсичность.

В настоящее время в России и за рубежом патентуется способ иммобилизации ЛВ на поверхность ДНА, имеющую  $-NH_2$ ,  $-NH_3$ ,  $-COOH$  и др. функциональные группы [193].

### 1.7.2. Ковалентная прививка

В начале исследований по созданию систем доставки ЛВ ковалентную прививку БАВ и ЛВ проводили не на ДНА, а на других углеродных наночастицах –УНТ и фуллеренах. Именно эти работы впоследствии привели к пристальному вниманию к ДНА как наноносителю в системах доставки БАВ. Это ознаменовало новый этап в биомедицинском применении ДНА, что, прежде всего, связано с наличием богатого функционального покрова и относительной легкости его функционализации в противоположность фуллеренам и нанотрубкам. В литературе имеется значительное число работ по ковалентной прививке БАВ и ЛВ на поверхности ДНА, из которых приведем наиболее значимые примеры, представленные в Табл. 5 [107].

В работе [129] проведена ковалентная прививка цепочки ДНК к поверхности модифицированного ДНА. Для этого предварительно окисленная поверхность ДНА была прохлорирована и по образовавшимся хлорангидридным группам ковалентно привит тимидин. Он выполнял роль линкерного фрагмента, ковалентно связывающегося с концом цепочки ДНК через 5'-фосфатную группу одной полинуклеотидной цепи.

Таблица 5. Вещества, ковалентно связанные с ДНА через амидную связь (если иное не установлено) [107].

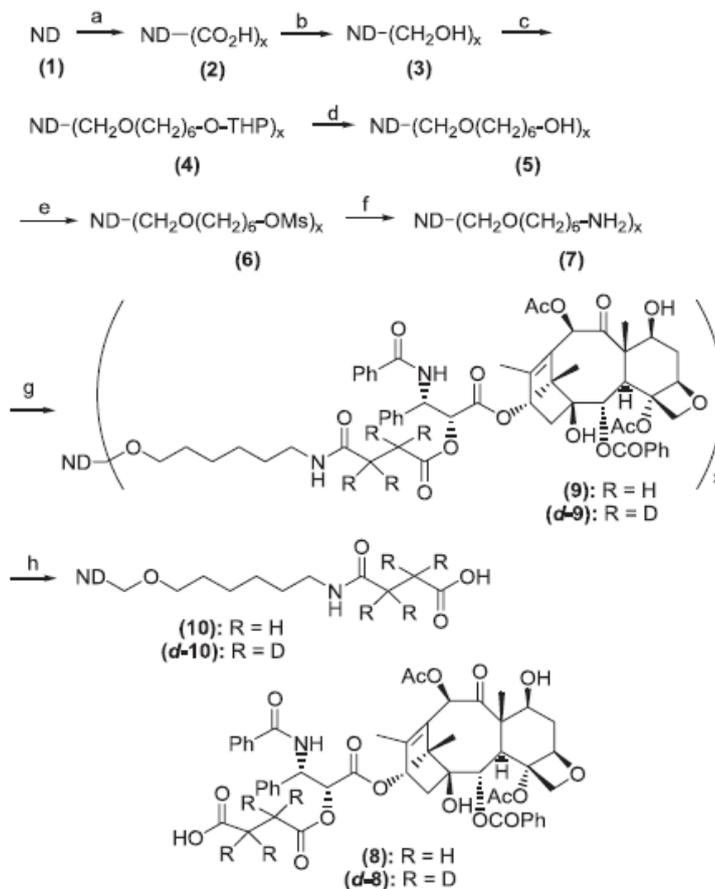
<b>Белки / ферменты</b>	<b>Гормоны</b>	<b>Прочие</b>
- трансферрин [194]	- гормон роста [195]	- биотин [58]
- зеленый флуоресцентный белок (GFP) [195]	<b>Антитела</b>	- лизин [204]
- бычий сывороточный альбумин [128, 196]	- митохондриальные [201]	- полиэтилен гликоль-диамина [205]
- свиной трипсин [197]	- актиновые [201]	- фолиевая кислота [205]
- аспарагин амидаза F [197]	- антитела кролика, специфичные к иммуноглобулинам мыши [128]	- аминокислоты [124], [206] -силановая связь)
<b>Красители</b>	- мышинный иммуноглобулин G [128]	- кремниевые чипы [164]
- октадециламин [198]	<b>Лекарственные вещества</b>	- декстран [207]
- NHS-TAMRA [199]	- паклитаксел (PTX) [202]	
- IRDye-800CW [200]	<b>ДНК</b>	
	ДНК [125, 203]	
	- ДНК (эфирная связь) [129]	

В работе [208] путем ковалентной прививки осуществили иммобилизацию БСА на ДНА. При этом ДНА модифицировали с помощью радикальной полимеризации, используя химическое восстановление соли диазония  $BF_4^-$ ,  $+N_2-C_6H_4-CH(CH_3)-Br$ . Прочно связанные с поверхностью ДНА арильные группы  $-C_6H_4-CH(CH_3)-Br$  были эффективными инициаторами реакции в

присутствии трет-бутилметакрилата. В результате был синтезирован гибрид ДНА с ковалентно привитыми к нему через арильные соединения полимерными цепочками. Толщина слоя привитых цепочек, оцениваемая с помощью метода РФЭС, линейно увеличивалась с течением времени, пока не вышла на плато в 2 нм. Затем эти нанообъекты гидролизовали в ДНА-полиметакриловой кислоте (ДНА- ПМАК).

В статье [197] описана иммобилизация ферментов (трипсин и аспарагинамидаза F) на поверхности ДНА для их эффективного протеолиза. Степень прививки определяли по изменению концентрации фермента в растворе после реакции. Авторы показали, что активность ферментов при иммобилизации существенно не меняется. Кроме того, иммобилизованные на поверхности ДНА ферменты проявляли гораздо более высокую термическую и химическую устойчивость по сравнению со нативными, при этом сохраняли высокую активность даже после 10-кратного использования.

Авторы работы [202] ковалентно присоединяли к ДНА паклитаксел путем многостадийного процесса, схематично изображенного на Рис. 4. Связывание паклитаксела с ДНА было подтверждено методами ПМР и ИКС. Показано, что на каждую частицу ДНА прививается до 7 молекул ЛВ. Исследование биологической активности конъюгата выявило её потерю после обработки 1 М раствором NaOH. Конъюгат ДНА-паклитаксел в концентрации 0,1-50 мг/мл в течение 48 ч понижал жизнеспособность в клетках человеческой легочной карциномы на 12%. 1 мкг/мл конъюгата ДНА-паклитаксел обеспечивал 50%-ное ингибирование клеточной выживаемости в клетках A549, что совпало с активностью нативного паклитаксела. Эти данные показывают, что иммобилизованный на поверхности ДНА паклитаксел является эффективным индуктором гибели клеток легочной карциномы, что подтверждает сохранение эффективности ЛВ после его иммобилизации на ДНА.



**Рисунок 4.** Схема химического синтеза конъюгата ДНА-паклитаксел [202].

В работе [120] осуществлена прививка этилендиамина и аминокислоты глицина к поверхности фторированного ДНА. Ковалентную прививку подтверждали с помощью метода ИКС. Размеры частиц полученных конъюгатов ДНА-этилендиамин и ДНА-глицин составляли 262 и 310 нм, соответственно, и значительно превышали размеры агрегатов исходного ДНА. Этот эффект авторы объясняют тем, что происходит агрегация частиц за счет диполь-дипольного взаимодействия и образования водородных связей между молекулами привитых соединений.

Авторы работы [124], развивая идею эффективности ковалентной прививки аминокислот к ДНА, показали возможность последовательного наращивания полипептидных цепочек на его поверхности. Восстановленную поверхность ДНА они модифицировали (3-аминопропил)-триметоксисиланом, игравшим роль линкерного блока, а затем его ковалентно связали с аминогруппами трех аминокислот (глицин, серин и фенилаланин), защищенными флуоренилметилоксикарбониллом (Fmoc). Ковалентная прививка соединений подтверждалась элементным анализом и методом ИКС. Определение размеров частиц полученных конъюгатов показало, что после прививки линкерного блока диапазон распределения размеров увеличился от 100-200 нм для исходного и восстановленного ДНА до 150-500 нм для полученных конъюгатов. Этот эффект авторы объяснили тем, что после силанирования поверхности ДНА его

частицы агрегировали за счет взаимодействия линкерных блоков и поверхностных функциональных групп других частиц.

В похожей работе [209] силанированные и с нанесенным слоем полиэлектролита ДНА с размерами частиц  $\leq 35$  нм были модифицированы через малеимидную функцию тиолированными флуоресцентными пептидами. Водные суспензии модифицированных ДНА были стабильны в течение 1 мес. Образцы оказались нетоксичными по отношению к СНО-клеткам. Методами конфокальной, светоотражающей и флуоресцентной микроскопии была показана способность синтезированных конъюгатов проникать в клетки млекопитающих.

В работе [210] на поверхность восстановленного ДНА прививали биотин через линкер – (3-аминопропил)-триметоксисилан. Конъюгат был изучен методами ИКС, ДРС, РФА, элементного и термогравиметрического анализа (ТГА). Плотность прививки биотина составила 1,45 ммоль/г. Активность конъюгата ДНА-биотин была проверена с помощью стрептавидина, меченного пероксидазой хрена.

#### *1.7.2.1 Ковалентная прививка глицина на углеродных наночастицах*

Впервые ковалентная прививка глицина на углеродную наночастицу (фуллерен  $C_{60}$ ) была осуществлена в 1995 г. [211]. Для получения аддукта  $C_{60}$ -глицин в работе использовали довольно простой синтез в этаноле с добавлением гидроксида натрия в течение 24 ч при комнатной температуре. Авторы отмечали, что деформационные колебания  $C=O$  связи в карбоксильной группе глицина отвечают максимуму при  $1404\text{ см}^{-1}$ , а в аддукте  $C_{60}$ -глицин – максимумам при  $1399$  и  $1225\text{ см}^{-1}$ , соответственно.

В настоящее время глицин широко используется для моделирования взаимодействия биологически активных молекул, в частности, аминокислот с поверхностью углеродных наночастиц. Так, в работе [212] рассчитали энергию взаимодействия и пространственную ориентацию между фуллереном  $C_{24}$  и молекулой глицина, ковалентно присоединенной к фуллерену через атом азота.

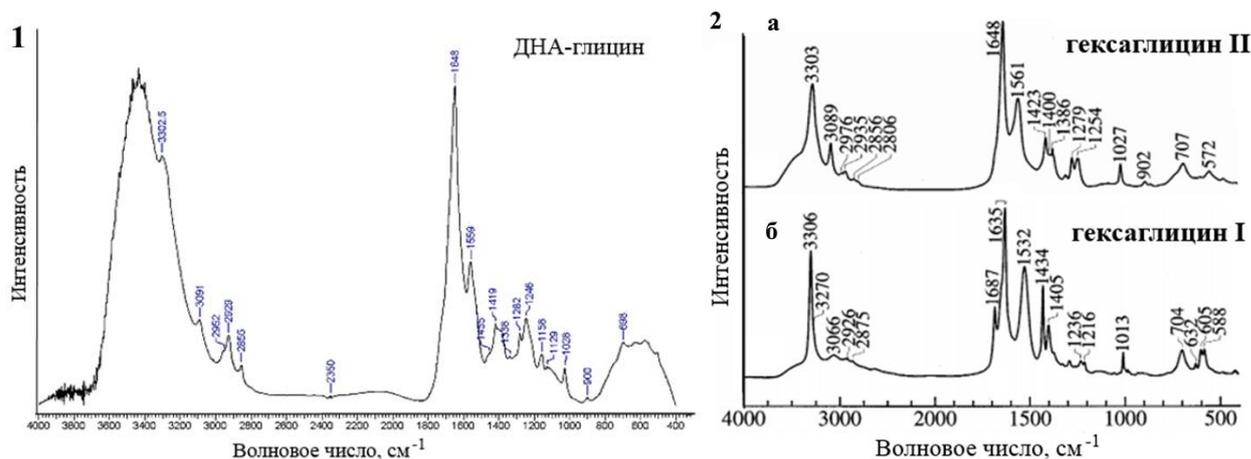
Известны работы по ковалентной иммобилизации глицина на оксиде графена, однако целью этих работ было не получение конъюгата графена с глицином, а функционализацию поверхности оксида графена глицином с ее одновременным восстановлением. Так, предложена «дружелюбная» реакция глицина с оксидом графена при комнатной температуре в течение 12 ч при интенсивном перемешивании [213], в результате которой оксид графена восстанавливается до графена. В работе [214] предложено подобным способом получать квантовые точки на графене за счет восстановленных атомов азота глицина.

С использованием фторированных одностенных УНТ и этилового эфира гидрохлорида глицина в работах [215, 216] был получен конъюгат УНТ-глицин. Применение в качестве

реагента этилового эфира глицина, а не самой аминокислоты глицина объяснялось необходимостью предотвращения возможной реакции полимеризации последнего. Синтез проводили в *o*-дихлорбензоле при 80-150 °С в течение 3 ч с добавлением нескольких капель пиридина для связывания выделяющегося HF. Отдельно в работе [215] оговорено, что для образования соли пиридина с HF необходима температура не более 100 °С, а при температуре 130 °С и выше защитная эфирная группа удаляется. Поэтому сделан вывод об отсутствии необходимости повышенной температуры синтеза при использовании свободного глицина и предположено, что реакция может уже проходить при температуре 80-90 °С [215]. Однако в патенте [216] указаны температура синтеза, равная 75 °С, и время реакции – 2 ч.

В работе тех же авторов был получен конъюгат ДНА-глицин [120]. Для этого фторированный ДНА обрабатывали ультразвуком в *o*-дихлорбензоле в течение 20-30 мин, добавляли гидрохлорид этилового эфира глицина и несколько капель пиридина. Полученную смесь перемешивали при температуре 130-140 °С в течение 8-12 ч. Если опираться на условия синтеза конъюгата УНТ-глицин (см. выше), то для этого синтеза конъюгата ДНА-глицин была выбрана слишком высокая температура, которая может вызывать полимеризацию глицина и образование полиглицина, так как известно, что глицин в водной среде полимеризуется при температуре около 140 °С [217]. Тем более, что защитная эфирная группа в процессе реакции гидролизуеться. Методика работы [120] была воспроизведена в диссертации А.В. Карпухина [218]. В обеих работах для идентификации прививки глицина на ДНА использовали метод ИКС. Однако, для анализа молекулярного состояния глицина на поверхности ДНА ИК-спектр конъюгата полезно было бы сравнить с ИК-спектром гексаглицина, представляющим собой шесть молекул глицина, полимеризованных через амидные связи [219].

В Табл. 6 и на Рис. 5 приведены отклонения максимумов полос поглощения ИК-спектров двух форм гексаглицина [219] относительно максимумов полос спектра конъюгата из работы [218]. В области 4000-2500 см<sup>-1</sup> спектры имеют общие, с небольшим смещением полосы поглощения при 3302 и 3091 см<sup>-1</sup>, отвечающие колебаниям связи N–H. Однако вторая полоса в спектре гексаглицина I смещена на 25 см<sup>-1</sup>. В области 1800 см<sup>-1</sup> и ниже ИК-спектр конъюгата почти полностью совпадает со спектром гексаглицина II, за исключением двух полос поглощения с максимумами 1158 и 1129 см<sup>-1</sup>, соответственно, относящихся к решетке ДНА. Из проведенного сравнения можно сделать вывод, что в самом конъюгате присутствует гексаглицин II. Следовательно, при указанных условиях синтеза конъюгата ДНА с глицином, скорее всего, глицин полимеризуется.



**Рисунок 5.** ИК-спектры 1 – конъюгата ДНА с глицином [218], 2 – гексаглицина II (а) и гексаглицина I (б) [219].

**Таблица 6.** Отклонение полос поглощения в ИК-спектрах гексаглицина I и II от полос поглощения конъюгата ДНА-глицин.

Конъюгат ДНА-глицин	Гексаглицин I	Гексаглицин II
Волновое число, см <sup>-1</sup>	Отклонение полосы поглощения, см <sup>-1</sup>	
Область 4000-2500 см <sup>-1</sup>		
3435	*	*
3302	+4	+1
3091	-25	-2
2952	*	+24
2929	-3	+6
2855	*	+1
Область 1800-400 см <sup>-1</sup>		
1648	-13	0
1559	-27	+2
1455	-21	*
1419	*	+4
1390	+15	-4
1338	-	-3
1282	-	-3
1246	-10	+8
1158	*	*
1129	*	*
1028	-15	-1
900	*	+2
698	+6	+8

Таким образом, наиболее вероятно, что к настоящему времени прививка глицина к поверхности ДНА описана в литературе только для его полимеризованной формы.

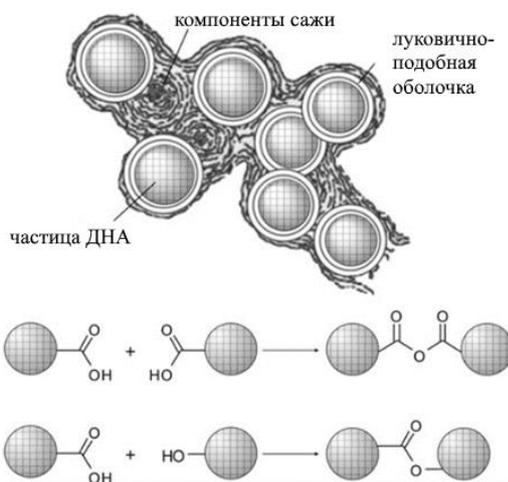
## 1.8. Дезагрегация порошков ДНА и приготовление гидрозолей

Известно, что первичные частицы ДНА (4-6 нм) склонны образовывать агрегаты с размерами частиц от 10 нм до нескольких микрон [220]. Природа этих агрегатов до сих пор полностью не ясна. Предполагается, что в экстремальных условиях детонационной волны на поверхности частиц ДНА образуются оборванные связи, которые могут образовывать прочные С-С связи между атомами углерода формирующихся частиц. К агрегации частиц ДНА может приводить образование водородных связей, диполь-дипольных или слабых Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между функциональными группами соседних частиц ДНА [221]. Агрегирование частиц ДНА может также происходить в процессе их выделения из АШ. Образование агрегатов из первичных частиц имеет обратимый характер и зависит от множества факторов, включая различные условия синтеза ДНА, очистки и способов дальнейшей обработки. Для определения агрегированности порошка ДНА разрабатываются новые оригинальные методики, например, на основе метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [222].

В работе [177] авторами было обнаружено, что по мере высушивания суспензии ДНА, нанесенной на предметное стекло, наночастицы путем самосборки собираются в волокноподобные и пленочные образования. Отношение размеров длина/ширина волокон была равна  $\sim 1000$ . В работе [223] авторы предложили объяснение этому явлению, допустив, что первичные частицы ДНА представляют собой усеченные октаэдры и их различные грани и ребра имеют различный электростатический потенциал (от отрицательного до положительного). Поэтому разноименно заряженные участки поверхности ДНА связываются между собой определенным образом за счет сил электростатического взаимодействия. Если энергия их взаимодействия близка к энергии связи С-С, то предложенная модель может объяснить самоорганизацию частиц ДНА.

Существуют и альтернативные точки зрения. В обзоре [224] приведены нескольких вероятных структур агрегатов частиц ДНА (Рис. 6). Среди агрегатов условно выделяют первичные ( $\sim 10$ -100 нм) [89] и вторичные (до мкм и больше), состоящие из первичных агрегатов. Вторичные агрегаты образуются, в основном, за счет сил электростатического взаимодействия между частицами ДНА и их легко разрушить, например, воздействием ультразвуковой обработки (УЗО). Однако первичные агрегаты гораздо прочнее вторичных и УЗО часто не приводит к их распаду. Одним из объяснений такой прочности агрегатов может служить связывание первичных частиц ДНА графитоподобной углеродной структурой (Рис. 6), которая покрывает поверхность агрегата, состоящего из нескольких первичных частиц ДНА [224]. При этом в образовании прочных агрегатов важную роль могут играть донорно-акцепторные и ковалентные связи (например, эфирные и пептидные [225]) между функциональными группами ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-$

$\text{NH}_2$ ) на поверхности первичных частиц ДНА (Рис. 6), за счет которых могут образовываться устойчивые агрегаты размером до нескольких сотен нм. Такая графитоподобная структура между частицами ДНА может свидетельствовать о некачественном выделении последнего из алмазной шихты. Так, в работе [79] авторы, применив широкий набор физико-химических методов, не обнаружили в частицах ДНА  $\text{sp}^2$ -углерода, принадлежащего связям  $\text{C}=\text{C}$ .



**Рисунок 6.** Модели структур для агрегатов ДНА [224].

Исходя из существующих представлений о строении частиц ДНА, для разрушения их агрегатов применяются механические, физические и химические методы.

К механическим методам можно отнести дезагрегацию в шаровой мельнице. Так, в работе Е. Osawa и др. [220] для дезагрегации порошка ДНА использовали шаровую мельницу с шариками из диоксида циркония ( $d = 30$  мкм). Для более качественного дробления по завершении процесса использовали УЗО полученной суспензии, что приводило к заметному снижению размера получаемых в ней частиц ( $\sim 4$  нм,  $c = 10$  % масс.). Недостатками данного метода являются загрязнение ДНА примесями диоксида и карбида циркония, а также применимость только к отдельным промышленным маркам ДНА.

Физическое воздействие ультразвуком является эффективным и наиболее часто применяемым способом дезагрегации ДНА. В работе [226] изучено влияние продолжительности УЗО на распределение частиц ДНА по размерам в водной суспензии. Показано, что наложение поля ультразвука приводит к неоднозначным эффектам. Так ДНА со средним размером частиц 23 нм после 5 мин УЗО имел размеры 96 нм, после 10 мин УЗО – 31 нм, а после 20 мин обработки вновь наблюдаются процессы агрегации.

Химические методы дезагрегации ДНА могут быть не менее эффективны, поскольку направленное модифицирование поверхности ДНА приводит к получению суспензий, стабильных в течение долгого времени.

В работе [227] показано, что с помощью отжига ДНА (>100 нм) в токе азота при 1000 °С с последующим окислением в токе воздуха при 450 °С средний размер частиц сокращается до ~15 нм. При этом более чем 50 % всех частиц ДНА имеют размер менее 50 нм.

По данным работы [228] отжиг ДНА (>100 нм) в токе водорода позволяет получить наночастицы с размером менее 10 нм. При этом электрокинетический потенциал частиц достигает более 60 мВ.

В ряде работ рассмотрена возможность получения стабильных суспензий в неводных средах. Например, в работе [226] авторы показали, что путем модифицирования поверхности ДНА триметилсилильными группами она приобретает гидрофобные свойства, что обеспечивает освобождение от адсорбционной воды и гидроксильных функциональных групп. Замена триметилхлорсилана на диметилвинилхлорсилан приводит к увеличению дисперсности ДНА (до ~15 нм) в полярной среде.

На практике самые лучшие результаты получаются при комбинировании различных методов дезагрегации. В работе [229] было изучено влияние различных схем обработки суспензии ДНА. Показано, что наиболее эффективна схема УЗО с последующим пропусканием суспензии через анионообменную смолу.

Несмотря на большое количество разработанных способов, по данным литературы, исследователям пока не удалось достичь полной дезагрегированности частиц ДНА при длительном хранении. Поэтому наиболее часто при возникновении потребности в суспензиях с частицами определенного размера используют фракционирование ДНА путем центрифугирования (ЦФ) [86, 229]. Известно, что изменение условий ЦФ позволяет выделять фракции частиц ДНА с определенными размерами [95]. Свойство частиц ДНА находиться в агрегатированном состоянии обычно считается отрицательным при его применении в биологии и медицине. Однако последние работы [6] показывают, что именно агрегаты ДНА (80 нм) обеспечивают необходимую загрузку ЛВ на поверхности ДНА и, следовательно, высокий терапевтический эффект. В частности, из-за узких пор в тканевых макрофагах время циркулирования агрегатов ДНА в крови повышается на порядок, что приводит к сохранению необходимого уровня концентрации иммобилизованного ЛВ внутри мишени, например, опухоли [190].

Поэтому можно сделать **вывод**, что для разработки систем доставки ЛВ на основе ДНА нет необходимости добиваться дезагрегации ДНА до первичных частиц, а необходимо контролируемо получать ДНА с разными размерами агрегатов, которые, в свою очередь, можно использовать для направленной разработки систем доставки ЛВ.

### 1.8.1. Спектрофотометрия суспензий ДНА

К настоящему времени опубликовано небольшое число работ, в которых авторы использовали метод спектрофотометрии для исследований свойств ДНА. Например, в работе [230] было теоретически показано, что метод УФС позволяет определять концентрацию ДНА по их оптической плотности.

В работе [231] было обнаружено, что поглощение ДНА зависит и от количества дефектов А-типа, на что, в свою очередь, влияет состав исходной смеси ВВ при получении ДНА. В работе [232] были изучены спектры поглощения гидрозолей наноалмазов (как материала для получения углеродных луковичных структур) в диапазоне 200–500 нм и показано, что поглощение монотонно возрастает с уменьшением длины волны.

В работе [233] исследованы спектры поглощения гидрозолей ДНА нескольких типов с различными размерами и концентрацией. Был обнаружен быстрый рост оптической плотности растворов при уменьшении длины волны излучения.

Наличие оптического ограничения у гидрозолей ДНА исследовано методом z-сканирования в работе [234]. Авторы предположили, что оно связано с нелинейным рассеянием лазерного излучения на пузырьках пара, которые возникают при передаче жидкости энергии, поглощенной углеродным материалом. Показано, что исследованные гидрозоли ДНА имеют высокую оптическую прочность и могут быть использованы в качестве надежных ограничителей лазерного излучения.

### 1.8.2. Определение концентрации гидрозолей ДНА

Определение концентрации гидрозолей ДНА является важной задачей при их использовании как носителей в биомедицинских исследованиях. Она обусловлена фракционированием частиц с помощью центрифугирования и тем, что вследствие низкой концентрации в растворе не всегда можно применять гравиметрический метод.

Тем не менее, практически во всех опубликованных работах определение концентрации ДНА в растворах выполнялось гравиметрическим методом. Известна всего одна работа [235], которая посвящена определению концентрации ДНА в гидрозолях методами спектрофотометрического анализа и термолинзовой спектрометрии. В ней установлено, что спектры поглощения гидрозолей ДНА подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера, поэтому, используя градуировочный график, можно точно определить концентрацию ДНА в гидрозоле. Было обнаружено, что в спектрах поглощения ДНА присутствуют компоненты как поглощения, так и светорассеяния, которые существенно влияют на формирование сигнала. Обнаруженные диапазоны измеряемых концентраций ДНА разных производителей в гидрозоле составили от 60 нг/мл до 2 мкг/мл. Особое внимание при изучении оптических свойств авторы уделили образцам

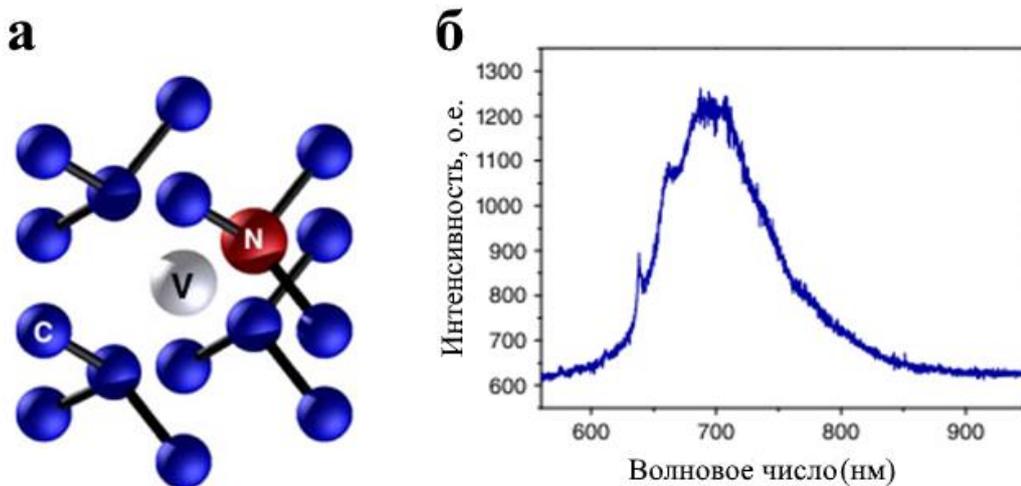
ДНА марки SDND («PlasmaChem»,ФРГ), наиболее, по их мнению, пригодных для биомедицинских приложений из-за их диспергируемости в воде. Для данных ДНА были определены пределы обнаружения (при  $\lambda = 488$  нм,  $l = 1$  см), составившие 10 мкг/мл для метода УФС и 0,6 мкг/мл - для метода термолинзовой спектроскопии.

### 1.9. Визуализация наноалмаза *in vitro* и *in vivo*

ДНА обладают устойчивой люминесценцией, которая связана с дефектами кристаллической решетки. В структуре алмаза было выявлено свыше 500 специфических оптических центров [236], некоторые из них, включая азот-вакантные (NV) [237], кремний-вакантные (SiV) [238], никель-сопряженные [239] и хромсодержащие центры [240], могут быть применены в области квантовых технологий [241] и биомедицинской визуализации [242].

Наиболее изученные NV-цветовые центры характеризуются стабильной фотолюминесценцией при комнатной температуре и оптически измеряемыми спиновыми состояниями [243]. NV центры представляют собой атомарные примеси в структуре алмаза, содержащие замещающий атом азота рядом с вакансией в кристаллической решетке (Рис. 7, а). Наличие вакансии обуславливает отрицательный либо нейтральный заряд NV центров [244].

Ряд способов обработки позволяет искусственно создавать NV центры в алмазах, например, имплантация азота [245], облучение пучком электронов [246] или ионов [247]. В аспекте биовизуализации наибольшего внимания заслуживает свойство NV центров в результате оптического возбуждения при  $\lambda = 480-580$  нм излучать широкую полосу люминесценции с максимумом при 690 нм (Рис. 7, б) и продолжительностью возбужденного состояния примерно 17 нс [175].



**Рисунок 7.** а) схематическое изображение азот-вакантного (NV) центра в алмазе; б) спектр люминесценции NV центра при  $T_{\text{комн.}}$  (лазер с длиной волны  $\lambda = 532$  нм) [107].

ДНА с NV центрами обладают определенными характеристическими свойствами, обуславливающими преимущество их использования в качестве зондов в биомедицинской визуализации по сравнению с традиционными флуорофорами, будь то органические флуоресцентные красители или квантовые точки. Биозонды на основе квантовых точек отличаются относительно длительной люминесценцией и регулируемой длиной волны излучения [248]. Вместе с тем, пульсация и постепенное затухание люминесценции не позволяет использовать квантовые точки в визуализации среднепродолжительных и долговременных биологических процессов [249]. Кроме того, квантовые точки при проникновении в клетку оказывают длительный цитотоксический эффект [244].

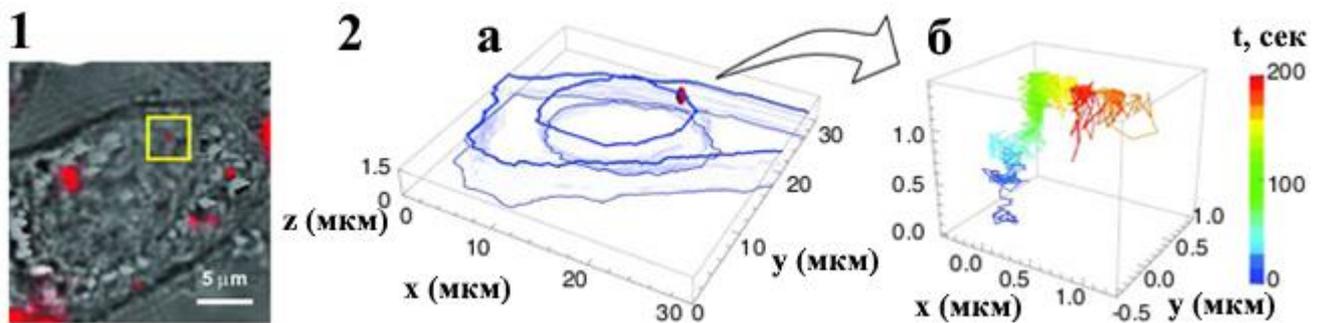
ДНА с NV центрами, напротив, проявляют фотостабильность, низкую цитотоксичность и близкий к единице квантовый выход. Излучение ДНА, содержащих NV центры с длиной волны 625–800 нм, способно проникать в ткани и находиться за пределами области аутофлуоресценции клетки (300-500 нм) [250]. Хотя яркость отдельной квантовой точки в 3 раза выше, чем у ДНА, содержащего один NV центр, оптимизация производства может позволить повысить интенсивность флуоресценции ДНА до уровня квантовых точек и выше. Совокупность перечисленных качеств делает ДНА перспективным кандидатом для визуализации долговременных биологических процессов.

Благодаря модифицируемой поверхности ДНА, возможно направленное присоединение к ней большого разнообразия молекул БАВ и ЛВ, а физические свойства – позволяют задействовать различные методики обнаружения. Как следствие, существует ряд многорежимных схем обнаружения ДНА, позволяющих определять и отслеживать оптические и спиновые характеристики как *in vitro*, так и *in vivo*. Помимо растущего интереса к ДНА в области исследований физиологических процессов внутри клетки они также востребованы в направленной доставке биологических объектов с целью прекращения либо регулирования клеточных функций.

Сочетание изображения и сигнала светлопольной и широкопольной эпифлуоресценции позволяет выстраивать трехмерные изображения и траектории ДНА (Рис. 8) [175, 205, 247] на основании наблюдений за перемещением одиночной частицы внутри клетки. Поскольку ДНА не проникают в ядро клетки [247, 205, 158] и обладают яркой флуоресценцией за пределами области аутофлуоресценции клетки [175], они могут быть использованы в качестве цитоскелетных меток в концентрациях порядка 1 мкг/мл и обнаружены методом конфокальной микроскопии [108]. Кроме того, благодаря продолжительному времени излучения NV центров (~17 нс) [175] по сравнению с аутофлуоресценцией клетки для усиления сигнала ДНА может применяться конфокальная визуализация с временным селектором [251]. В дальнейшем улучшить разрешение

и контраст и минимизировать фоновый шум позволяет микроскопия двухфотонного возбуждения [247].

На основе флуоресценции ДНА применялся метод цитометрии [181]. В ходе этих исследований ДНА проникали в клетки либо прикреплялись к ним за счет специфических молекул. Количественные данные были получены по флуоресценции, испускаемой популяцией клеток, в установке для флуоресцентной сортировки клеток (FACS-Array), а также по отдельным клеткам в поточном цитометре [181, 202, 252]. Указанные техники применимы в случае необходимости сбора данных с большого количества клеток. Они успешно используются в трекинге с флуоресцентными гранулами полистирола на клеточных линиях макрофагов (на основании их фагоцитарной функции) *in vivo* [253].



**Рисунок 8.** Совмещение светопольного и эпифлуоресцентного микроизображений ДНА в 1) - живых клетках Неа. 2, а – воссозданное микроизображение клетки; 2, б – трехмерный трекинг отдельной частицы НА размером 35 нм за период 200 с (отмечена желтой областью в блоке) [247].

Перспективность использования ДНА в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) связана с возможностью мониторинга внутриклеточных процессов в неповрежденных тканях с учетом их степени специфичности, чего не позволяет традиционная МРТ и что имеет особое значение для визуализации специфических клеточных процессов, к примеру, связывания с рецептором. Существующие контрастные вещества в той или иной мере отвечают поставленному требованию, делая возможным отслеживание специфических клеток или рецепторов *in vivo* [254]. Вместе с тем, это сопряжено с низкой чувствительностью определений и потенциальной токсичностью контрастных агентов [255].

Один из способов получения контрастных агентов на основе ДНА заключается в присоединении магнетиков, например, комплексов Gd (III) к поверхности ДНА [256]. В присутствии парамагнитного металла сокращается время продольной (спиновой-решеточной) релаксации ( $T_1$ ) протонов водорода в прилегающих тканях, что обуславливает контрастность  $T_1$ -взвешенного изображения [257]. Данная техника применялась с целью повышения

контрастности МРТ, для чего ДНА с ковалентно модифицированной поверхностью были конъюгированы с комплексами Gd (III) [256].

Другой подход состоит в определении спина ядра  $^{13}\text{C}$  в самом ДНА. Его недостатком является низкая чувствительность ядерного магнетизма в сочетании с редкой распространенностью в природе спин-активного изотопа  $^{13}\text{C}$  (1,1%) по сравнению с изотопом  $^{12}\text{C}$ . Для преодоления данного ограничения применяют ДНА, выращенные из сырья с высоким содержанием  $^{13}\text{C}$ , или прибегают к гиперполяризации ядер [258], что значительно усиливает сигнал ЯМР- $^{13}\text{C}$ .

Еще один подход к визуализации ДНА в организме связан с получением на их поверхности флуоресцентных меток, обладающих узкой полосой люминесцентного сигнала (XenoFluor 750), и радиоактивных меток. Так, для визуализации ДНА при изучении его абсорбции (биораспределения в организме) (см. далее раздел «Биораспределение ДНА в организме») использовали изотопы  $^{188}\text{Re}$  [259],  $^{125}\text{I}$  [260],  $^{18}\text{F}$  [261],  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  [262]. Однако, данные радиоизотопы имеют ряд ограничений при применении, в частности, короткое время жизни. Поэтому поиск новых безопасных радиометок с долгим временем жизни для визуализации ДНА является актуальной задачей.

## 1.10. Биораспределение ДНА в организме

Изучению поведения частиц наноалмаза *in vivo* уделено пока еще недостаточно внимания. Этот вопрос рассматривается всего в нескольких работах. Так, первая работа по изучению биораспределения наноалмаза была выполнена с применением радиоактивной метки  $^{125}\text{I}$  [260]. Однако, в ней использовался не ДНА, а НА, полученный дроблением крупных искусственных кристаллов алмаза. Образовавшиеся наночастицы размером ~50 нм имели острые сколотые углы. Установлено, что эти НА быстро накапливаются в печени (~40%), в меньшей степени в легких (~6%) и селезенке (~1%). Испытания на 28 день после введения показали, что ~60% НА сконцентрировано в печени и менее 10% – в легких. Полученные результаты свидетельствуют о ведущей роли тканевых макрофагов в абсорбции (распределении, метаболизме и экскреции) наноалмаза наряду с прочими твердыми частицами в крови. Однако степень усвоения может варьировать в зависимости от природы вещества, конъюгированного с НА. В соответствии с возможной загрузкой, механизм захвата имеет функциональное значение как для органов, так и для отдельных клеток [107].

В работе [259] исследовано на мышях биораспределение ДНА (2-8 нм) и чистотой более 95% при интрахеальном введении в течение 48 ч с помощью радиоактивного изотопа  $^{188}\text{Re}$ .

Установлено, что ДНА распределяются в селезенке, печени, костях и сердце при максимальном накоплении в легких.

В работе [263] изучали токсичность, накопление и механизм выведения из легких у мышей ДНА (5 нм) и раздробленного синтетического наноалмаза (50 нм) при их интрахеальном введении. На основании гистопатологических и ультраструктурных исследований авторы пришли к заключению, что наноалмазы не оказывают очевидных негативных эффектов на легочную ткань в течение всего исследуемого периода (28 дней). Выведение ДНА из легких связано с поглощением их альвеолярными макрофагами и последующим клиренсом в трахею и затем в глотку.

В работе [262] было изучено биораспределение *in vivo* ДНА как отдельно, так и совместно с УНТ. Для их визуализации использовали радиоактивную метку  $^{99}\text{Tc}$ . При однократном внутривенном введении мышам ДНА он преимущественно накапливался в печени, селезенке и легких. Спустя 24 ч количество аккумулированного ДНА в легких снижалось, а в печени и селезенке продолжало накапливаться. По мнению исследователей, это связано с перемещением наночастиц из легких в кровеносную систему, а затем последовательно в печень и селезенку. Высокое накопление ДНА в органах обусловлено малым размером наночастиц и их быстрым захватом тканевыми макрофагами через опсонизацию за счет связывания опсониев с наноалмазами и поглощения их макрофагами. При совместном введении наноалмаза и нанотрубок биораспределение наноалмаза *in vivo* существенно меняется. Так, при увеличении в смеси содержания нанотрубок накопление ДНА в печени и селезенке животного уменьшается, но при этом постепенно увеличивается их количество в легких. В свою очередь, наноалмазы не оказывали существенного влияния на биораспределение УНТ *in vivo*.

Методом позитронно-эмиссионной томографии в работе [261] было изучено биораспределение ДНА с меткой  $^{18}\text{F}$ . Показано, что ДНА накапливались в большей степени в легких, селезенке и печени и экскретировались мочевыделительной системой. После удаления методом фильтрации частиц с большим кинетическим размером поглощение ДНА в легких и селезенке слегка уменьшалось, а накопление в печени снизилось значительно.

Таким образом, к настоящему времени биораспределение ДНА *in vivo* изучено недостаточно, прежде всего, влияние ДНА на органы и ткани животных в норме. Данные являются разрозненными и выполнены на разных видах алмазных частиц, в том числе, совместно с нанотрубками. Также отсутствуют данные о долговременном накоплении (кумуляции) и выведении ДНА из организма. Поэтому изучение биораспределения и выведения ДНА из организма в течение длительного времени является чрезвычайно актуальной задачей при его использовании как носителя в системах доставки БАВ и ЛВ.

## 1.11. Биологическая активность и токсичность ДНА

Первым исследователем, предложившим использование ДНА в медицине, был В.Ю. Долматов [87]. Он обнаружил, что ДНА обладают высокой сорбционной активностью к патогенным вирусам, микробам и бактериями и могут быть использованы в качестве адсорбента *in vivo* [89]. При этом, благодаря стабильности и свойственной  $sp^3$ -углероду биосовместимости, биохимические и цитохимические взаимодействия ДНА с клеткой минимальны [264]. Действительно, результаты исследований повреждения митохондрий в различных линиях клеток подтвердили крайне низкую токсичность ДНА [264]. В ряде работ была также изучена цитотоксичность ДНА, которая показала его хорошую биосовместимость на таких культурах клеток, как: клетки аденокарциномы легких человека [108, 265, 266]; клетки HeLa (карцинома шейки матки человека) [251, 267]; кератиноциты [171, 268]; клетки нейробластомы [268]; клетки РС-12 [268]; фибробласты легких [265]; эмбриональные фибробласты [266, 267]; клетки почек человека [269]; остеопрогениторные клетки [267]; макрофаги [268]; нейтрофилы [270].

Подтверждением биосовместимости ДНА *in vitro* служат показатели экспрессии белков [265], клеточной пролиферации и дифференциации [267], а также уровень апоптоза [265]. Об этом свидетельствует и низкий уровень активных радикалов кислорода в обработанных клетках, тогда как его повышение указывает на клеточный стресс [268]. При продолжительном воздействии различия между обработанными клетками рака легких, эмбриональными фибробластами и контрольными группами незначительны либо не выявлены [266]. Таким образом, в отличие от прочих наномаркеров, в частности, квантовых точек, проявляющих со временем биотоксичность [244], в литературе приведены убедительные доказательства биосовместимости *in vitro* меток на основе ДНА.

Большое количество работ посвящено изучению воздействия ДНА на клеточном уровне и механизмам их проникновения в клетку. Оптические измерения люминесценции [269] или спектров КРС [108] показали, что ДНА захватываются и, как правило, локализуются во внутриклеточных везикулах, не проникая в ядро. Это подтверждено данными просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии [266].

Существуют различные предположения относительно механизма проникновения ДНА в клетку [271, 272, 266]. Результаты исследований ДНА с размерами 25-30 нм указывают на преобладание рецептор-опосредованного и клатрин-зависимого механизмов [267, 205]. Так, проникновению ДНА с размерами 140 нм в значительной мере препятствует обработка клеток азидом натрия и 2-дезоксиглюкозой, приводящая к дефициту доступной энергии для проникновения, или оксидом фениларсина, специфическим ингибитором клатрина; с другой стороны, филиппин, специфический ингибитор кавеолина, не дает подобного результата. Однако,

размер наноалмазных частиц, конъюгированные функциональные группы, среда и тип клеток оказывают определенное влияние на данный процесс. Например, в работе [273] установили, что ДНА с размерами 100 нм, конъюгированные с трансферрином, захватываются многочисленными трансферриновыми рецепторами на поверхности клеток HeLa по аналогичному клатрин-зависимому механизму. С другой стороны, в работе [274] ДНА того же размера, конъюгированные с гормоном роста, оставались вне клеток A549, предположительно присоединяясь к связывающему участку рецептора гормона роста на их поверхности, тогда как контрольные неконъюгированные ДНА проникали в клетки. Могут быть задействованы и иные рецептор-опосредованные механизмы проникновения. Например, ДНА, конъюгированные с фолатом, захватываются клетками путем кавеолин-зависимого эндоцитоза [205]. В работе [270] было показано, что ДНА проникают в нейтрофилы по двум механизмам – фагоцитарно и посредством трансмембранной диффузии. Эти результаты были подтверждены в 2015 году в работе [275], где было показано, что захват ДНА макрофагами может осуществляться пиноцитозом и эндоцитозом.

Осуществленные механизмы абсорбции ДНА в организме и биосовместимость *in vitro* и *in vivo* обуславливают перспективность применения ДНА в качестве маркеров и носителей БАВ и ЛВ.

Недавние исследования показали [276], что размер, форма, поверхностный заряд и функциональность поверхности наночастиц может изменять характер их взаимодействия с клеткой. Принято считать, что ДНА является наноматериалом с минимальной токсичностью [3], хотя появляется все больше доказательств, что именно окисление поверхности ДНА может являться фактором, усиливающим его токсичность. Так, в работе [277] установлено, что под воздействием окисленных частиц ДНА происходит повреждение ДНК в эмбриональных стволовых клетках. В то же время в работе [278] обнаружена бактерицидная активность ДНА, отожженных в воздухе. В последнем исследовании Silbajoris и др. [279] с целью идентификации химических детерминантов и молекулярных механизмов ингаляционной токсичности углеродных наноматериалов выявили соотношение между химией поверхности ДНА и его биологической активностью. В предыдущем исследовании [280] эти авторы обнаружили, что коммерческие ДНА с положительным  $\zeta$ -потенциалом индуцируют мощную экспрессию воспалительного хемокина интерлейкина-8 (IL-8) в культуре эпителиальных клеток дыхательных путей человека. Было выявлено, что механизм, включающий ДНА-индуцированную IL-8 экспрессию, зависит от производства внутриклеточной перекиси водорода. При этом ДНА, окисленный воздухом, содержащий повышенное количество карбоксильных групп и имеющий высокий отрицательный  $\zeta$ -потенциал, проявляет низкую биологическую активность, что определено уровнем IL-8. Авторы полагают, что существует корреляция между изменениями в

составе кислородсодержащих поверхностных групп ДНА и снижением его биологической активности. При этом  $\zeta$ -потенциал, отражающий функциональный состав окисленной поверхности ДНА, может являться основным фактором, определяющим биологическую активность ДНА. Ее понижению может способствовать также удаление поверхностных радикалов.

В работе [281] исследовано влияние ДНА на шести видах клеток человека (клетки легких, почек, толстой кишки, печени). Было показано, что ДНА с размерами частиц 20 и 100 нм эффективно проникают в клетки и не вызывают каких-либо цитотоксических или генотоксических эффектов в дозе, вплоть до концентрации 500 мкг/мл. В качестве сравнения можно привести работу тех же авторов [282], где частицы  $\text{SiO}_2$  размером 25 нм при концентрации в 10 раз ниже по сравнению с ДНА показали в 9 раз больший генотоксический эффект.

Исследования токсичности ДНА *in vivo*, проведенные в разных работах, показали неоднозначный результат. Так, в работе [171] при нанесении ДНА на кожу мышей не отмечено контактной гиперчувствительности либо других аллергических реакций. При введении частиц ДНА (4 нм) в трахею мышей в дозировке 1 мг/кг в результате фагоцитоза альвеолярными макрофагами в течение 24 ч количество наблюдаемых в альвеолах ДНА уменьшалось. Гистопатологические и ультраструктурные исследования на 7, 14 и 28 день после введения не выявили негативных воздействий на легкие; также не было установлено случаев миграции ДНА в кровотоки и/или другие органы [263]. Однако в другом исследовании с внутритрахеальным введением значительно более высоких доз (4 и 20 мг/кг) ДНА у мышей отмечались некоторые признаки токсической реакции в короткие сроки (3 дня) [259].

Исследование токсичности ДНА проводилось и с применением более инвазивных техник введения: подкожных, внутрибрюшинных и внутривенных инъекций. При подкожном [162] и внутрибрюшинном [283] введении соответственно мышам и крысам наноалмазные агрегаты обнаруживались рядом с неповрежденными клетками [162] и вызывали небольшую воспалительную реакцию [283]. Кроме того, у мышей не наблюдалось потерь в весе и прочих клинических симптомов интоксикации даже спустя 28 дней после внутривенных инъекций ДНА [260]. Тем не менее, при внутривенном введении ДНА кроликам отмечено кратковременное повышение уровня сывороточного билирубина, что указывает на усиление лизиса эритроцитов даже при постоянстве количества эритроцитов и концентрации гемоглобина. Отмечен также ряд других изменений метаболизма как, например, снижение уровня сывороточного холестерина и липопротеинов низкой плотности и повышение триглицеридов, что, вероятно, связано с накоплением ДНА в печени [162]. В работе [259] гистологический анализ срезов органов животного после введения частиц ДНА показал, что они могут вызывать дозозависимую токсичность по отношению к легким, печени, почкам и крови.

Можно предположить, что противоречивые данные о токсичности ДНА могут быть вызваны его недостаточной очисткой после выделения из АШ, а также отсутствием в рассматриваемых работах спецификации наличия примесей и функционального состояния ДНА и/или подробной «историей» образца ДНА. Например, имеются сведения о зависимости токсичности углеродных материалов, в частности, УНТ от природы и концентрации в них металлосодержащих примесей [284].

Вместе с тем, в ряде медицинских работ гистоморфологические исследования показали биосовместимость и нетоксичность ДНА [285, 286]. В диссертации А.Г Тяна [285] было изучено хроническое действие гидрозолей ДНА (100 нм, до 0,05% масс.) при их пероральном введении мышам в течение 6 мес. При суммарном количестве использованных ДНА до 0,45 г морфологических изменений органов мышей не было обнаружено. Состояние всех органов, в том числе органов выделительной системы, не отличалось от контрольной группы. В диссертации Л.И. Лазаренко [286] было установлено, что гидрозоли ДНА не влияют на ткани пародонта животных, так как не было обнаружено признаков воспаления в области инъекции и в пародонте зубов. При этом ДНА оказывают положительное действие, уменьшая острый воспалительный процесс в тканях пародонта. В частности, на слизистой оболочке десны уменьшается воспаление, уменьшается глубина зубодесневых карманов.

В единственной работе [89] была изучена острая токсичность ДНА и определено значение LD<sub>50</sub> (мыши, per os), составившее более 7,5 г/кг.

**Вывод:** данные о токсичности ДНА *in vitro* и *in vivo* неоднозначны, требуют дополнительного изучения и подтверждения с учетом чистоты ДНА, функционального состава, размеров частиц и т.д.

## 1.12. Применение ДНА в биомедицинских приложениях

Попытки использования ДНА в биомедицинских приложениях известны с 1995 г., в частности, в качестве носителя для доставки антигенов в организм [110]. Широкое биомедицинское изучение ДНА началось с 2000 г., при этом сам ДНА рассматривали как БАВ [287]. Было отмечено [288, 289], что применение суспензий ДНА облегчает состояние онкологических больных, по-видимому, вследствие снижения уровня интоксикации организма. Кроме того, ДНА был использован как средство коррекции процессов пероксидного окисления белков и липидов при росте злокачественных новообразований.

Привлекательность биомедицинских приложений ДНА обусловлена совокупностью его свойств: биосовместимостью, возможностью конструирования функциональной поверхности частиц, сильной и специфической адсорбцией/конъюгированием ЛВ и биомолекул, развитой

удельной площадью поверхности, наличием стабильной флуоресценции. Уже предложено применять ДНА для создания биомаркеров, биосенсоров, высокоэффективных адсорбентов, покрытий имплантатов и хирургических инструментов, косметических композиций, например, кремов, защищающих от УФ излучения; как добавку в стоматологические материалы и, особенно, как носитель БАВ и ЛВ в их системах доставки [83]. Развитая поверхность ДНА, несущая определенный набор функциональных возможностей, идеальна для конъюгации с различными соединениями [290]. Назначение носителя определяется его несущей способностью (емкостью загрузки), а также способностью сохранять и поддерживать терапевтический эффект иммобилизованных веществ. Большая несущая способность означает высокую концентрацию доставляемого вещества при малом количестве самого носителя. В настоящее время ДНА являются объектом интенсивных исследований, направленных на усовершенствование доставки низкомолекулярных веществ и биотехнологических продуктов, в особенности, химиотерапевтических агентов.

Тем не менее, количество работ, посвященных использованию ДНА в системах доставки ЛВ, незначительно. Для подтверждения значимости и достоверности полученных доклинических результатов и перспективности клинического применения ДНА в качестве носителя для доставки БАВ и ЛВ требуется проведение дополнительных комплексных исследований.

\* \* \*

Таким образом, проведенное исследование научных публикаций подтвердило возможность и принципиальную перспективность применения ДНА как наноносителя в системах доставки БАВ и ЛВ и выявило ряд проблем, решение которых позволит успешно использовать ДНА для этой цели. Наиболее значимыми нерешенными до настоящего времени задачами являются:

- стандартизация ДНА;
- разработка и оптимизация способов функционализации ДНА и прививки БАВ и/или ЛВ на его поверхность;
- получение устойчивых гидрозолей ДНА с размерами частиц менее 100 нм;
- количественная визуализация ДНА *in vitro* и *in vivo*;
- характер биораспределения ДНА по основным органам экспериментальных животных в течение длительного времени;
- определение токсического действия ДНА и конъюгатов ДНА-БАВ *in vitro* и *in vivo*;
- определение специфической активности ДНА и его конъюгатов ДНА-БАВ.

Решение этих задач можно рассматривать как этап доклинического изучения ДНА и его конъюгатов ДНА-БАВ.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Объекты исследования

#### 2.1.1. Детонационные наноалмазы

В работе использовали ДНА марок УДА-ТАН, УДА-СФ и УДА-СТП, полученные в ФГУП «СКТБ «Технолог» (ЗАО «Алмазный центр») (г. Санкт-Петербург,) в соответствии с ТУ 05121441-275-95, а также образцы ДНА ряда зарубежных фирм-производителей (Табл.7).

Сравнение физико-химических свойств ДНА было выполнено на 4 промышленных марках от 3 производителей. Фирмы-производители, шифры образцов и примесный состав приведены в Табл. 7. Далее эти образцы ДНА обозначаются римскими цифрами.

Прививка иммобилизуемых соединений на поверхности ДНА выполнена на примере ДНА марки УДА-ТАН. Для сравнения прививка цистеина выполнена на образцах ДНА разных марок. Биологические и фармакологические исследования ДНА, за исключением сравнительного исследования токсичности *in vitro* разных марок ДНА, выполнены с использованием образцов ДНА марки УДА-ТАН.

Таблица 7. Образцы ДНА, исследованные в работе.

Фирма - производитель	Торговая марка	Шифр образца	Примеси, указанные производителем в спецификации
«PlasmaChem», Германия	PL-D-G01	I	зольность < 1.4%
«Adamas nanotechnologies», США	Standart ND	II	несгораемые примеси 1.7 % масс.
«PlasmaChem», Германия	PL-SDND	III	Fe<0.3; Cu<0.01; Zn<0.01; Mn<0.01; Si+Cr+Ca+Ti<0.01, зольность < 1.4%
ЗАО «Алмазный центр», Россия	УДА-ТАН	*IV <sub>A</sub>	несгораемые примеси 0,85% масс.
		*IV <sub>B</sub>	

\* – образцы ДНА IV<sub>A</sub> и IV<sub>B</sub> являются образцами одной торговой марки, но приобретены из разных партий.

#### 2.1.2. Иммобилизуемые соединения

Для иммобилизации на поверхность ДНА были выбраны вещества, представленные в Табл. 8. Выбор этих соединений был обусловлен наличием у них определенных функциональных групп (–NH<sub>2</sub>, –OH, –COOH), которые могут взаимодействовать с функциональными группами на поверхности ДНА.

Таблица 8. Вещества, выбранные для иммобилизации на поверхность ДНА.

Иммобилизуемые вещества	Функциональный вид	ФГ вещества для связывания с ДНА	ФГ ДНА для связывания
Этилен- и гексаметилендиамин (Acros)	Линкеры	-NH <sub>2</sub>	-Cl, -F
Трийодбензиловый спирт (Sigma-Aldrich)	Рентгеноконтрастная метка	-OH	-Cl
Тритий	Радиоактивная метка	- <sup>3</sup> H	-H
Глицин (Fluka), цистеин (АО «Реахим»)	Аминокислоты	-NH <sub>2</sub>	-Cl
Амикацин (ОАО «Красфарма»)	Антибиотик	-NH <sub>2</sub>	-Cl
Янтарная кислота (АО «Реахим»)	Интермедиат цикла Кребса	-COOH	-OH
Неорганическая пирофосфатаза	Узкоспециализированный фермент	-COOH	-NH <sub>2</sub>
Трипсин, химотрипсин (ОА «Реахим»), папаин (Merck)	Протеолитические ферменты	-NH <sub>2</sub>	-COOH

Этилен- и гексаметилендиамин являются линкерами, которые можно, изменяя конформационную подвижность, использовать для связи между БАВ или ЛВ и поверхностью ДНА. Трийодбензиловый спирт, привитый на поверхность ДНА, за счет наличия тяжелых атомов йода в бензольном кольце можно использовать в качестве рентгеноконтрастной метки. Тритий является одной из наиболее удобных радиоактивных меток для исследования биофармацевтических параметров АРМЭ (адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция) БАВ и ЛВ, в том числе, углеродных наноструктур и их конъюгатов. Цистеин и глицин являются аминокислотами, причем цистеин применяется при лечении ревматоидного артрита, бронхита, эмфиземы легких, рака. L-цистеин зарегистрирован как пищевая добавка E920. Глицин является центральным медиатором тормозного действия и применяется как ЛС, уменьшающее явление абстиненции и неврологические нарушения, в том числе, в комплексной терапии при лечении ишемического инсульта. Амикацин является полусинтетическим аминогликозидным антибиотиком II ряда с противотуберкулезной активностью. Протеолитические ферменты трипсин и химотрипсин применяются в медицине для лечения воспалительных заболеваний дыхательных путей, ожогов, гнойных ран (местно) и в пищевой промышленности. Папаин применяется при нарушении функции пищеварения, в практической паразитологии для избавления от гельминтов, амёб, а также в комплексной терапии при лечении диабета, геморроя, гастрита и целиакии (глютеновой энтеропатии). Узкоспециализированный фермент

неорганическая пирофосфатаза катализирует реакцию гидролиза пирофосфата до двух молекул фосфата и может в перспективе стать средством для лечения пирофосфатной артропатии (псевдоподагры) – болезни отложения в суставах и околоуставных жидкостях микрокристаллов пирофосфата кальция.

### 2.1.3. Экспериментальные животные

В работе были использованы экспериментальные животные: мыши, крысы и кролики, содержащиеся по правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований (см. Приложение). Всего в работе было использовано 352 мыши, 60 крыс и 44 кролика. Все эксперименты были выполнены в соответствии с общепринятыми этическими нормами (см. Приложение). Данные использованных в экспериментах животных приведены в Табл. 9.

Таблица 9. Животные, использованных в проведенных экспериментах.

Вид эксперимента	Вид животных/ Количество	Данные животных	Источник происхождения животных
Изучение диффузии на биомембране	Крысы, 2 шт.	Белые беспородные, самцы, масса 300 г	Виварий РязГМУ им. И.П.Павлова
Биораспределение ДНА (метод РКТ)	Кролики, 14 шт.	Порода шиншилла, самцы и самки, масса 2,7-4,9 кг	Виварий РязГМУ им. И.П.Павлова
Биораспределение ДНА (метод ИСП-МС)	Кролики, 30 шт.	Порода шиншилла, самцы и самки, вес 2,6-4,9 кг	Виварий РязГМУ им. И.П.Павлова
Биораспределение ДНА с тритиевой меткой	Мыши, 90 шт.	Инбредные, линия BALB/c, вес 18-22 г	Виварий ЦНИИТ РАМН
Биораспределение ДНА с тритиевой меткой	Крысы, 13 шт.	Белые беспородные, самцы, вес 250-260 г	Виварий 1-го МГМУ им. И.М. Сеченова
Острая токсичность	Мыши, 120 шт.	Линия BALB/c (самцы, масса 18-22 г).	ГУ НЦБМТ РАМН
Побочные эффекты ДНА	Мыши, 42 шт.	Белые беспородные половозрелые, самцы, масса 20-24 г	ГУ НЦБМТ РАМН
Митохондральная активность	Крысы, 5 шт.	Линия Wistar, самцы, масса 230-250 г	ГУ НЦБМТ РАМН
Антигипоксическая активность ДНА-глицин	Мыши, 100 шт.	Белые беспородные половозрелые, самцы, масса 23-28 г	Виварий ИТЭБ РАН
Противоинсультная активность ДНА-глицин	Крысы, 40 шт.	Белые беспородные половозрелые, самцы, масса 300 г	ГУ НЦБМТ РАМН

## 2.2. Физико-химические методы исследования и приборы.

### *Электронная микроскопия*

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Электронно-микроскопические изображения образцов ДНА были получены на сканирующем электронном микроскопе LEO 1455 VP (Carl Zeiss, ФРГ) с детектором Centarius. Для съемки образцы наносили на проводящий двухсторонний скотч и помещали в камеру микроскопа, где создавалось давление  $10^{-5}$  Торр.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Электронно-микроскопические изображения образцов ДНА были получены на просвечивающем электронном микроскопе ультравысокого высокого разрешения марки JEM-2100 F (JEOL, Япония) с разрешением  $2 \text{ \AA}$  в точке и  $1 \text{ \AA}$  в решетке.

### *ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием* (ИКС)

ИК-спектры образцов ДНА регистрировали в таблетках с KBr на ИК-спектрометре с Фурье-преобразованием IR200 Thermo Nicolet (Thermo Scientific, США) с разрешением  $2 \text{ см}^{-1}$ , число сканов 200. Для возможности количественной оценки результатов всегда брали одну и ту же навеску ДНА (0,80 мг), смешивали с порошком KBr (140,0 мг), предварительно просушенным в вакууме, отбирали 75,0 мг перетертой смеси, прессовали в таблетку и помещали в спектрометр. Отнесение полос поглощения проводили на основе данных, приведенных в [291, 292].

### *Спектроскопия комбинационного рассеяния* (КРС)

КР-спектров регистрировали спектрометром Ramanog U1000 (Jobin Yvon, Франция). С разрешающей способностью  $0,05 \text{ \AA}$ . В качестве источника излучения использовался перестраиваемый аргоновый лазер Stabilite 2017 (Spectra-Physics, США). Измерение проводили с длиной волны лазера 514 нм. Диаметр пучка, сфокусированного на поверхность исследуемого образца, составлял примерно 5 микрон. Съемку спектров комбинационного рассеяния ряда образцов ДНА проводил также на спектрометре с лазерным излучением на ионах аргона с длиной волны 488 нм. Спиртовые суспензии порошков ДНА (порядка 3-5 мг порошка) помещали в тонкие капилляры и запаивали. Образцы облучали лазерным излучением и фиксировали КР-спектры.

### *Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия* (РФЭС)

Анализ химического состава поверхности образцов ДНА проводили на приборе LAS-3000 («Riber», Франция), оснащенном полусферическим анализатором ОРХ-150. Для возбуждения фотоэлектронов использовали немонахроматическое рентгеновское излучение алюминиевого анода ( $AlK\alpha = 1486,6 \text{ эВ}$ ) при напряжении на трубке 12 кВ и токе эмиссии 20 мА. Калибровку фотоэлектронных пиков проводили по линии углерода C 1s с энергией связи 285 эВ. Вакуум в рабочей камере создавался ионным насосом и составлял  $7 \cdot 10^{-8}$  Па.

### ***Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)***

Изучение термохимических свойств исходных ДНА выполняли на калориметре Mettler DSC-30 (Mettler Toledo, США) в интервале температур от  $-80$  до  $+30$  °С. В предварительно взвешенный на термовесах Mettler TG50 алюминиевый тигель (массой около 50 мг) помещали навеску ДНА (порядка 20 мг). Затем в этот же тигель добавляли небольшое количество воды, завальцовывали тигель и снова взвешивали; по разности масс находили массу добавленной воды. Пасту охлаждали парами жидкого азота до температуры  $-80$  °С, а затем нагревали с постоянной скоростью 5 град/мин до 30 °С.

### ***Динамическое рассеяние света (ДРС)***

Измерение размеров наночастиц и величины  $\zeta$ -потенциала проводили на приборе Zetasizer Nano ZS Zen3600 («Malvern Instruments», Великобритания). Перед проведением измерений образцы гидрозолей ДНА подвергали ультразвуковой обработке.

### ***Рентгенофазовый анализ (РФА)***

Изучение рентгенограмм исследуемых образцов ДНА осуществляли на порошковом рентгеновском дифрактометре STOE STADI P (STOE & Cie, ФРГ) в геометрии  $\Theta/\Theta$  с  $\text{CuK}\alpha$  излучением. Для определения среднего размера области когерентного рассеяния (ОКР) наноалмаза использовали метод аппроксимаций, основанный на анализе интегральной ширины дифракционных максимумов (111) и (200), которые регистрировали с шагом  $0,05^\circ$  и временем 50 с на точку. Расчет размеров ОКР проводили по формуле Шеррера.

### ***Гамма-активационный анализ (ГАА)***

Для проведения гамма-активационного анализа в качестве источника тормозного излучения использовали циклический ускоритель электронов «Микротрон-Ст» (Россия) [293]. Ускоритель имел следующие параметры: энергия электронов – 21 МэВ; ток пучка электронов – до 10 мкА; частота повторения импульсов – 200 и 400 Гц; длительность импульса – 3 мкс; поток гамма-квантов – до  $n \cdot 10^{13}$   $\gamma/\text{с}$ .

Наведенное гамма-излучение радионуклидов регистрировали с помощью полупроводникового детектора из особо чистого германия Canberra GC1020 с энергетическим разрешением – 1.85 кэВ для энергии 1.33 мэВ и относительной эффективностью регистрации – 13%. Диапазон измерения энергий гамма-излучения – от 40 кэВ до 3 мэВ. Градуировку спектрометра по энергии производили с использованием радионуклида  $\text{Eu}^{152}$  набора ОСГИ.

Обработку гамма-спектров после облучения образцов тормозным излучением проводили по программе GENIE2000 (Canberra Inc.). Для изотопной идентификации продуктов активации образцов ДНА тормозным излучением была использована специальная библиотека, разработанная на основе ядерно-физических данных файлов общего назначения (ENSDF, ENDF, библиотеки МАГАТЭ), данных специализированных библиотек радионуклидов [294],

образующихся по фотоядерным реакциям:  $(\gamma, n)$ ,  $(\gamma, p)$ ,  $(\gamma, 2n)$ ,  $(\gamma, \gamma')$ , и литературных данных [295].

### ***Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)***

По методике ВЭЖХ определяли концентрацию амикацина на хроматографе Shimadzu с длиной волны 195 нм на колонка Kromasil 100-5C18 со скоростью потока 1 мл/мин. Для приготовления подвижной фазы использовали 6 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,1 г гексансульфоната натрия, 1,2 мл триэтиламина, 800 мл воды, 50 мл ацетонитрила (pH=3,0). Время удерживания пика амикацина составляло около 26 мин.

### ***Измерение удельной площади поверхности ( $S_{\text{уд}}$ )***

Определение  $S_{\text{уд}}$  исследуемых образцов ДНА проводили на анализаторе удельной поверхности ASAP 2020 («Micromeritics», США) по методу низкотемпературной адсорбции азота. Образцы ДНА массой около 0,01 мг дегазировались при 100 °С в течение 1 ч. Обработка результатов проведена по уравнению БЭТ.

### ***Элементный анализ***

Элементный анализ на серу проводили на приборе Analytikjena Multi EA 3100 с флуоресцентным детектором Horiba APSA-360A. Прибор был оснащен автоматическим контролем скорости подачи газов: скорость потока аргона - 200 мл/мин, кислорода - 200 мл/мин. Температура камеры сгорания составляла 1100 °С. Масса навесок ДНА составляла < 1 мг.

### ***Потенциометрическое титрование***

В стакан для титрования наливали аликвоту соляной кислоты и разбавляли до 40 мл дистиллированной водой. В бюретку заливали раствор щелочи и закрывали хлоркальциевой трубкой. Титровали, добавляя по 1 мл щелочи из бюретки, и определяли примерный объем, который соответствует точке конца титрования. Затем титровали новую аликвоту, добавляя раствор щелочи вблизи точки эквивалентности по капле [296, 297].

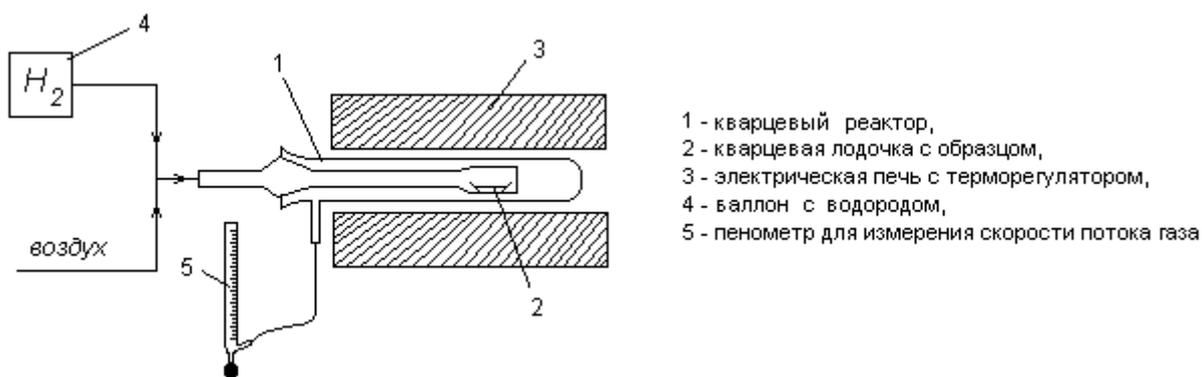
Для каждого образца были взяты по 3 навески 0,2–0,3 г. Навески образцов были засыпаны в колбы на 50 мл и залиты 5 мл титрованного раствора щелочи с концентрацией 0,090 М. Все колбы были плотно закрыты пробками и оставлены на 5 сут при периодическом помешивании (2 раза в сутки) для установления равновесия и более полной нейтрализации кислотных групп на поверхности ДНА. Затем доводили раствор до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. После этого 1,00 мл стандартного раствора соляной кислоты разбавляли в стакане для титрования до 40 мл и титровали щелочью, слитой с образцов и залитой в бюретку, закрытую хлоркальциевой трубкой (заполненной  $\text{CaCl}_2$ ) для устранения возможного поглощения  $\text{CO}_2$  из воздуха.

## 2.3. Методики функционализации поверхности ДНА

### 2.3.1 Гидрирование

Модифицирование поверхности ДНА проводили газообразным водородом (чистота 99.99 %) на установке, схема которой представлена на Рис. 9 [103].

Навеску исходного ДНА насыпали в лодочку (2) и помещали в кварцевый реактор (1). Для удаления из системы воздуха в холодный реактор в течение 20 мин подавали водород. Скорость потока водорода (порядка 2-3 л/ч) измеряли с помощью пенного расходомера (5). Далее реактор помещали в печь и проводили реакцию в течение 2-8 ч при 800 °С. Затем образец гидрированного ДНА (ДНА-Н) выдерживали в токе водорода до полного его остывания.



**Рисунок 9.** Схема проточной установки для газовой обработки ДНА [103].

### 2.3.2 Окисление

#### *Жидкофазное окисление*

Методика 1. Окисление в смеси кислот проводили по методике, аналогичной представленной в работе [298]. В плоскодонную колбу объемом 150 мл, снабжённую обратным холодильником, помещали 75 мл смеси концентрированных кислот  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  в соотношении 1:4 по объёму. В смесь вносили 1 г ДНА и выдерживали при 120 °С в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Окисленные ДНА отделяли путём центрифугирования (10 000 об/мин, 10 мин). Для отмывки от кислот ДНА промывали 50 мл 0,1 М раствора NaOH и осадок отделяли центрифугированием. Процедуру отмывки повторяли два раза, контролируя величину *pH*. Далее ДНА отмывали от щёлочи в соляной кислоте при тех же условиях. Полученный окисленный ДНА (ДНА-СООН) многократно промывали водой и высушивали на ротационном испарителе при 60 °С.

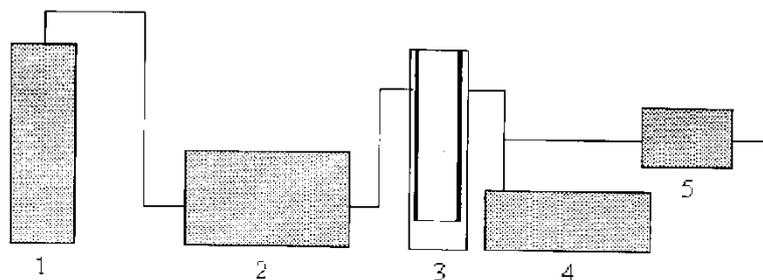
Методика 2. Для получения окисленного ДНА в круглодонную колбу объемом 100 мл, снабжённую обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой, приливали 50 мл тионилхлорида и вносили навеску 500 мг высушенного ДНА. Реакцию проводили в токе аргона

при комнатной температуре в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Непрореагировавший тионилхлорид отгоняли перегонкой под слабым вакуумом, к полученному порошку прибавляли абсолютированный бензол, который с остатками тионилхлорида отгоняли еще раз под вакуумом. Далее порошок ДНА суспендировали в воде, несколько раз промывали и высушивали на роторном испарителе при 90 °С.

### *Газофазное окисление*

Обработка воздухом. Окисление воздухом проводили на установке для гидрирования ДНА (см. раздел 2.2.1.) по аналогичной методике. Для окисления использовали воздух из сети, который очищали от пыли и влаги в колонке со стеклянной ватой и прокаленным силикагелем. Окисление воздухом проводили при 400 °С в течение 5 ч.

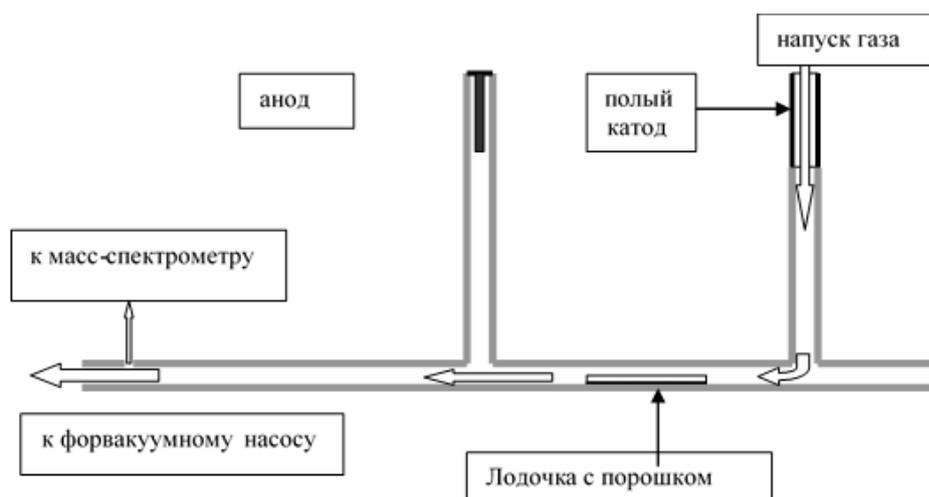
Озонирование. Реакцию озонирования ДНА осуществляли в проточной установке (Рис. 10). Синтез озона осуществляли в лабораторном озонаторе в барьерном электрическом разряде из кислорода марки “ОСЧ”. На выходе из озонатора концентрацию озона (1-5%) в озон-кислородной смеси изменяли подбором напряжения разряда (от 2 до 10 кВ). Все опыты проводили при комнатной температуре и скорости потока смеси 5 л/ч, продолжительность опыта 1 ч. Состав озон-кислородной смеси фиксировали в течение всего опыта через каждые 5 мин при помощи спектрофотометра СФ-4А (по предварительно полученной калибровочной кривой). Количество поглощенного озона определяли по разности концентраций на входе и выходе из реактора.



**Рисунок 10.** Блок-схема установки озонирования наноалмаза. 1 –баллон с кислородом, 2 – озонатор, 3 – реактор, 4 – спектрофотометр СФ-4А, 5 – хроматограф ЛХМ-8МД.

Анализ газовой фазы на содержание  $\text{CO}_2$  проводили при помощи газового хроматографа ЛХМ-8МД (колонка длиной 1 м, Рагорак-Q,  $T_{\text{кол.}} = 30$  °С, скорость потока газа-носителя гелия – 30 мл/мин).

Окисление в воздушной плазме. Обработка ДНА в воздушной плазме проводили на установке, схема которой представлена на Рис. 11.



**Рисунок 11.** Схема реактора для обработки веществ в воздушной плазме.

Образцы УДА-СТП (исходный, после окисления воздухом и после восстановления водородом) обрабатывали в потоке воздуха, активированного тлеющим разрядом. Навеску порошков (10-20 мг) предварительно помещали в пластиковую емкость и заливали этиловым спиртом. После периодического взбалтывания в течение 0,5 ч. полученную суспензию выливали в прямоугольную кварцевую лодочку (с плоским дном  $5 \times 1,4 \text{ см}^2$  и высотой стенок 0,5 см). Затем лодочки с порошками помещали в область положительного столба тлеющего разряда на 2 ч. Тлеющий разряд получали при следующих параметрах: диаметр разрядной трубки (кварц) 1,9 см, расстояние между электродами 75 см, расход газа  $20 \text{ см}^3/\text{мин}$  (при н.у.), давление 100 Па, ток разряда 30 мА, напряжение между электродами 2,4 кВ. Анализ газовой фазы проводили на масс-спектрометре Balzers QMG-511 (Balzers, Лихтенштейн).

### 2.3.3 Гидроксилирование

ДНА-СООН, полученный обработкой смеси кислот, сушили под вакуумом на масляном насосе при температуре  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 5 ч. Навеску ДНА-СООН (1 г) помещали в круглодонную трехгорлую колбу, в которую, с помощью канюли, добавляли 10 мл безводного дегазированного ТГФ и 15 мл 2 М раствора  $\text{LiAlH}_4$  в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали магнитной мешалкой в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 12 ч. Остатки  $\text{LiAlH}_4$  разлагали 1 М раствором  $\text{HCl}$ , вводя его по каплям. При этом происходило восстановление всех кислородсодержащих функциональных групп, за исключением гидроксильных. Суспензию ДНА-ОН многократно промывали 1 М раствором  $\text{HCl}$  и водой до полного удаления примесей лития и алюминия. Промытый ДНА-ОН высушивали на роторном испарителе при  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 2 ч, а затем на масляном насосе при температуре  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 6 ч.

### 2.3.4. Галогенирование

#### 2.2.4.1. Фторирование

Фторирование ДНА проводили в плазме SF<sub>6</sub> на установке, собранной на основе роторного испарителя. Высокочастотная плазма тлеющего разряда зажигалась в потоке газовой смеси SF<sub>6</sub>+Ar (1:3). Рабочая частота генератора 13,56 МГц, максимальная мощность 50 Вт. Давление и расход смеси регулировали с помощью вентиля тонкой регулировки. Фторирование проводили при комнатной температуре и давлении ~ 1 мм рт. ст. в течение 2,5 ч. Колба (объемом 0,5 л) была покрыта изнутри слоем тефлона. Перемешивание ДНА осуществляли с помощью стеклянных шариков ( $D_{\text{шар}} = 0,3-0,5$  мм), также покрытых пленкой тефлона (< 2 мкм) для предотвращения взаимодействия фтора со стеклом. После фторирования отделяли порошок ДНА от шариков, просеивая через сито.

#### 2.3.4.2. Хлорирование

Хлорирование ДНА было проведено двумя способами: молекулярным хлором в жидкой фазе [299, 300, 301, 302] и в плазме CCl<sub>4</sub> [156].

Хлорирование молекулярным хлором. Для модифицирования поверхности ДНА хлором была оптимизирована методика жидкофазного хлорирования, описанная в работе [303]. Хлор получали по реакции перманганата калия с соляной кислотой и растворяли в CCl<sub>4</sub> до насыщения (5-6 % масс.). Навеску гидрированного ДНА-Н (500 мг) помещали в круглодонную колбу из молибденового стекла объемом 250 мл с магнитной мешалкой и добавляли растворенный хлор в CCl<sub>4</sub> (150 мл). Хлорирование проводили при температуре 20-60 °С при постоянном перемешивании в течение 6 ч. Для инициирования фотохимической реакции использовали облучение светом в видимом диапазоне (лампа 500 Вт,  $l = 1-4$  см от стенки колбы). Полученный хлорированный ДНА (ДНА-Cl) многократно отмывали сухим CCl<sub>4</sub>, отделяли осадок путём центрифугирования (6 000 об/мин, 5 мин) и высушивали на роторном испарителе при 60 °С.

Хлорирование в плазме CCl<sub>4</sub> проводили в установке, описанной в разделе 2.2.2.1. При хлорировании ДНА стенки колбы тефлоном не покрывались. Процесс хлорирования проводили при комнатной температуре в течение 6 ч.

### 2.3.5. Амнирование

Газофазная обработка аммиаком. Модифицирование поверхности ДНА проводили газообразными аммиаком на установке, схема которой представлена на Рис. 9, где вместо баллона с водородом подключали баллон со смесью азот-аммиак [157].

Навеску исходного или хлорированного ДНА насыпали в лодочку (2) и помещали в кварцевый реактор (1). Для удаления из системы воздуха в холодный реактор в течение 20 мин подавали аммиак. Устанавливали скорость потока аммиака около 2-3 л/ч. Далее реактор помещали в печь, нагревали до 450 °С и проводили реакцию в течение 3 ч. Затем аминированный образец (ДНА-NH<sub>2</sub>) выдерживали в токе аммиака до полного его остывания.

## 2.4. Ковалентная прививка соединений на поверхность ДНА

### 2.4.1. Этилен- и гексаметилендиамин

Ковалентная прививка этилендиамина осуществлялась на хлорированный и фторированный образцы ДНА, полученные обработкой в плазме (раздел 2.2.3.1.) по методике, аналогичной представленной в работе [120]. В тщательно высушенную колбу приливали 50 мл диметилсульфоксида, добавляли навеску галогенированного ДНА (500 мг), 2,5 мл этилендиамина и несколько капель пиридина для связывания выделяющегося в процессе реакции галогенводорода. Смесь кипятили в течение 24 ч с обратным холодильником, снабженным хлоркальциевой трубкой, при температуре 120 °С. Затем порошок модифицированного ДНА (ДНА-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) многократно промывали водой и ацетоном и сушили на роторном испарителе при 90 °С.

Прививку гексаметилендиамина проводили по модифицированной методике, основываясь на работе [120]. В тщательно высушенную круглодонную колбу объёмом 100 мл приливали 50 мл абсолютированного спирта, добавляли навеску 2,5 г гексаметилендиамина и 500 мг галогенированного ДНА. Далее, для связывания выделяющегося в ходе реакции галогенводорода добавляли 3-4 капли пиридина. Смесь кипятили в течение 24 ч с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой при температуре 80 °С. Затем полученный порошок модифицированного ДНА (ДНА-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>) многократно промывали водой и ацетоном и сушили на роторном испарителе при 90 °С.

### 2.4.2. Трийодбензиловый спирт

Прививку 3,4,6-трийодбензилового спирта на поверхность ДНА проводили по разработанным в работе оригинальным методикам.

Методика 1. В тщательно высушенную колбу добавляли навеску хлорированного ДНА (500 мг) и 250 мг 3,4,6-трийодбензилового спирта. Приливали 100 мл абсолютированного тетрагидрофурана (ТГФ) и добавляли 350 мг предварительно раскатанных стружек гидроксида натрия. Смесь кипятили в течение 48 ч с обратным холодильником, снабженным хлоркальциевой трубкой, при температуре 80 °С. Затем раствор декантировали, отделяли порошок ДНА с

привитым трийодбензиловым спиртом (ДНА-R), многократно промывали абсолютированным ТГФ и сушили на роторном испарителе при 80 °С.

*Методика 2.* 200 мг порошка ДНА, окисленного смесью кислот (раздел 2.3.2), подвергали жидкофазной обработке тионилхлоридом (50 мл) при постоянном перемешивании и комнатной температуре в течение 24 ч. Непрореагировавший тионилхлорид перегоняли под слабым вакуумом, к полученному порошку прибавляли абсолютированный бензол, который еще раз отгоняли с остатками тионилхлорида под вакуумом. Затем из полученного наноалмаза с хлорацильными группами получали суспензию, используя 20 мл абсолютированного ТГФ, в которую вносили 100 мг 3,4,6-трийодбензинового спирта с добавлением 50 мг гидрида натрия. Смесью выдерживали при постоянном перемешивании и температуре 80 °С в течение 60 ч. Полученный продукт промывали абсолютированным ТГФ, затем абсолютированным этанолом, центрифугировали и высушивали под вакуумом при 60 °С.

#### 2.4.3. Глицин

Разработанная нами методика прививки к ДНА глицина существенно отличается от описанных в литературе способов, которыми ранее прививали этиловый эфир глицина на галогенированный ДНА в *o*-дихлорбензоле при добавлении пиридина при 130-140 °С в течение 8-12 ч [120] или при 135 °С в течение 20 ч [218]. Методика заключается в следующем: растворяли 1 г глицина в 50 мл дистиллированной воды и приливали в колбу объемом 250 мл, добавляли навеску ДНА (200 мг), 100 мкл основания Хунига и 50 мл этилового спирта. Смесью кипятили в течение 24 ч при 78 °С с обратным холодильником. Полученный продукт (конъюгат ДНА-глицин) отделяли от жидкости центрифугированием, многократно промывали водой и этанолом и сушили на роторном испарителе при 70-80 °С в течение 2 ч.

#### 2.4.4. Цистеин

Предварительно путем реакции этерификации (30 мин, 70 °С) гидрохлорида L-цистеина моногидрата [304] получали гидрохлорид этилового эфира L-цистеина. Для этого в колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещали 5 г L-цистеина, растворенного в 100 мл абсолютированного этилового спирта, и вытесняли воздух аргоном. Затем в колбу подавали газообразный HCl, полученный по реакции смеси NaCl (40 г) и HCl (10 мл) с концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 мл). Образующийся HCl для удаления воды пропускали через U-образную трубку, заполненную стекловатой и оксидом фосфора (V), а также через промывную склянку с концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Прививку гидрохлорида этилового эфира L-цистеина выполняли по оригинальной методике. В круглодонную колбу объемом 25 мл помещали 100 мг хлорированного ДНА,

добавляли 100 мг полученного гидрохлорида этилового эфира L-цистеина и для связывания выделяющегося HCl добавляли 0,4 мл основания Хунига. Реакцию вели в этиловом спирте при температуре 78 °С и постоянном перемешивании в течение 12 ч. Далее отделяли осадок конъюгата ДНА от жидкости, несколько раз промывали водой и этанолом для удаления непрореагировавшего этилового эфира L-цистеина и сушили на роторном испарителе.

#### **2.4.5. Янтарная кислота**

Гидроксильированный наноалмаз (ДНА-ОН) получали путем восстановления ДНА-СООН (полученного обработкой в смеси серной и азотной кислот, см. раздел 2.3.2.) алюмогидридом лития в ТГФ в течение 12 ч в атмосфере аргона при комнатной температуре. После реакции ДНА-ОН подвергались многократной промывке 1М раствором HCl для удаления реакционных примесей. К 500 мг ДНА-ОН добавляли 500 мг янтарного ангидрида и суспензировали ультразвуковым диспергатором в колбе, содержащей 50 мл хлороформа, и выдерживали при 60 °С в течение 24 ч. Далее отделяли осадок конъюгата ДНА-янтарная кислота от жидкости, несколько раз промывали этанолом для удаления непрореагировавшего янтарного ангидрида и сушили на роторном испарителе.

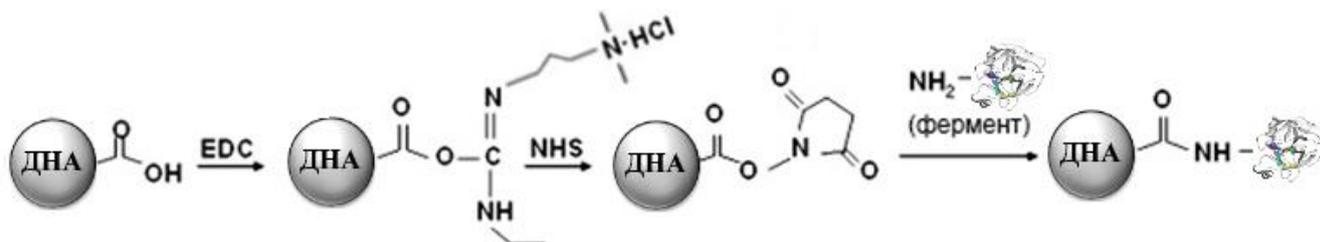
#### **2.4.6. Амикацин**

Навеску хлорированного наноалмаза (500 мг) помещали в колбу, снабженную обратным холодильником, объемом 50 мл, добавляли 0,5 г сульфата амикацина, 30 мл этанола и 0,5 мл реактива Хунига (N,N,-диизопропилэтиламин). Смесь выдерживали при 50 °С в течение 24 ч. Далее отделяли осадок конъюгата ДНА-амикацин от жидкости, несколько раз промывали этанолом и водой для удаления непрореагировавшего амикацина и сушили на роторном испарителе.

#### **2.4.7. Протеолитические ферменты**

Прививку ферментов выполняли по модифицированной методике, основанной на работе [197]. В пластиковую пробирку объемом 50 мл помещали 500 мг окисленного в смеси кислот ДНА (раздел 2.3.2.1), суспензировали УЗО в 25 мл воды и добавляли 500 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC), интенсивно перемешивали 30 мин и добавляли эквимолярное количество N - гидроксисукцинимид (NHS) для связывания с EDC. Далее отделяли осадок центрифугированием, образующийся супернатант декантировали, добавляли 25 мл воды и суспензировали осадок. Процедуру центрифугирования и декантирования супернатанта повторяли 2 раза. После чего к тщательно промытому осадку ДНА добавляли 20 мл раствора фермента в буфере MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота)

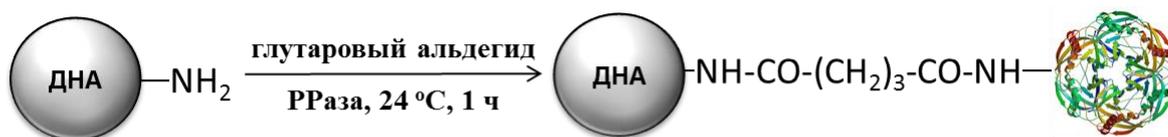
с  $pH$  6,1 ( $c = 5, 5$  и  $10\%$  для папаина, химотрипсина и трипсина, соответственно) и инкубировали при  $4^\circ C$  в течение 24 ч. Полученный осадок отделяли центрифугированием, промывали несколько раз порциями по 30 мл воды и сушили на роторном испарителе при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Схема происходящих процессов представлена на Рис. 12.



**Рисунок 12.** Схема иммобилизации протеолитических ферментов на ДНА-СООН.

#### 2.4.8. Пирофосфатаза

Иммобилизацию пирофосфатазы (РРазы) проводили на аминированном ДНА (ДНА-NH<sub>2</sub>) по оригинальной методике. РРазы была предварительно обессолена в буфере 50 мМ Нерес-КОН, содержащем 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Схема процесса представлена на Рис. 13.

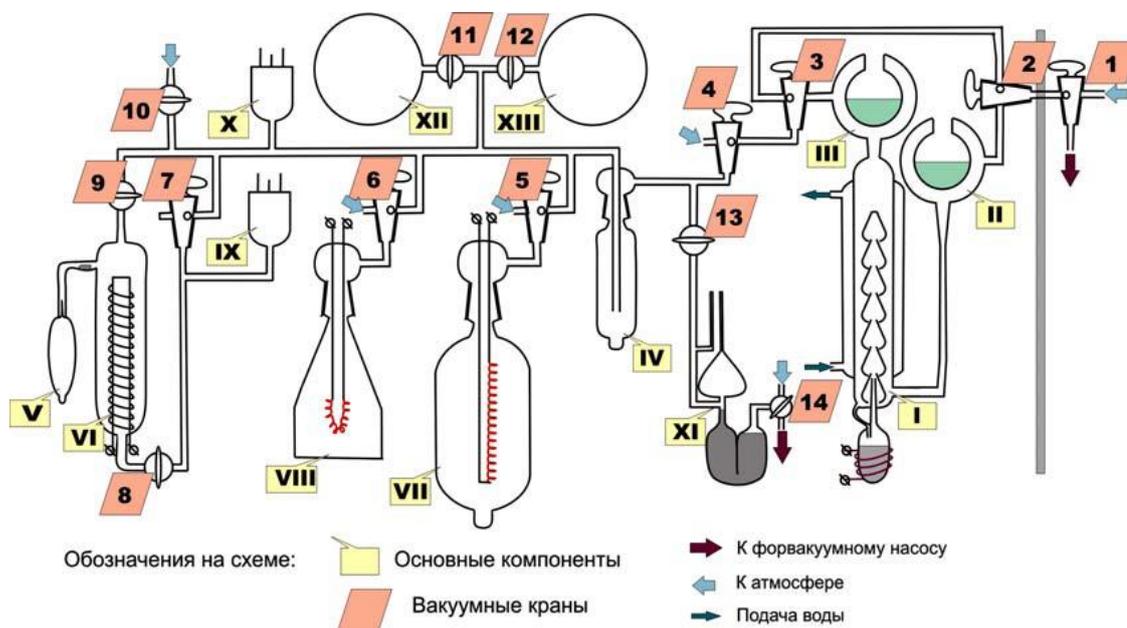


**Рисунок 13.** Схема иммобилизации РРазы на ДНА.

В эппендорфах объёмом 2 мл готовили серию растворов с постоянной концентрацией реагентов: 50 мМ Нерес-КОН, 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ NaF, 100 мкМ РР<sub>i</sub>, гидрозоль ДНА-NH<sub>2</sub> (1 мг/мл), РРазы 1 мг/мл, глютаровый альдегид 50 мкМ. Объем пробы в каждой пробирке довели водой mQ до 1 мл. Пробы выдерживали в течение 50 мин при постоянном перемешивании, затем полученные препараты отделяли от избытка реагентов путём центрифугирования (14100 об/мин, 10 мин). Супернатанты отбирали и измеряли в них концентрацию белка спектрофотометрически при длине волны  $\lambda = 280$  нм. Далее осадки ресуспендировали в 350 мкл буфера 50 мМ Tris-HCl, содержащего 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Препараты выдерживали 10-15 мин при постоянном перемешивании и снова подвергали центрифугированию при тех же условиях. Супернатанты отбирали и измеряли в них концентрацию белка. Цикл такой обработки повторяли 3 раза.

## 2.5. Мечение наноалмаза тритием<sup>1</sup>

Мечение наноалмаза тритием проводили на установке, представленной на Рис. 14. Тритиевую метку вводили в ДНА, используя метод термической активации трития (МТАТ) [305]. Метка вводилась в 2 образца ДНА: исходный и гидрированный. Для введения <sup>3</sup>H-метки порошок ДНА наносили на стенки реактора. Для этого готовили водную суспензию частиц с расчетом на массу ДНА до 2 мг. Суспензию равномерно наносили на стенки реактора и замораживали жидким азотом в специальном контейнере из пенопласта. Подключали вакуумный насос. Реактор устанавливали в прибор и последовательно включали два насоса – форвакуумный и высоковакуумный парортутный до давления  $10^{-3}$  Па. Затем запускали в реактор тритий до давления паров 0,5 Па и подавали напряжение на вольфрамовую нить до температуры 2000 °С в течение 10 с. За ходом реакции следили по изменению давления паров трития. Полученную суспензию выдержали несколько суток, осаждали ДНА центрифугированием, отделяли супернатант и добавляли новую порцию растворителя. Из этой суспензии отбирали 10 мл в пробирку. Брели аликвоты 10-100 мкл в эппендорф объемом 1,5 мл, добавляли 1-1,5 мл сцинтиллятора, перемешивали и измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta 1215 (LKB Wallac, Финляндия).



**Рисунок 14.** Схема установки для работы с газообразным тритием. I– диффузионный насос, II, III – стационарные ловушки, IV – сменная ловушка, V – ампула с тритием, VI – палладиевый

<sup>1</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи сотрудников кафедры радиохимии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова: доцента, к.х.н. Г.А. Бадуна и доцента, к.х.н. М.Г. Чернышевой.

натекатель, VII, VIII – реакционные сосуды, IX, X – лампы терморного вакуумметра, XI – компрессионный манометр, XII, XIII – сосуды для хранения газов.

## 2.6. Дезагрегация порошков ДНА и получение гидрозолей ДНА

Дезагрегацию всех образцов ДНА проводили по оригинальной методике. Ранее нами было обнаружено, что если первоначальную суспензию ДНА подвергать обработке ультразвуком (УЗО) с последующим центрифугированием (ЦФ), то при увеличении числа таких циклов степень диспергирования ДНА увеличивается.

Для получения гидрозолей обычно брали по 0,5 г ДНА, добавляли по 25 мл дистиллированной воды и подвергали обработке несколькими циклами «УЗО в течение 2 мин - ЦФ при 6000 об/мин». Все образцы дезагрегировались в одинаковых условиях. Кроме этого, была сопоставлена эффективность описанной выше методики дезагрегации ДНА с методикой дезагрегации, когда используется только УЗО. При приготовлении суспензий применяли ультразвуковой диспергатор МЭФ 391 (ООО «МЭЛФИЗ-ультразвук», Россия) (Табл. 10).

При ЦФ использовали лабораторную медицинскую настольную центрифугу «ЦЛн-16» (ООО «Фирма «ПОЛИКОМ», Россия).

Таблица 10. Характеристики УЗ – диспергатора МЭФ 391.

Преобразователь	пьезоэлектрический
Концентратор	титановый сплав
Режим работы	продолжительный
Охлаждение	воздушное принудительное
Частота колебаний	22 кГц
Питание	220 В 50 (60) Гц

### 2.6.1. Определение концентрации гидрозолей ДНА

Определение концентрации гидрозолей ДНА выполняли гравиметрическим методом. На вогнутое предметное стекло, предварительно доведенное до постоянной массы, с помощью дозатора Eppendorf (100-1000 мкл) наносили 0,5 мл гидрозоля. Стекло помещали на металлическую сетку, расположенную на расстоянии 2-3 см над электрической плиткой, нагретой до 150 °С. Гидрозоля нагревали до полного испарения воды (40-60 мин). Стекло с сухим остатком взвешивали, по разнице масс определяли массу ДНА и рассчитывали его концентрацию. Для каждого гидрозоля проводили 3 параллельных измерения.

## 2.7. Спектрофотометрия и люминесценция гидрозолей ДНА

Для изучения спектрофотометрических и люминесцентных свойств ДНА использовали специально разработанную методику приготовления гидрозолей. Приготовление гидрозолей из порошков ДНА-Н и ДНА-СООН (марка УДА-ТАН) проводили в одинаковых условиях. Для этого брали по ~300 мг каждого образца, добавляли по 40 мл дистиллированной воды, подвергали ультразвуковой обработке в течение 1 мин и центрифугированию в течение 10 мин (при 6 000 об/мин). Затем проводили еще один цикл озвучивания – центрифугирования (в течение 10 мин при 8 000 об/мин). После центрифугирования отбирали супернатант и помещали в полипропиленовую пробирку объемом 50 мл.

Для приготовления гидрозоля ДНА марки SDND брали навески  $60 \pm 1$  мг, добавляли  $20,0 \pm 0,1$  мл дистиллированной воды, подвергали УЗО в течение 1 мин без применения центрифугирования, так как гидрозоль только этой марки ДНА был устойчив без дополнительного воздействия.

Гравиметрическое определение концентрации гидрозолей ДНА проводили по методике, описанной в разделе 2.6. Для каждого гидрозоля проводили по 6 параллельных измерений.

Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония) (спектральный диапазон 190,0 ~ 1100,0 нм, фотометрический диапазон поглощения – 4 ед.). Исследуемые гидрозолы ДНА-Н и ДНА-СООН разбавляли до концентрации 1 мг/мл и отбирали в кварцевую кювету 4 мл раствора. После каждого снятия спектра отбирали 2 мл раствора из кюветы и добавляли 2 мл дистиллированной воды (разбавление в 2 раза). Гидрозоль ДНА марки SDND объемом 500 мкл отбирали в кювету и добавляли 2,5 мл дистиллированной воды. После регистрации спектра отбирали 1 мл раствора, добавляли 1 мл воды и регистрировали спектр полученного гидрозоля.

Спектры люминесценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Флуорат-02-Панорама (Люмэкс, Россия) в спектральном диапазоне 210-690 нм в канале регистрации люминесценции (погрешность  $\pm 0,2$  нм). В кварцевую кювету отбирали 3 мл гидрозоля ДНА и регистрировали спектры люминесценции при длине волны возбуждения  $\lambda = 488$  нм [306]. После каждой записи спектра из кюветы отбирали 500 мкл раствора, добавляли 500 мкл воды и проводили регистрацию спектра.

## 2.8. Изучение трансмембранной проницаемости ДНА *in vitro*<sup>2</sup>

### 2.8.1. Диффузия через модельную синтетическую мембрану – целлофан

Для проведения эксперимента в качестве модели биологической мембраны использовалась полупроницаемая синтетическая целлофановая мембрана толщиной 38 мкм с размерами пор от 2 нм до 2 мкм. Перед началом эксперимента целлофановую мембрану стерилизовали кипячением в дистиллированной воде в течение 40 мин.

При изучении трансмембранной проницаемости ДНА в экспериментах *in vitro* для их визуализации использовали два метода: **весовой** (метод 1) и **метод измерения радиоактивности** (метод 2).

Вещества. В экспериментах изучали ДНА марки УДА-ТАН. Для каждого метода были получены гидрозолы ДНА. Для определения диффузии частиц ДНА через целлофановую мембрану из сухого порошка ДНА были получены два гидрозоля с размерами агрегатов 50 и 100 нм, соответственно, и концентрацией 0,22 мг/мл. Изучение диффузии ДНА, используя измерение радиоактивности, проводили на восстановленном ДНА (Н<sub>2</sub>, 800 °С, 5 ч) с введенной методом термической активации трития (МТАТ) радиоактивной меткой <sup>3</sup>Н ([<sup>3</sup>Н]-ДНА) с удельной активностью образца 90 ГБк/г. Получали гидрозоль [<sup>3</sup>Н]-ДНА с концентрацией 0,25 мг/мл, удельной активностью 0,61 мКи/мл и размером агрегатов – 50 нм.

Оборудование. Пьезокварцевые микровесы QCM100, (SRS, США); жидкостной сцинтилляционный спектрометр RackBeta 1215 (Финляндия), ультразвуковые ванны мощностью 50 и 300 Вт. Для проведения диффузии использовали прибор, аналогичный ячейке Франца [307], приведенной на Рис. 15.

Метод 1. Обработанную ультразвуком (300 Вт) суспензию ДНА объемом 50 мл помещали в стеклянную трубку (Ø = 2 см), на конце которой была закреплена целлофановая мембрана (ячейка Франца [307]). Ячейку Франца с жидкостью опускали в стеклянный стакан, содержащий 50 мл воды, так, чтобы уровень суспензии в трубке был на несколько миллиметров выше уровня воды во внешнем стакане. Полученную систему накрывали бумажным колпаком для предотвращения попадания в раствор взвешенных в воздухе микрочастиц пыли. Измерение массы прошедшего через мембрану ДНА проводили через 7, 15, 30, 60 мин и т.д. до 8 ч с постепенным увеличением временного интервала. Для этого из внешнего раствора отбирали аликвоту объемом 10 мкл в виде капли, помещали в центр измерительной пластинки

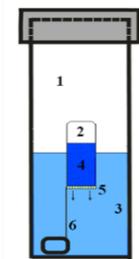
---

<sup>2</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи зав. кафедрой фармацевтической технологии РязГМУ им. акад.И.П.Павлова к.ф.н., доцента Н.Г Селезенева.

пьезокварцевых весов и ждали испарения капли. Измерение массы проводили после установления колебания пластинки не более чем в  $\pm 0,1$  Гц. Количество ДНА, прошедшего через мембрану, определяли по массе сухого остатка. Эксперимент по приведенной методике выполнен отдельно для каждой суспензии ДНА с размерами частиц 50 и 100 нм, соответственно. Для некоторых временных точек применена УЗО.

**Метод 2.** Обработав ультразвуком (15 мин) на ванне мощностью 300 Вт, аликвоту суспензии  $^3\text{H}$ -ДНА объемом 100 мкл помещали в пластиковую пробирку ( $\text{Ø} = 8$  мм) (ячейку Франца) и разбавляли водой до объемов 0,5 или 1 мл. Пробирку закрывали крышкой, в которую вставляли целлофановую мембрану. Затем пробирку опускали во внешний пластиковый сосуд, используя нитку с грузиком такой длины, чтобы уровень жидкости во внешнем растворе был на несколько миллиметров ниже уровня жидкости во внутреннем растворе. Отбор проб (50 мкл) проводили через 7,5, 10, 15, 30, 35, 45, 60 мин, соответственно, с дальнейшим увеличением временных промежутков (1,5, 2, 3 ч и т.д. до 70 ч). Затем в эппендорф с пробой добавляли сцинтиллятор до объема 1,5 мл и измеряли на спектрометре радиоактивность, по которой судили о количестве [ $^3\text{H}$ ]-ДНА, прошедших через мембрану во внешний раствор.

Схема ячейки для изучения процесса трансмембранной проницаемости  $^3\text{H}$ -ДНА представлена на Рис.15.



**Рисунок 15.** Схема прибора (ячейка Франца [307]) для изучения процесса трансмембранной проницаемости частиц ДНА через целлофановую мембрану. 1 – внешний сосуд; 2 – внутренний сосуд; 3 – вода объемом 15 мл; 4 – водная суспензия  $^3\text{H}$ -ДНА объемами 0,5 и 1 мл; 5 – целлофановая мембрана; 6 – нитка с грузиком.

### 2.8.2. Диффузия через биомембрану

**Животные.** 2 белые беспородные крысы (самцы, масса 300 г). Забой животных проводили под наркозом (диэтиловый эфир).

**Мембрана.** Для получения биомембраны была хирургически выделена прямая кишка крыс сразу после их забоя и промыта физиологическим раствором. От начала ректального отверстия длина кишок составила 2 см. Из каждой кишки вырезали прямоугольный лоскут и вставляли в крышку пластикового флакона (ячейку Франца) в вывырнутом виде.

Обработав ультразвуком (15 мин) на ванне мощностью 50 Вт, аликвоту суспензии  $^3\text{H}$ -ДНА объемом 100 мкл помещали в ячейку Франца ( $\text{Ø} = 8$  мм) и разбавляли дистиллированной водой до 0,5 мл. Пробирку закрывали крышкой с биомембраной. Далее проводили работу по методике, описанной выше (раздел 2.8.1). Отбирали аликвоту из внешнего сосуда через 3, 5, 10, 20, 40, 60 мин

и далее через каждые полчаса в течение 10 ч. Для одной ячейки на каждой временной точке в пробирку отбирали аликвоту внешнего раствора объемом 10 мкл, для другой ячейки отбирали аликвоту внешнего раствора объемом 50 мкл с добавлением во внешний раствор того же количества дистиллированной воды.

Измерение образцов проводили только по методу 2 (раздел 2.8.1). В полученные пробы добавляли сцинтиллятор до объема 1,5 мл и измеряли радиоактивность пробы на жидкостном спектрометре, по которой оценивали количество [<sup>3</sup>H]-ДНА, прошедшего через мембрану во внешний раствор.

## 2.9. Изучение биораспределения ДНА с рентгеноконтрастной меткой

### 2.9.1. Изучение биораспределения ДНА *in vivo* методом РКТ<sup>3</sup>

Животные. В эксперименте участвовало 14 особей кроликов – 2 группы по 6 кроликов и 2 кролика для отработки методики эксперимента.

Вещества, схема введения. Для внутривенной инъекции в бедренную вену кролика использовали суспензию ДНА с привитым рентгеноконтрастным 3,4,6-трийодбензиловым спиртом (1,7 % ат. йода на поверхности частиц) и суспензию 3,4,6-трийодбензилового спирта (R) в физиологическом растворе с концентрацией 10 мг/мл и 1 мг/мл, соответственно. Суспензии перед введением озвучивали на ультразвуковой ванне. Все инъекции проводили внутривенно с помощью катетера с иглой 21G в бедренную вену (в одном случае, в ушную вену). Объем каждой инъекции варьировали в зависимости от веса животного, в среднем, 2 мл, а концентрации растворов были подобраны таким образом, чтобы животные в группе 1 получали 5 мг ДНА-(R) на 1 кг веса, животные в группе 2 — 0,5 мг/кг веса. Контрольными животными являлись все животные из 1 и 2 группы, на которых делали томографический срез тела до введения экспериментальных веществ.

Исследуемые ткани и органы. Основными органами, изучаемыми в эксперименте, были головной мозг, сердце, печень, селезенка, почка, печеночная вена.

Приборы: компьютерный рентгеновский томограф Siemens Somatom Emotion 6 (Siemens, ФРГ) (16-срезовый, длительность спирали до 100 сек, пространственное разрешение до 0,29 мм), ультразвуковая ванна мощностью 50 Вт.

Методика эксперимента. Животное фиксировали на жесткой платформе и наркотизировали диэтиловым эфиром. Затем помещали на томограф и делали контрольный срез тела без введенных веществ. 1-й группе вводили ДНА-(R), 2-й группе (R). Все препараты были

---

<sup>3</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи зав. кафедрой фармакологии РязГМУ им. акад.И.П.Павлова д.м.н., проф. Е.Н. Якушевой и к.м.н., доцента А.В. Щулькина.

введены в течение 1 мин. Через 5, 25 и 25 минут после введения записывали томограммы (по 4 томограммы на каждого кролика). Каждая томограмма записывалась на электронный носитель – CD-R диск. На каждую временную точку эксперимента печатался снимок со срезами органов в разных плоскостях. На снимке отмечены основные параметры эксперимента и единицы плотности каждого органа в относительных единицах Хаусфилда, всего 55 снимков (3 снимка для №1).

### 2.9.2. Изучение биораспределения ДНА *ex vivo* методом ИСП-МС<sup>3,4</sup>

Животные. Для исследования были взяты 30 особей кроликов (самцы и самки) весом 2,6 - 4,9 кг, полученные в виварии РязГМУ. Животные для эксперимента формировались случайным образом. Пробоподготовку навесок органов проводили на Химическом факультете МГУ. Измерение органов методом ИСП-МС проводили на факультете ФНМ МГУ.

Вещества, схема введения были аналогичны для эксперимента с РКТ (Раздел 2.9.1).

Исследуемые ткани и органы. Основными органами, изучаемыми в эксперименте, были легкие, сердце, печень, селезенка, почка и головной мозг. Выбор органов был обусловлен предыдущим экспериментом *in vivo*, где на этих же органах изучалось биораспределение ДНА методом РКТ.

Приборы: масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Elan DRC II (Perkin Elmer, США), ультразвуковая ванна мощностью 50 Вт.

Реактивы: Реактивы для растворения органов: 3 Н р-р NaOH, 30%-ный р-р H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Методика эксперимента. Животным вводили внутривенно в бедренную вену суспензии ДНА-R и R. Через 1, 6, 24 ч, 15 и 30 суток забивали животное, изымали и взвешивали органы и ткани. Органы помещали в пенициллиновые флаконы и оставляли на хранение в холодильнике при -20 °С.

Гомогенизацию органов проводили в стеклянных флаконах, добавляя к органам определенное количество 3Н NaOH и нагревая полученную смесь почти до кипения. В итоге получался окрашенный гомогенный раствор. Обесцвечивание раствора производили добавлением 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (до желтого или светло-коричневого цвета). Непосредственно перед анализом полученные растворы подвергали УЗО в течение 1-2 мин.

Перед измерением образцов органов на наличие йода строили калибровочную кривую, построенную по стандартам KI, в пределах от  $1 \cdot 10^{-3}$  до 0,5 мг/л, используя 3 Н раствор NaOH в качестве растворителя. При каждом измерении проводили настройку скорости газа и мощности

---

<sup>4</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи с.н.с. ФНМ МГУ им. М.В.Ломоносова к.х.н. А.А. Елисеева.

плазмы для увеличения чувствительности прибора по йоду. Для промывки прибора между измерения образцов использовали 3 Н раствор NaOH в воде.

Измерения методом ИСП-МС проводили как в обычном режиме работы прибора, так и с подключением динамической реакционной ячейки (DRC) с аммиаком.

## 2.10. Изучение *ex vivo* биораспределения ДНА с тритиевой меткой<sup>5,6</sup>

Для изучения биораспределения ДНА в организме мышей и крыс использовали [<sup>3</sup>H]-ДНА с повышенной степенью замещения водорода. Меченный тритием ДНА однократно вводили мышам внутривенно или крысам в бедренную вену. Статистически значимую выборку мышей (от 5 до 10 особей) использовали для каждой временной точки – 15 мин, 2, 6, 24 ч, 14, 30, 90, 180 сут, для крыс (2 особи на точку) – 15, 30 мин, 1, 2, 6 и 24 ч. Вводили мышам 200 мкл гидрозоля ДНА с концентрацией 4 мг/мл и активностью 0,61 мкКи/мл, крысам – аналогичный гидрозоль в объеме 100 мкл. По истечении указанного времени животных забивали, изымали органы, ткани и биологические жидкости, гомогенизировали их (переводили в раствор), смешивали со сцинтиллятором и с помощью сцинтилляционного спектрометра измеряли количество ДНА по радиоактивности пробы. Всего было исследовано 16 и 12 видов органов, тканей и биологических жидкостей от каждой мыши и крысы, соответственно.

## 2.11. Изучение специфической активности ДНА *in vitro*

### 2.11.1. Биологическая активность ДНА в тесте люминесцентных бактерий<sup>7</sup>

В экспериментах применили методику работы [308], в которой использовались лиофилизированные бактерии *E. coli*, K12 TG1(pF1) со встроенными генами полного CDABE lux-оперона люминесцентной системы из бактерий *V. fischeri* 6 МГУ. Во флакон с лиофильно высушенными бактериями для их регидратации вносили 10 мл воды для инъекций (pH 7.0) и получали «маточную суспензию». Из нее путем разбавления водой готовили рабочую суспензию бактерий с конечной концентрацией клеток  $(2-3) \times 10^7$  кл/мл. Для измерения интенсивности свечения формировали пробу, которая содержала: 0,1 мл суспензии бактерий и 0,9 мл дистиллированной воды (контроль) или такой же объем пробы ДНА [309]. В тесте были исследованы образцы ДНА разных марок. Концентрация ДНА в пробе была равна 0,1 мг/мл. Интенсивность биолюминесценции бактерий измеряли на люминометре «Биотокс-10» (Россия).

<sup>5</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи сотрудников ФГБНУ ЦНИИТ РАМН: зав. виварием, с.н.с. Отдела иммунологии к.б.н. И.В. Бочаровой и зав. лаб. патоморфологии д.м.н., проф. Л.Н.Лепехи.

<sup>6</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи профессора 1-го МГМУ им. И.М. Сеченова д.м.н. А.М. Шестакова.

<sup>7</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи зав. лабораторией биологически активных веществ Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова д.б.н., проф. В.М. Данилова и н.с., к.б.н. Е.В. Сорокиной.

Биологическую активность (токсическое действие) определяли по ингибированию биолюминесценции бактерий за 30-минутный период экспозиции. Индекс токсичности вычисляли по формуле [308]:

$$T = (I_0 - I) / I_0 * 100 \quad (1),$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивность биолюминесценции в отсутствие и присутствии ДНА. Каждый эксперимент проведен в 3 независимых опытах.

### 2.11.2. Антиоксидантная активность<sup>8</sup>

Изучение влияния ДНА и его конъюгата с глицином на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) *in vitro* осуществляли с использованием оценки уровней диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в суспензии модельных мембран липосом.

Измерение продуктов ПОЛ проводили на спектрофотометре DU-50 (Beckman, США) в 10-мм полумикрокуветках (Opton, ФРГ). Кинетику и интенсивность хемилюминесценции определяли на люминометре с цифровым дисплеем и системой для инъекционного введения инициатора на 500 мкл (модель 1250, ЛКВ, Швеция) и двухканальным самописцем (модель ВД-41, Kipp&Zonen, ФРГ).

1. Метод приготовления многослойных фосфолипидных липосом. Гетерогенную систему – суспензию модельных мембран липосом [310] готовили из общей фракции фосфолипидов желтка яиц. Экстракцию фосфолипидов проводили по методу [311]. Один объем желтка яиц гомогенизировали в течение 30 мин в 20 объемах хлороформ-метанольной смеси (2:1, по объему), гомогенат фильтровали через обезжиренный бумажный фильтр для отделения агрегировавшего белка. Полученный липидный экстракт промывали добавлением к нему 1/3 общего объема 0,74% водного раствора КСl. После отстаивания в течение 12 час при 0-4°C верхнюю водно-метанольную фазу тщательно удаляли, нижнюю фазу переносили в круглодонную колбу и выпаривали с помощью роторного испарителя. Сухую липидную пленку смывали 3-4 мл гексана и добавляли 20-кратное количество охлажденного ацетона. При этом фосфолипиды выпадали в осадок в виде белых хлопьев. Преципитацию фосфолипидов ацетоном проводили 5 раз. Полученные фосфолипиды растворяли в хлороформ-метанольной смеси. Концентрацию фосфолипидов определяли гравиметрически.

Процедуру приготовления многослойных фосфолипидных липосом выполняли по методу [312]. Для этого необходимое количество хлороформ-метанольного раствора фосфолипидов помещали в круглодонную колбу и упаривали растворитель на вакуумном роторном испарителе. Сухую липидную пленку смывали со стенок колбы определенным объемом 20 мМ трис-НСl буфера, рН 7,4. С целью формирования липосом более однородных по своему размеру,

<sup>8</sup> Работы по изучению специфической активности изучаемых веществ были выполнены при консультативной помощи З.д.н. РФ, лауреата Государственной премии СССР и премии Правительства РФ д.м.н. проф. Т.А.Ворониной.

полученную липосомальную суспензию подвергали криолитической обработке путем трехкратного замораживания-оттаивания. Перед использованием суспензию липосом выдерживали не менее 1 ч при 37 °С.

2. Метод определения продуктов перекисидации липидов. Инициирование липидной перекисидации осуществляли введением раствора  $\text{FeSO}_4$  до конечной концентрации 0,1 мМ в течение 30 мин. Реакцию ПОЛ останавливали добавлением ионола до конечной концентрации 0,1 ммоль/л. Гидрозоль ДНА-глицин в различных концентрациях в этаноле инкубировали с суспензией липосом до инициации ПОЛ сульфатом железа в течение 30 мин. Контрольные образцы содержали вместо соединений эквивалентный объем этанола. Все измерения проводили в 3-х параллелях.

3. Метод определения диеновых конъюгатов (ДК). К 100 мкл конечной реакционной суспензии (липосомы–соединение–ионол) добавляли 1000 мкл смеси 2-пропанол–гептан (1:1, по объему). Образцы интенсивно встряхивали 2 раза по 10 сек (Bio Vortex V1, BioSan, Латвия) и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин (J-6B, Beckman, США). К 900 мкл супернатанта добавляли 100 мкл дистиллированной воды для разделения фаз и интенсивно встряхивали 2 раза по 10 сек и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отбирали по 300 мкл верхней гептановой фазы и добавляли по 1200 мкл 95% этанола. Оптическую плотность образцов определяли на спектрофотометре DU-50 (Beckman, США) в полумикрокювете при 233 нм. Расчет количества ДК проводили на основании коэффициента молярной экстинкции  $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

4. Метод определения малонового диальдегида (МДА). Для определения МДА к 50 мкл конечной реакционной суспензии (липосомы–соединение–ионол) добавляли 20 мкл 0,495 М соли Мора и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Затем к образцам добавляли 1030 мкл 0,9% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты в 50% уксусной кислоте, интенсивно встряхивали и инкубировали при 80 °С в течение 60 мин. После охлаждения измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре DU-50 (Beckman, США) в полумикрокювете при 532 нм. Расчет количества МДА проводили на основании коэффициента молярной экстинкции, который был равен  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.11.3. Активность и стабильность иммобилизованных на ДНА ферментов<sup>9</sup>**

#### *2.11.3.1. Активность протеолитических ферментов*

Определение каталитической активности трипсина, папаина и химотрипсина осуществляли по модифицированной методике [313], заключающейся в образовании паранитроанилина из хромогенного олигопептидного специфического субстрата путем измерения

<sup>9</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи сотрудников кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ: в.н.с., д.х.н., проф. Г.Н. Руденской, к.х.н., доцента Е.В. Родиной и при участии аспиранта РязГМУ А.В. Валовой.

величины поглощения реакционной смеси на длине волны  $\lambda = 410$  нм и применения закона Бугера-Ламберта-Бэра для расчета количества образовавшегося пара-нитроанилина. Активность трипсина определяли спектрофотометрически по *n*-нитроанилидному субстрату BZ-Arg-pNA (БАПА) [314], Glp-Ala-Ala-Leu-pNA - для химотрипсина [313] и ZD-Ala-Leu-Arg-pNA - для папаина [315]. Удельную объёмную активность фермента выражали в международных единицах (U/мл). 1 U/мл соответствует скорости превращения 1 мкмоль субстрата за 1 минуту под действием 1 мл раствора фермента.

Для определения активности трипсина в микропробирки вносили 10 мкл субстрата (5 мг/мл), 50 мкл раствора фермента, 740 мкл рабочего буфера (0,05M Tris-HCl буфер, pH 7,1). Реакционную смесь инкубировали при температуре 37°C до образования светло-желтого окрашивания раствора. После остановки реакции с помощью 100 мкл 50%-ной уксусной кислоты измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 410 нм на спектрофотометре Genesys UV10 (Thermo Spectronic, США).

Для определения активности папаина к 860 мкл 50 мМ буферного раствора Tris-HCl с pH 7-8 поочередно добавляли раствор субстрата в ДМФА (концентрация 5 мг/мл) объёмом 10 мкл и 30 мкл раствора папаина с концентрацией 2 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37 °C до пожелтения раствора и останавливали реакцию 100 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Далее измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны  $\lambda = 410$  нм относительно контрольного раствора, в который к буферному раствору Tris-HCl добавляли раствор нативного папаина, 50%-ную уксусную кислоту и субстрат.

Для определения активности химотрипсина к 630 мкл 50 мМ буферного раствора Tris-HCl с pH 7-8 поочередно добавляли раствор субстрата Glp-Ala-Ala-Leu-pNA в ДМФА (концентрация 5 мг/мл) объёмом 20 мкл и 250 мкл раствора химотрипсина с концентрацией 0,227 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37 °C до пожелтения раствора и останавливали реакцию 100 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Далее измеряли оптическую плотность полученного раствора при  $\lambda = 410$  нм относительно контрольного раствора, в который реагенты вносили в следующем порядке: к буферному раствору Tris-HCl добавляли раствор химотрипсина, 50%-ную уксусную кислоту и субстрат.

Расчёт ферментативной активности с учётом времени с момента внесения фермента до момента остановки реакции проводили по следующим формулам:

$$A = \frac{A_{410} * 1000}{\epsilon_{410} * l * \Delta t * v} \quad (2), \quad A_{yo} = \frac{A}{c} \quad (3),$$

где  $A_{410}$  – оптическая плотность раствора при длине волны 410 нм [о.е.]; 1000 – коэффициент пересчёта объёмов к 1 мл;  $l$  – длина оптического пути [1 см];  $\epsilon_{410}$  – экстинкция *n*-нитроанилида при длине волны 410 нм [8900 M<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>];  $\Delta t$  – время с момента внесения фермента до момента остановки реакции [мин];  $v$  – объём пробы раствора фермента [мкл];  $c$  – концентрация

белка в препарате [мг/мл]. Размерности  $A$  – мкмоль субстрата/мин\*мл;  $A_{уд}$  – мкмоль субстрата/мин\*мг белка или на мг препарата.

### 2.11.3.2. Стабильность иммобилизованных на ДНА ферментов

**Трипсин.** Стабильность трипсина, иммобилизованного на ДНА, была изучена при разных температурах и значениях  $pH$ .

Варьирование температуры. К 3 мг ДНА с иммобилизованным трипсином добавляли 980 мкл 0.05 М ТрисНС1 буфера с  $pH$  7.0 и 20 мкл субстрата БАПА (исходная концентрация 2,5 мг/мл), перемешивали и помещали в термостат и выдерживали при температуре 26, 37, 50, 60, 70 °С. После развития видимой жёлтой окраски реакцию останавливали добавлением 100 мкл 50% уксусной кислоты. Супернатант отделяли центрифугированием и измеряли поглощение при длине волны 410 нм ( $A_{410}$ ). В качестве контроля использовали нативный трипсин (исходный раствор 4 мг/мл, 980 мкл 0.5М ТрисНС1  $pH$  7.0). К 10 мкл этого раствора трипсина добавляли 20 мкл субстрата и помещали в термостат при тех же температурах.

Варьирование  $pH$ . К 5 мг иммобилизованного на ДНА трипсина добавляли по 980 мкл универсального буфера с соответствующим значением  $pH$  (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем ДНА с иммобилизованным трипсином осаждали центрифугированием, супернатант удаляли, осадок дважды промывали 0.05М ТрисНС1 с  $pH$  7,0. Добавляли 980 мкл этого же буфера, 20 мкл БАПА ( $C_{исх} = 2,5$  мг/мл) и инкубировали при 37 °С до развития жёлтой окраски, после чего реакцию останавливали добавлением 100 мкл 50% уксусной кислоты и измеряли поглощение при  $\lambda = 410$  нм ( $A_{410}$ ). Аналогично определяли влияние  $pH$  на стабильность трипсина. К 50 мкл раствора трипсина в 0.05 М ТрисНС1  $pH$  7,0 ( $C_{исх} = 10$  мг/мл) добавляли 100 мкл универсального буфера с соответствующими значениями  $pH$  и инкубировали при комнатной температуре 5 мин, 4 и 24 ч. Затем добавляли 830 мкл 1М ТрисНС1  $pH$  7,0 для получения  $pH$  реакционной смеси 7,0 и 20 мкл БАПА ( $C_{исх} = 2,5$  мг/мл). Инкубировали смесь при 37°С до появления жёлтой окраски, после чего реакцию останавливали добавлением 100 мкл 50% уксусной кислоты и измеряли значение  $A_{410}$ .

**Папаин.** Стабильность папаина, иммобилизованного на ДНА, была изучена в водно-спиртовом растворе. Для этого к 490 мкл 50 мМ буферного раствора Tris-HCl с  $pH$  7-8, содержащего объёмную долю спирта от 0 до 50%, поочерёдно добавляли 10 мкл раствора субстрата ZD-Ala-Leu-Arg-pNA в ДМФА ( $c = 5$  мг/мл) и 400 мкл раствора конъюгата ( $c = 2,2$  мг/мл). После пожелтения раствора к нему добавляли 100 мкл 50%-ной уксусной кислоты, после чего измеряли ферментативную активность иммобилизованного на ДНА папаина. При изучении стабильности в водно-спиртовых средах нативного папаина использовали 770 мл буферного

раствора 50 мМ Tris-HCl, содержащего объёмную долю спирта от 0 до 50%, и 120 мл раствора нативного папаина с концентрацией 0,455 мг/мл.

**Химотрипсин.** *Длительное хранение.* Для изучения стабильности при хранении иммобилизованного химотрипсина использовали ДНА-химотрипсин с концентрацией 0,4 мг/мл, который хранили в 50 мМ буферном растворе Tris-HCl с *pH* 7-8 при температуре 4 °С в течение 30 дней. В контрольном опыте в таком же буферном растворе в тех же условиях хранили раствор нативного химотрипсина концентрацией 0,01 мг/мл. Через 15 и 30 дней измеряли активности конъюгата ДНА-химотрипсин и нативного фермента.

*Термостабильность.* Для изучения термостабильности конъюгата ДНА-химотрипсин к 630 мкл 50 мМ буферного раствора Tris-HCl с *pH* 7-8 добавляли 250 мкл раствора конъюгата ( $c = 0,22$  мг/мл) и выдерживали в термостате при температуре 50 °С в течение 1 ч. Через определённые промежутки времени (от 15 до 30 мин) измеряли его ферментативную активность. Активность нативного фермента ( $c = 13$  мкг/мл) измеряли по аналогичной методике.

### 2.11.3.3. Активность пирофосфатазы

Ферментативную активность неорганической пирофосфатазы *E. Coli* (РРаз) определяли при температуре 20 °С по скорости образования гидрофосфата путем непрерывного измерения концентрации  $P_1$  на полуавтоматическом анализаторе фосфата [316]. Это определение основано на сдвиге максимума поглощения раствора метилового зеленого (632 нм) в более длинноволновую область (656 нм), происходящем при связывании молибдат-иона.

Перед подачей на анализатор фосфата анализируемый раствор, содержащий РРазу, иммобилизованную на ДНА, разбавляли в 100 раз ( $C_{исх} = 0,008 \pm 0,002$  мг/мл,  $C_{ДНА} \leq 0,010$  мг/мл) и добавляли к реакционной смеси объемом 10 мл аликвоту объемом 5-10 мкл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Реакционная смесь содержала буфер (50 мМ Tris-HCl *pH* 7,5), субстрат (100 мкМ пирофосфат магния) и кофактор (5 мМ  $MgCl_2$ ). После введения в нее аликвоты фермента реакционную смесь подавали в полуавтоматический анализатор, где она смешивалась с раствором 1 ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O - 24$  г,  $H_2SO_{4конц.} - 77$  мл, вода – 2 л), а затем с раствором 2 (метилловый зелёный – 150 мг, Triton X-305 – 6,8 г, вода – до 2 л). Оптическую плотность полученного раствора фосфомолибдатного комплекса измеряли в проточной кювете и регистрировали на самописце. Скорость гидролиза определяли по тангенсу угла наклона прямой, отражающей накопление фосфата в ячейке от времени ( $tg \alpha$ ). Концентрацию фосфата определяли по калибровочной прямой. Чувствительность ( $k$ ) при определении фосфата составляла 70- 90 мм для 5 мкМ раствора фосфата.

Удельную активность фермента выражали в международных единицах (МЕ/мг). 1 МЕ/мг соответствует скорости превращения 1 микромоля субстрата за 1 минуту под действием 1 мг фермента. Активность рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{V_{яч} \cdot k \cdot tg\alpha}{2 \cdot V_E \cdot [E]} \quad (4),$$

где  $V_{яч}$  – объем реакционной смеси (мл);

$V_E$  – объем добавляемой в ячейку аликвоты фермента (мкл);

$[E]$  – концентрация фермента (мг/мл);

$k$  – определяемый в отдельном опыте коэффициент пересчета, равный концентрации фосфата (в мкМ), которая дает отклик самописца на 1 мм;

$tg\alpha$  – измеряемая начальная скорость накопления фосфат-иона (мм/мин).

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при  $\lambda = 280$  нм. Раствор пирофосфатазы с концентрацией 1 мг/мл при длине оптического пути 1 см имеет поглощение 1,18 ОЕ.

## 2.12. Проникновение ДНА в клетки<sup>10</sup>

В эксперименте использовали две клеточные культуры: MOLT-4 – лейкозные клетки человека (полученные из Т-клеточной опухоли и сходные с лимфоцитами периферической крови), выращенные в Лаборатории электронной микроскопии медицинского факультета Университета им. Франсуа Рабле (г. Тур, Франция) и HeLa – клетки арциномы шейки матки, выращенные в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова. Клетки сажались на покрытые полилизинем круглые стеклянные покровные стекла, которые находились в специальных планшетах для культивирования. В культуральную среду объемом 500 мкл добавлялись гидрозоль исходного ДНА и конъюгаты ДНА-глицин и ДНА-амикацин в количестве 25 мкл ( $c = 1$  мг/мл), которые инкубировали с клетками в течение 15 мин, 2, 4 и 24 ч. Далее проводили процедуру отмывки клеток, их проводки и фиксации смолой. Методика проводки клеток для электронной микроскопии заключалась в следующем.

### 1. Фиксация.

а) Промывали стекла с клетками с помощью PBS при 37 °С в течение 15 с.

б) Фиксатор TRUMP (4%-ный формальдегид, 1%-ный глютаровый альдегид на 0,1 М фосфатном буфере Зеренсена) разливали в новые плашки, идентичные тем, в которых культивировали клетки. Стекло с клетками погружали в фиксатор и выдерживали не менее 2 ч.

<sup>10</sup> Работа выполнена под руководством, при участии и консультативной помощи д.б.н., проф. Узбекова Р.Э. (Университет им. Франсуа Рабле, г. Тур, Франция) и в.н.с., д.б.н., Алиевой И.Б. (отдел электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова). Профессором У.Э. Узбековым в Университете Франсуа Рабле из заливок образцов ДНА с клетками HeLa вырезались пирамидки, резались на микротоме, просматривались на просвечивающем электронном микроскопе и проводились статистические расчеты.

## 2. Промывка.

Клетки промывались 0,15 М фосфатным буфером Зеренсена 3 раза по 10 мин.

## 3. Постфиксация.

Клетки инкубировались 1 ч в 2%-ном растворе оксида осмия (VIII) в 0,15 М буферном растворе Зеренсена.

## 4. Отмывка и дегидратация.

Стекла с клетками промывали:

- а) дистиллированной водой 3 раза по 5 мин;
- б) 50% этиловым спиртом 2 раза по 5 мин. Если раствор окрашивался из-за остатком иона осмия, то делали несколько дополнительных отмывок;
- в) 70% этиловым спиртом 2 раза по 10 мин;
- г) 90% этиловым спиртом 2 раза по 15 мин;
- д) абсолютным этиловым спиртом 2 раза по 30 мин;
- е) инкубировали в смеси спирта и пропилен оксида 1:1 в течение 3 мин;
- ж) инкубировали с пропилен оксидом 3 раза по 20 мин.

## 5. Пропитка.

- а) Проводили смесью пропилен оксида и Эпона в соотношении 3:1 с открытыми пробками в течение 12 ч;
- б) заливали клетки 100% Эпоном и выдерживали в течение 24 ч.

## 6. Полимеризация.

- а) Заменяли старый Эпон на новый и стекла с клетками выдерживали в течение 24 ч при 37 °С;
- б) переносили заливки с клетками в термостат при температуре 60 °С на 48 ч.

После полимеризации Эпона, стекло удаляли с помощью термического шока (перенос образцов из горячей воды в емкость с жидким азотом), при котором клетки остаются в смоле. Образцы клеток в смоле использовали для получения серийных ультратонких срезов на ультрамикротоме Leica Ultracut UCT (Leica, ФРГ), которые дополнительно контрастировали ацетатом урана и просматривали в просвечивающих электронных микроскопах JEM 1230 и JEM 1011 (JEOL, Япония).

## 2.13. Митохондриальная активность ДНА<sup>11</sup>

Митохондриальную активность ДНА определяли по изменению мембранного потенциала изолированных митохондрий печени крыс. В исследовании использовали 5 особей взрослых крыс-самцов линии Wistar (весом 230-250 г).

Выделение митохондрий печени крыс. После декапитации животного извлекали печень и гомогенизировали ее в охлаждаемой льдом среде выделения, содержащей 300 мМ сахарозы, 10 мМ трис(гидроксиэтил)аминометана (Tris-HCl) (pH 7.4). Гомогенат центрифугировали при 1800 g в течение 6 мин при 0 °С. Супернатант отделяли и центрифугировали его при 5000 g в течение 20 мин при 0 °С. Осадок митохондрий ресуспендировали в среде выделения. Суспензию митохондрий хранили на льду. Содержание белка определяли Биуретовой реакцией с применением бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве стандарта.

Измерение митохондриальной активности. Все измерения проводили при непрерывном перемешивании в термостатируемой кювете объемом 1 мл при 25 °С. В качестве субстратов окисления использовали сукцинат калия с добавкой ротенона и пируват калия. Мембранный потенциал митохондрий определяли по распределению липофильного катиона трифенилфосфония (TRP), концентрацию которого в среде инкубации регистрировали с помощью TRP-селективного электрода компьютеризированной системы Record 4 (ИТЭБ РАН, Россия) [43]. Результаты измерений представляли в виде зависимостей концентрации TRP в среде инкубации от времени. RLM инкубировали в среде, содержащей 120 мМ KCl, 1.5 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ (HEPES) (pH 7,25), 4 мМ субстрата окисления и 1 мкМ TRP. В каждом эксперименте через каждые 100 с пять раз (через 60 с) добавляли по 10 мкл гидрозоля исследуемого ДНА (т.е. по 500 мкг ДНА). Было проведено по 3 независимых эксперимента.

## 2.14. Антибактериальная активность конъюгата ДНА-амикацин<sup>12</sup>

### Основные этапы проведения тестирования:

- Приготовление растворов антибактериальных препаратов (АБП);
- Приготовлении суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма);
- Инокуляция;
- Инкубация;
- «Учет и интерпретация результатов.

<sup>11</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи сотрудников Лаборатории биоэнергетики ФГБУН ИТЭБ РАН: гл.н.с. З.д.н. РФ, д.б.н., проф. М.Н. Кондрашовой и в.н.с., к.б.н. Н.И. Федотчевой, а также при участии аспиранта РязГМУ А.С. Соломатина.

<sup>12</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи зав. лабораторией неспецифической микрофлоры ЦНИИТ РАМН к.м.н. Селиной Л.Г.

Готовили основные» растворы АБП (пригодные для хранения) и «рабочие» - те, которые необходимо использовать «ex tempore». Для приготовления «основных» растворов АБП использовали субстанции АБП с известной активностью. Из «рабочих» растворов готовили двукратные разведения АБП. На каждый бактериальный штамм готовились 8 растворов исследуемого вещества, последовательно разбавленных в два раза с концентрациями 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 и 0,5 мкг/мл.

Использовали один из двух вариантов метода серийных разведений в бульоне: макрометод (пробирочный). Питательный бульон для определения чувствительности разливали по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок определялось необходимым диапазоном разведения АБП и увеличивалось на две для постановки двух видов контроля: контроля культуры и контроля антибиотика.

Приготовление серийных разведений АБП. Рабочий раствор готовили из основного с использованием питательного бульона. Затем, 0,5 мл рабочего раствора при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую пробирку, содержащую 0,5 бульона, тщательно перемешивали и переносили 0,5 мл раствора АБП в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Эту процедуру выполняли пока не был приготовлен весь необходимый ряд разведений. Одновременно готовились дополнительные ряды для тестирования контрольных штаммов. В качестве контроля использовали лиофилизированный порошок амикацина сульфата.

Приготовление инокулюма и инокуляция. Для инокуляции использовали стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту Мак Фарланда, разведенную в 100 раз в питательном бульоне, после чего концентрация микроорганизма в ней составляла 10 кое/мл. По 0,5 мл инокулюма вносили в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения АБП и в одну пробирку без антибиотика («отрицательный контроль»). Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке достигнет необходимой – примерно  $5 \times 10$  кое/мл. Пробирки закрывали стерильными пробками и инкубировали в обычной атмосфере при температуре 36 °С в течении 16-20 или 20-24 ч (в зависимости от вида тестируемого организма). Пробирка с «отрицательным контролем» помещалась в холодильник при 4°С, где хранилась до учета результатов. После высевали бульон на питательную среду – мясо-глюкозо-глицериновый агар (МГГА) с 10%-ной глюкозой и 2-3% - ным глицерином.

## **2.15. Методики *in vivo***

### **2.15.1. Экспериментальные животные**

Для изучения специфической фармакологической активности ДНА и их конъюгатов использовали животных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая» Московской области. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики

при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96), нормативному документу «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утвержденных Главным государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. №1045-73, и Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.). Животные содержались в виварии при температурном режиме 20-22 °С, при световом цикле - 12 часов светлый и 12 часов темный периоды, в пластмассовых клетках Т/4А размером 580x375x200 мм с верхней крышкой из нержавеющей стали и подстилкой обеспыленной из деревянной стружки. Животные содержались при постоянном доступе к корму и воде с использованием полного рациона экструдированного брикетированного корма (ГОСТ на корм Р 50258-92) и питьевой воды. При проведении экспериментов учитывались требования Комиссии по проблеме этики отношения к животным Российского национального комитета по биоэтике при РАН и этические нормы, изложенные в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.). Опыты проводили в первую половину дня.

Для изучения острой токсичности животных получали из питомника лабораторных животных ГУ Научный центр биомедицинских исследований РАМН. Они были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Животных содержали в клетках Т-3 по 7-8 особей в условиях искусственного освещения (12 часов светлого и темного времени) с принудительной 16-кратной в час вентиляцией, при температуре 18-20°С и относительной влажности 50-65% на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к питьевой водопроводной воде и брикетированному корму. Животные получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1, изготавливаемый ООО «Лабораторснаб». Содержание витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма: А-10 тыс.МЕ, В<sub>1</sub>-1 мг, В<sub>2</sub>-0,02 мг, В<sub>3</sub>-10 мг, В<sub>5</sub>-20 мг, В<sub>6</sub>-4 мг, D<sub>3</sub>-2 тыс.МЕ, Е-20 мг, Н-0,1 мг, К<sub>3</sub>-2 мг, эндокс-100 мг, Со-0,3 мг, Си-10 мг, Fe-80 мг, I-0,6мг, Мп-40 мг, Se-0,2 мг, Zn-60 мг.

Животные в других экспериментах содержались на базе сертифицированных вивариев РязГМУ им. И.П. Павлова, ИТЭБ РАН и 1-го МГМУ им. И.М. Сеченова в соответствии со всеми требованиями к уходу и содержанию экспериментальных животных.

### 2.15.2. Острая токсичность ДНА<sup>13</sup>

Исследования проведены на 120 мышах линии BALB/c (самцы, масса тела 18-22 г). Острая токсичность была изучена на гидрозолях конъюгата ДНА-глицин ( $c = 22,4$  мг/мл), ДНА (18 мг/мл) и аминокислоте глицине. Длительность наблюдения за подопытными животными после введения препарата составляла 14 дней.

Определение параметров острой токсичности препарата при однократном внутривнутрибрюшинном введении мышам проведено с использованием двухэтапного метода, на первом этапе которого на ограниченном количестве животных определяли ориентировочную LD<sub>50</sub> методом Дейхмана и Лебланка. Этот метод предусматривает использование шкалы доз, в которой каждая последующая испытываемая доза выше предыдущей на 50%. Первая доза, при которой наблюдается гибель животного, принимается за ориентировочную LD<sub>50</sub>, а предшествующая ей доза с выжившим животным - за максимально переносимую дозу. На втором этапе на группах животных (по 5-7 голов в каждой) испытываются дозы равные установленной ориентировочной LD<sub>50</sub>, выше и ниже ее. При этом с помощью метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона устанавливаются точные показатели LD<sub>10</sub>, LD<sub>16</sub>, LD<sub>50±m</sub> и LD<sub>84</sub>.

### 2.15.3. Побочные эффекты ДНА<sup>14</sup>

Регистрацию возможных побочных эффектов, признаков интоксикации и гибели животных проводили через 1 ч – 14 сут после внутривнутрибрюшинного введения в сравнении с глицином в дозах 75, 150 и 225 мг/кг. Исследование проводили на белых беспородных половозрелых мышах-самцах массой 20-24 г возрастом 2-3 месяца. Всего использовалось 42 животных – 7 групп по 6 мышей.

Осуществляли контроль побочных эффектов по следующим показателям:

- нарушение координации движений в тесте вращающегося стержня, удерживание 5 с на перевернутой сетчатой платформе, перелезание с перевернутой сетчатой платформы наверх;
- изменение характера шерстяного покрова, состояния слизистых оболочек, реакции на постукивание по клетке, порогов болевой реакции, позы (каталепсия),
- повышенные уринация, дефекация, саливация;
- нарушение ритма и глубины дыхательных движений;
- наличие агрессивности, повышенной пугливости, тремора, судорог;

<sup>13</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи сотрудников Лаборатории лекарственной токсикологии НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «РКНПК» Минздрава России: д.м.н., проф. Е.В. Арзамасцева, н.с. Э.В. Кудрявцева.

<sup>14</sup> Работы по изучению побочного действия изучаемых веществ были выполнены при консультативной помощи З.д.н. РФ, лауреата Государственной премии СССР и премии Правительства РФ д.м.н., проф. Т.А. Ворониной.

- наличие птоза верхнего века, пилоэрекции, вокализации, бокового положения, пинеального и роговичного рефлексов, седации, стереотипии, груминга, гибели животного.

#### **2.15.4. Антигипоксическая активность конъюгата ДНА-глицин<sup>15</sup>**

Антигипоксическую активность конъюгата ДНА-глицин исследовали в сравнении с фармакопейным глицином и препаратом сравнения мексидолом согласно [317, 318], используя тесты нормобарической [319] и гемической гипоксии [320].

Исследование выполнено на 10 группах белых беспородных половозрелых мышей-самцах массой 23-28 г по 10 животных в группе; 60 голов – в тесте нормобарической гипоксии, 40 голов – в тесте гемической гипоксии. Всего 100 особей.

В тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией («баночной» гипоксии) мышей одинакового веса (разброс не более 2-х г) помещали по одному животному в герметически закрываемые банки объемом 200 см<sup>3</sup> или 250 см<sup>3</sup>, которые плотно закрывали крышкой и смазывали герметиком. Животное при дыхании в замкнутом пространстве поглощает кислород и выдыхает углекислый газ (ререспирация), вследствие чего возникает дефицит кислорода во вдыхаемом воздухе и развивается гипоксия. Регистрировали время выживания (резервное время) животных в условиях гипоксии. Вещества вводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл на 10 г веса мыши однократно за 40 минут до помещения животного в гермообъем (банки объемом 200 см<sup>3</sup>). При изучении антигипоксической активности в тесте термобарической гипоксии при повторном внутрибрюшинном введении вводили 2 раза (за 4 часа и 40 мин) до помещения животного в гермообъем (банки объемом 250 см<sup>3</sup>). Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду.

В тесте гемической гипоксии для получения гипоксии мышам вводили подкожно нитрит натрия в дозе 300 мг/кг и регистрировали время выживания (резервное время) животных в условиях возникающей гипоксии. Конъюгат ДНА-глицин и нативный глицин вводили однократно в объеме 0,1 мл на 10 г веса мыши внутрибрюшинно за 40 мин до введения нитрита натрия. Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду. Статистическая обработка результатов была осуществлена с помощью статистических пакетов "BioStat" для Windows. Рассчитывали средние показатели по группе и стандартные ошибки показателей.

---

<sup>15</sup> Работы по изучению побочного действия изучаемых веществ были выполнены при консультативной помощи З.д.н. РФ, лауреата Государственной премии СССР и премии Правительства РФ д.м.н., проф. Т.А. Ворониной.

### 2.15.5. Противоинсультная активность конъюгата ДНА-глицин<sup>16</sup>

Исследование противоинсультного действия ДНА-глицин проведено с использованием методики инсульта, вызванного интрацеребральной посттравматической гематомой [321]. Динамику развития нарушений, вызванных посттравматической гематомой, и влияние веществ на поведение и состояние крыс наблюдали в течение 14 сут. после операции с регистрацией показателей поведения на 1-, 3-, 7-, и 14-е сут после операции. Регистрировалась гибель животных, проявления неврологического дефицита, степень изменения когнитивных функций и эмоционального статуса крыс. Эксперименты выполнены на половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 280-300 г в количестве 40 особей.

Изучение влияния конъюгата ДНА-глицин на неврологический статус животных после геморрагического инсульта проводили по шкале Stroke-index McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной. Неврологические симптомы регистрировали в баллах по наличию у крыс легкой неврологической симптоматики (вялость движений, слабость конечностей, тремор, односторонний и двусторонний полуптоз/птоз) и тяжелых проявлений неврологических нарушений (манежные движения, парезы 1-4 конечностей, параличи нижних конечностей, боковое положение). Регистрировали также число (в %) крыс с неврологическими нарушениями.

Изучение влияния конъюгата ДНА-глицин на когнитивные функции животных после геморрагического инсульта проводили с использованием теста выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [322]. Для обучения УРПИ животных помещали в установку Passive avoidance фирмы Lafayette Instrument Co (США). Конструктивно установка состоит из маленькой платформы, расположенной на расстоянии 1 м от пола, освещенной специальной лампой и соединенной с ней темной камеры с электродным полом. Крыс помещали на освещенную платформу перед входом в темную камеру установки хвостом к входному отверстию в темную камеру и регистрировали латентное время захода в камеру (ЛП рефлекса). Затем в темной камере крыса получала однократное неизбежное болевое раздражение электрошоком (0,45 мА) продолжительностью 10 с. Тест на воспроизведение УРПИ осуществляли через 1, 7 и 14 сут после обучения с регистрацией латентного периода первого захода крысы в темную экспериментальную камеру, и количества животных, не зашедших в темный отсек камеры, в %.

---

<sup>16</sup> Работы по изучению побочного действия изучаемых веществ были выполнены при консультативной помощи З.д.н. РФ, лауреата Государственной премии СССР и премии Правительства РФ д.м.н., проф. Т.А. Ворониной.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Для использования ДНА в качестве носителя в системах доставки БАВ и ЛВ, в первую очередь, необходимо разработать способы его стандартизации и унифицирования. Благодаря этому ДНА можно будет применять на моделях *in vitro* и *in vivo* с гарантией того, что результаты не будут меняться в зависимости от производителя ДНА, партии или содержания примесей. После этого можно разрабатывать способы химического модифицирования ДНА и иммобилизации БАВ и ЛВ на его поверхности, а также изучать их физико-химические, биофармацевтические и токсико-фармакологические характеристики [323].

#### 3.1. Физико-химические свойства промышленных ДНА

В настоящее время в производстве детонационных НА нет единой оптимальной технологии синтеза, очистки и диспергирования, а также установленной системы их сертификации [324]. Каждый производитель выпускает ДНА по своим техническим условиям (ТУ), что сказывается на особенностях химических и физико-химических параметров синтеза и очистки. Последние же влияют на количество и состав примесей, химическое состояние поверхности образцов ДНА, способность к их дезагрегации и образованию устойчивых гидрозолей, а также на поведение ДНА в реакциях химического модифицирования. Поэтому часто наблюдаются невоспроизводимость и нестабильность физико-химических и биологических характеристик ДНА промышленного производства не только разных торговых марок, но и ДНА разных партий одной торговой марки, поскольку авторы, как правило, не приводят данных о торговой марке и характеристиках исследуемых ДНА.

В работе были детально изучены образцы промышленных ДНА трех производителей и 6 торговых марок с использованием комплекса физико-химических методов: ИКС, ДСК, РФА, ПЭМ, СЭМ, РФЭС, ДРС. Характеристики образцов ДНА представлены в Табл. 11.

Таблица 11. Марки образцов, производители и характеристики (по данным производителей) изученных ДНА.

Характеристика	Значение
<b>Образец I – PL-D-G01 («PlasmaChem», Германия)</b>	
Форма выпуска	порошок
Удельная площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г	350-390
Область когерентного рассеяния (ОКР), нм	4
Размер агрегатов алмаза, нм	5-15

Зольность, %	<1,4
<b>Образец II- Standart ND («Adamas nanotechnologies», США)</b>	
Плотность, г/см <sup>3</sup>	3,5
Растворимость	не растворяется
Условие образования стабильных суспензий	pH=4-5 (10 масс.% водной суспензии)
<b>Образец III – PL-SDND («PlasmaChem», Германия)</b>	
Форма выпуска	порошок
Размер кристаллов алмаза, нм	4-6
Содержание примесей, %	Fe<0,3; Cu<0,01; Zn<0,01; Mn<0,01; Si+Cr+Ca+Ti<0,01
Зольность, %	<1,4
Пикнометрическая плотность, г/см <sup>3</sup>	3.18
ζ-потенциал, мВ	-55±5
<b>Образец IV – УДА-ТАН (СКТБ «Технолог», Россия)</b>	
Химическая очистка	азотная кислота, аммонолиз при 200 °С и давлении
Сушка	распылительная
Описание агрегатов	мелкие непрочные
Содержание неалмазного углерода, масс.%	1,1
Несгораемые примеси, масс.%	0,85

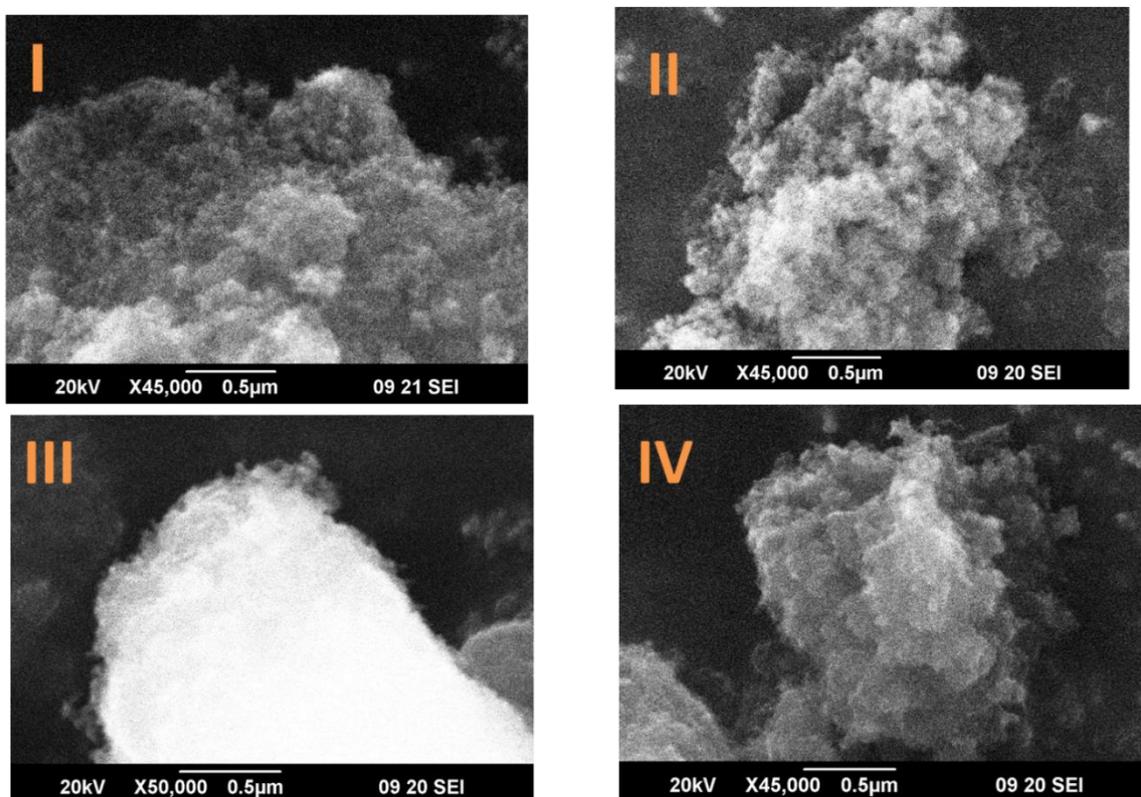
В массе ДНА представляли собой порошки светло-серого цвета. Отличия между марками незначительные.

УДА-СТП и УДА-СФ после обработки кислотой их водной суспензии сушились в разных режимах, в результате чего УДА-СФ оказался менее агрегирован. Марка УДА-ТАН отличается от марки УДА-СФ дополнительной стадией обработки аммиаком при pH = 10 (аммонолиз) для амминирования и удаления остаточных примесей азотной кислоты и окислов азота. Соотношение окисляемого кислотами (неалмазного) и неокисляемого (алмазного) углерода в образцах наноалмаза приведено в Табл. 12.

Таблица 12. Углеродный состав наноалмазов различных марок.

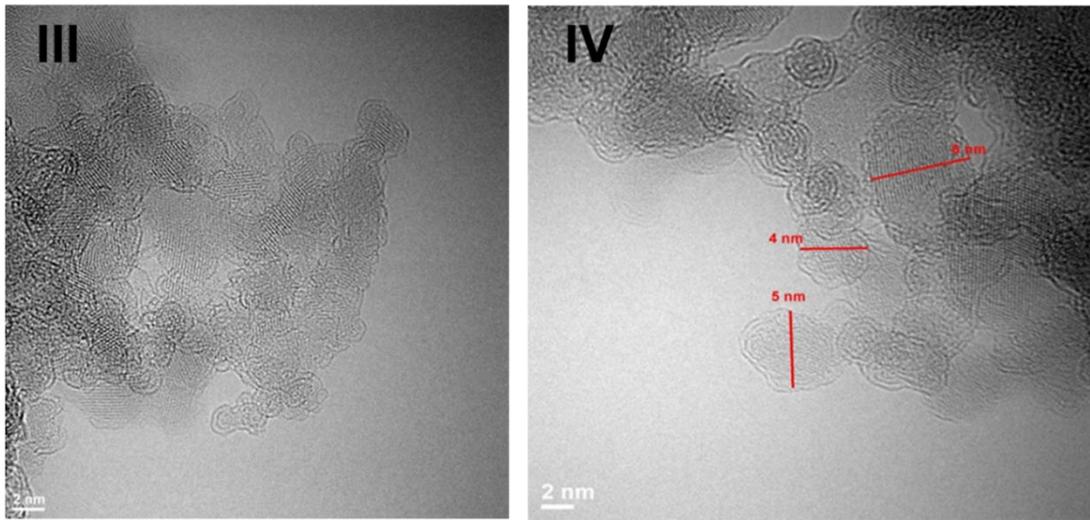
Марка наноалмаза	C <sub>алм</sub> , % масс.	C <sub>неалм</sub> , % масс.	Несгораемые примеси, % масс.
УДА-СФ	98,75	0,8	0,45
УДА-СТП	98,2	1,1	0,7
УДА-ТАН	98,05	1,1	0,85

При сравнении ДНА различных марок значимым может оказаться выявление различий в структуре частиц наноалмазного порошка [325]. Для этого исследовали образцы ДНА методом СЭМ (Рис. 16). Из Рис. 16 следует, что все образцы ДНА имеют ультрамикроструктуру и содержат рыхлые агрегаты различного размера. В случае образца **III** заметно, что по своей структуре он несколько отличается от других образцов. Кроме того, образец **III** на микрофотографиях (Рис. 16ш) был сильно засвечен. Это, по-видимому, обусловлено большим содержанием кислородсодержащих групп, образующихся при его приготовлении, поскольку известно, что этот ДНА выделяют из АШ методом химического диспергирования путем многоступенчатой обработки сильными кислотами (с катализатором) и с последующей глубокой очисткой от катионов и анионов при помощи хроматографии и электрофореза [326].



**Рисунок 16.** Изображения образцов ДНА, полученные методом СЭМ: а– образец **I**, б - образец **II**, в - образец **III**, г - образец **IV**.

Также образцы ДНА были изучены с использованием метода ПЭМ высокого разрешения. Изображения частиц ДНА образцов **III** и **IV** приведены на Рис. 17. Изображения частиц ДНА двух других образцов идентичны представленным. Как видно из Рис. 17, частицы ДНА имеют сферическую форму. Размер частиц, в основном, находится в диапазоне 3-10 нм. При этом частицы ДНА в образце **III** в целом оказались мельче, чем в других трех образцах.



**Рисунок 17.** Микрофотографии ПЭМ частиц ДНА (левый – образец **III**, правый – образец **IV**).

Для оценки кристалличности и размера области когерентного рассеяния (ОКР) частиц ДНА были получены рентгеновские дифрактограммы, которые представлены на Рис. 18. На них присутствуют рефлексы, соответствующие граням (111) и (220) алмаза. По уширению рефлексов на дифрактограммах видно, что все образцы ДНА полидисперсны. Хотя контуры экспериментальных отражений (111) и (220) для всех образцов несимметричны, тем не менее, нам удалось рассчитать средние размеры ОКР для каждого образца воспользовавшись формулой Шерера.

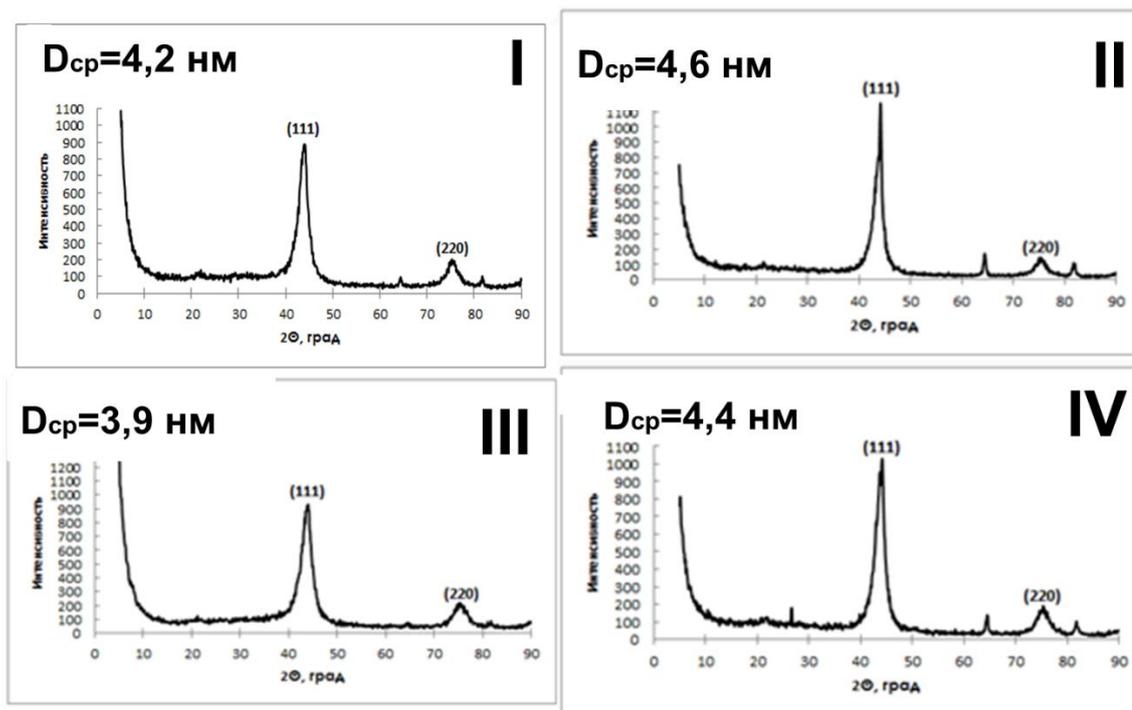
$$D = (0,9 * \lambda) / (\beta * \cos \Theta)$$

где  $D$  – размер частиц (нм),  $\lambda$  – длина волны (нм),  $\beta$  – ширина рефлекса на полувысоте (рад),  $\Theta$  – угол отражения ( $^{\circ}$ ).

Полученные величины представлены в Табл. 13, из которой следует, что наименьший размер ОКР характерен для образца **III** [326].

*Таблица 13.* Диаметр алмазного ядра в частицах образцов наноалмаза.

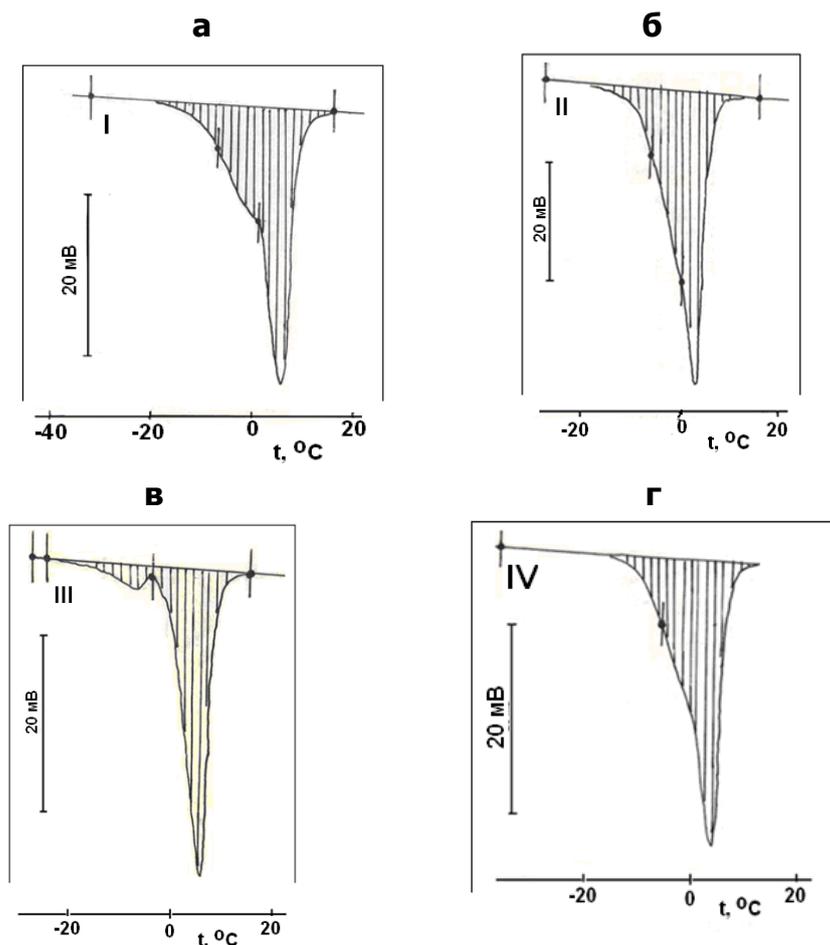
Образец ДНА	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
D, нм	4,19	4,62	3,91	4,35



**Рисунок 18.** Дифрактограммы исходных ДНА: а - образец **I**, б - образец **II**, в - образец **III**, г - образец **IV**.

Согласно положениям отражений  $hkl$  от кристаллографических плоскостей на рентгенограммах, отмечено присутствие кристаллических фаз примесей. Рефлексы справа и слева от рефлекса (220) отвечают железу, содержащемуся в материале кюветы. Кроме того, асимметрия рефлекса (111), очевидно, связана с суперпозицией непосредственно рефлекса от алмаза. К тому же, по данным производителя образца **III**, железо является преобладающей примесью. Положение отражения фазы примеси при  $2\theta = 26,5^\circ$  на дифракционной картине (рис. 18, **IV**), предположительно, указывает на присутствие фазы графита.

Степень агрегации частиц ДНА в порошках исследовали методом ДСК [327, 328], позволяющим определить проявление тепловых эффектов при плавлении нанофазы льда в межчастичном пространстве в агрегатах ДНА. Полученные дифференциальные термограммы представлены на Рис. 19. Видно, что наиболее дезагрегированным образцом является образец **III**, так как только для него четко заметен эндотермический эффект при температуре около  $-7^\circ\text{C}$ , соответствующий плавлению наноразмерных кристаллов льда в порах агрегатов. Наиболее агрегированным оказался образец **II** [326].



**Рисунок 19.** Кривые ДСК исходных коммерческих ДНА: а – образец **I**, б – образец **II**, в – образец **III**, г – образец **IV**.

Можно предположить, что ДНА в биологии и медицине, в основном, будут применяться в виде стабильных гидрозолей [329, 58]. Известно, что на способность ДНА образовывать коллоидные растворы влияют состояние поверхности частиц, их размер и величина  $\xi$ -потенциала. Поэтому оценка размеров частиц и устойчивости гидрозолей для образцов разных марок, а также подбор оптимальных условий образования гидрозолей являются актуальной задачей.

Ранее было установлено [330], что, если суспензию ДНА подвергать обработке УЗО с последующим центрифугированием (ЦФ), то при увеличении числа циклов такой обработки степень диспергирования ДНА возрастает.

Нами были сопоставлены характеристики водных суспензий, полученных из изученных образцов ДНА в одинаковых условиях. Для этого были приготовлены 2%-ные водные суспензии исходных ДНА. Эти суспензии были обработаны девятикратно, причем каждый из циклов обработки состоял из УЗО (2 мин) и ЦФ (5 мин, 6000 g). Затем были зарегистрированы спектры ДРС, определены размеры частиц ДНА и величины  $\zeta$ -потенциала (Табл. 14). Из данных Табл. 14

следует, что полученные из исходных порошков ДНА разных марок гидрозоли сильно различаются как по размеру частиц, так и по значению их  $\zeta$ -потенциала. Только для образцов III и IV были получены достаточно устойчивые гидрозоли с малым размером агрегатов и высоким значением  $\zeta$ -потенциала [326]. Такое поведение ДНА, по-видимому, связано с различиями в химическом состоянии поверхности алмазных частиц.

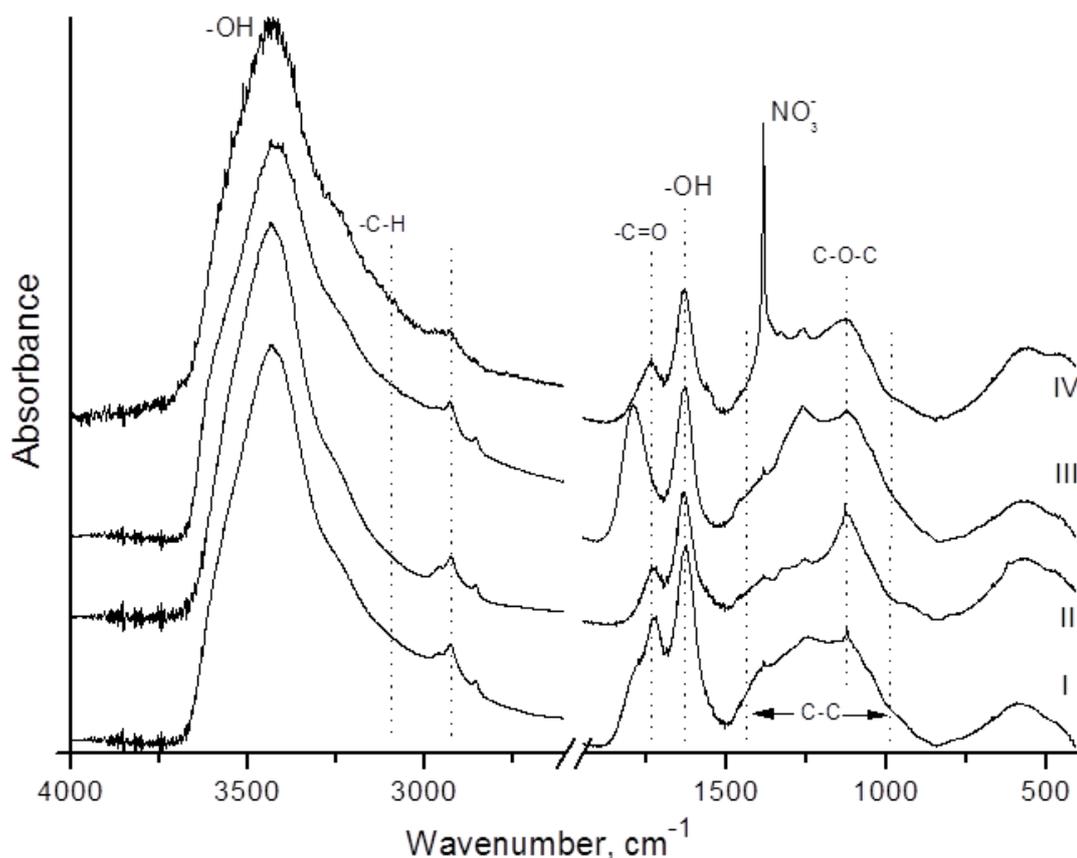
Таблица 14. Характеристики гидрозолей ДНА после 9 циклов обработки (УЗО+ЦФ),

Образец	Максимум на кривой распределения, нм	$\zeta$ -потенциал частиц ДНА, мВ
I	600±50	- 4,2 ± 3,0
II	550±50	- 10,6 ± 4,5
III	50±50	- 41,6 ± 10,5
IV	60±10	+ 33,8 ± 4,5

ИК-спектры исследованных образцов ДНА представлены на Рис. 20. Их анализ позволяет выявить следующие закономерности. Во всех спектрах не проявляются полосы поглощения в диапазоне 2600-1850  $\text{см}^{-1}$ , связанные с колебаниями кристаллической решетки алмаза. Очевидно, это обусловлено большой концентрацией поверхностных функциональных групп и тем, что они имеют большие коэффициенты экстинкции, чем связи C–C.

В ИК-спектрах всех образцов ДНА присутствуют полосы поглощения с максимумами 3440 и 1630  $\text{см}^{-1}$ , соответственно. Первая полоса очень широкая, несимметричная и имеет сложную структуру, обусловленную, по всей видимости, сильно выраженными колебаниями ассоциированных гидроксильных групп на поверхности ДНА и в адсорбированной воде. Вторая полоса довольно узкая и симметричная. Она отвечает деформационным колебаниям адсорбированных молекул воды, частично перекрывается с соседней полосой, отвечающей колебаниям карбонильной группы.

В области 2850-2950  $\text{см}^{-1}$  присутствуют полосы поглощения, которые соответствуют колебаниям C–H связи при  $sp^3$ -гибризованном атоме углерода. Считается [331], что полоса при 2926  $\text{см}^{-1}$  соответствует C–H группе на октаэдрической грани алмаза, а полоса 2854  $\text{см}^{-1}$  – на кубической грани алмаза.



**Рисунок 20.** ИК-Фурье спектры поглощения промышленных образцов ДНА.

Область  $1720-1790\text{ см}^{-1}$  оказалась наиболее информативной при выявлении различий между образцами ДНА. В спектрах образцов **I** и **III** присутствует полоса поглощения с максимумом  $1790\text{ см}^{-1}$ , которая обусловлена поглощением карбонильной группы  $>\text{C}=\text{O}$ ,

входящей в состав мостиковых групп типа  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$  и  $\begin{array}{c} \text{— O} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{— O} \end{array}$ . В спектрах образцов **II** и **IV** данная полоса отсутствует, но есть полоса с максимумом при  $1730\text{ см}^{-1}$ , которая, соответствует поглощению карбонильной группы  $>\text{C}=\text{O}$ . Однако эта группа также входит в состав карбоксильных, сложноэфирных и альдегидных групп, что усложняет отнесение полос поглощения в приведенной области [326].

В области  $1000-1500\text{ см}^{-1}$  наблюдаются существенные отличия между ИК-спектрами изученных образцов ДНА, характеризующиеся несколькими полосами поглощения. В этой области поглощают многие органические группы, и, кроме того, в этой области проявляется собственное поглощение решетки алмаза [79] и, как следствие, полосы сильно перекрываются. Поэтому идентификация полос затруднительна. Бесструктурные полосы поглощения в области  $400-1000\text{ см}^{-1}$  с плохо разрешенными пиками для всех образцов одинаковы и являются малоинформативными.

В отличие от спектров образцов **I**, **II** и **III** в ИК-спектре образца **IV** имеется узкая интенсивная полоса поглощения при  $1384\text{ см}^{-1}$ , которая соответствует поглощению нитрат-иона. Его наличие может быть обусловлено тем, что данный образец, вероятно, промывали азотной кислотой.

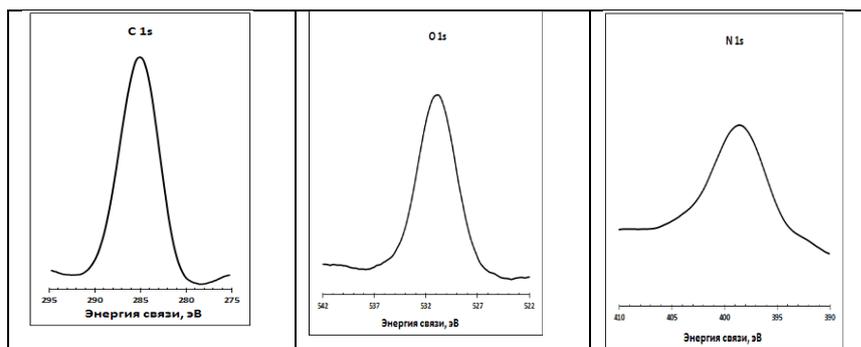
Таким образом, согласно ИК-спектрам, приведенным на Рис. 20, на поверхности всех ДНА имеется набор различных функциональных групп, причем наиболее ярко проявляется различие в характере карбонильных групп.

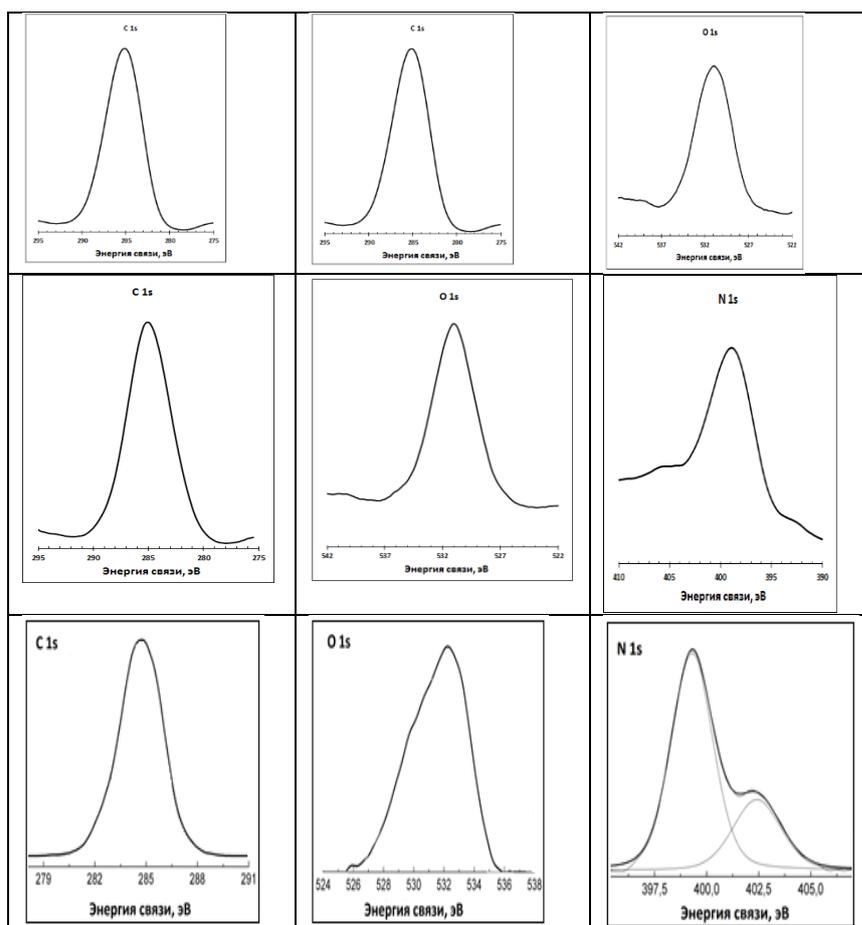
Различия в элементном составе поверхности изученных ДНА подтверждено и методом РФЭС (Рис. 21 и Табл. 15).

Таблица 15. Элементный состав поверхностных слоев частиц ДНА (по данным РФЭС).

Образец ДНА	Содержание элементов, ат. % (нормировано на С, О, N)		
	С	О	N
<b>I</b>	86,2	12,2	1,6
<b>II</b>	90,2	8,5	1,3
<b>III</b>	82,3	15,8	1,9
<b>IV</b>	91,3	8,7	1,0

Наибольшее содержание кислорода и азота обнаружено в образцах **I** и **III**, что свидетельствует о большей окисленности их поверхности. Стоит отметить, что образец **III** имеет наибольшее содержание кислорода и, по данным производителя, является самым дезагрегированным. Обнаружено, что в спектрах РФЭС образца **IV** пик N1s представлен двумя отличающимися по энергии компонентами 399,3 и 402,5 эВ. При этом последняя компонента связана с наличием иона  $\text{NO}_3^-$ , колебания которого проявились в ИК спектре образца **IV** (см. Рис. 20) с максимумом поглощения  $1384\text{ см}^{-1}$ . В таком случае, первый пик (399,3 эВ) можно уверенно отнести к азоту, входящему в состав самой наноалмазной частицы [79].





**Рисунок 21.** Рентгеновские фотоэлектронные спектры образцов исходных ДНА.

**Выводы:** изученные марки ДНА охарактеризованы комплексом физико-химических методов: ИКС, РФЭС, ДСК, ЭА, ГАА, РФА, ПЭМ, СЭМ, ДРС. Полученные в работе характеристики ДНА показали недостоверность предоставляемых производителем паспортных данных образцов. В исследованных образцах ДНА обнаружены различия в элементном составе, наборе функциональных групп, агрегированности порошков, величине дзета-потенциала и способности образовывать стабильные гидрозолы.

### 3.1.1. Примеси в ДНА

Для изучения примесного состава ДНА в работе был впервые применен метод ГАА [94]. Были проанализированы промышленные ДНА четырех коммерческих марок от трех производителей.

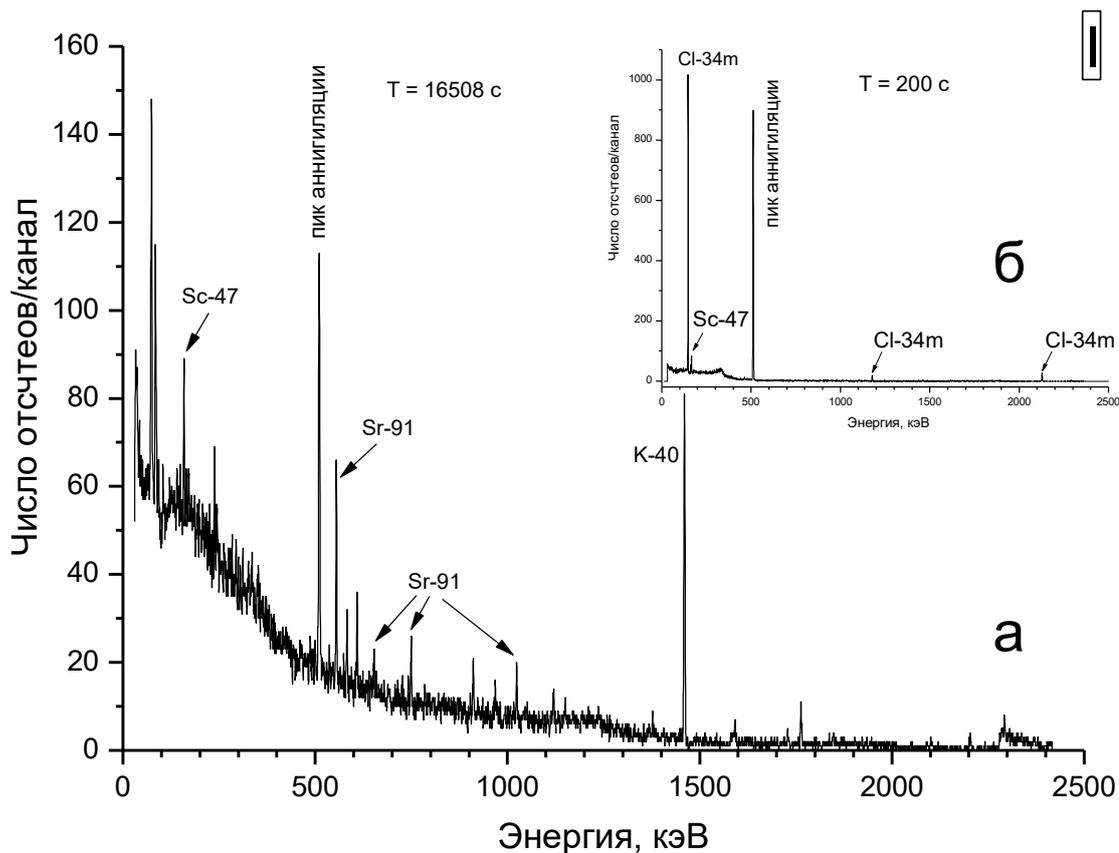
В работе также изучен примесный состав ДНА марки УДА-ТАН после модифицирования его поверхности в разных условиях (см. раздел 3.2. «Химическое модифицирование ДНА»).

Анализируемые образцы ДНА подготавливали к облучению двумя способами. *Первый способ* заключался в прессовании порошка ДНА в алюминиевой оболочке. По *второму способу* к навеске порошка ДНА добавляли порошок полистирола в соотношении 1:1, тщательно

перемешивали и прессовали (24-30 бар) в таблетку ( $d = 8$  мм,  $h = 3$  мм). В качестве мониторов потока гамма-квантов использовали медную фольгу толщиной 0.1 мм такого же диаметра, как и образцы. Необходимо отметить, что сначала проводили качественный анализ, по результатам которого готовили образцы сравнения. В качестве последних использовали подготовленные таким же образом, как и исследуемые образцы, соли или окислы соответствующих элементов. Из исследуемых образцов, мониторов потока гамма-квантов и образцов сравнения формировали сборку в алюминиевой фольге, которую устанавливали в поле тормозного излучения ускорителя. Обычно длина сборки составляла 20-25 мм, количество образцов в одной сборке не превышало 26. Время облучения составляло 60 мин. От конца облучения до начала измерения обычно проходило 1.5-2 ч.

Для количественного определения примесей анализируемые образцы ДНА, образцы сравнения и медную фольгу взвешивали перед облучением. Масса всех образцов была в пределах 100-800 мг. Медную фольгу размещали равномерно по длине сборки с образцами. Образцы сравнения облучали одновременно с анализируемыми образцами. После окончания облучения проводили последовательные измерения отдельных образцов из сборки на гамма-спектрометре.

На Рис. 22 представлены характерные гамма-спектры исследованных образцов ДНА, измеренные непосредственно после облучения ( $\sim 2$  ч, Рис. 22,б) и через определенное время ( $\sim 24$  ч, Рис. 22,а). Обычной практикой радиоактивационного анализа является неоднократное измерение проб для регистрации коротко-, средне- и долгоживущих радионуклидов [332]. Обычно наиболее полная картина о содержащихся в образце изотопах, на гамма-спектре проявляется спустя сутки после облучения, поэтому полученным таким образом спектрам присвоен индекс *a*. На гамма спектре, полученным сразу после облучения, можно наблюдать только короткоживущие изотопы, которые обычно составляют небольшую часть от всех изотопов. Поэтому гамма-спектру полученных сразу после облучения присвоен индекс *b*. На приведенных гамма-спектрах видно, что после выдержки и увеличения времени экспозиции в них проявляются новые гамма-линии, что позволяет расширить круг определяемых элементов. Так, при регистрации короткоживущих изотопов на спектрах образцов ДНА (Рис. 22,б) были выявлены фотопики  $\text{Cl}^{34m}$  (146.4, 1176.4 и 2127.5 кэВ, соответственно),  $\text{Sc}^{47}$  (159.5 кэВ),  $\text{Mn}^{56}$  (846.7 кэВ),  $\text{Sr}^{89}$  (388.5 кэВ). Именно содержание этих элементов рассчитывалось по их фотопикам на Рис. 22,б. Остальные найденные элементы определяли по гамма-спектрам, представленных на Рис. 22,а.

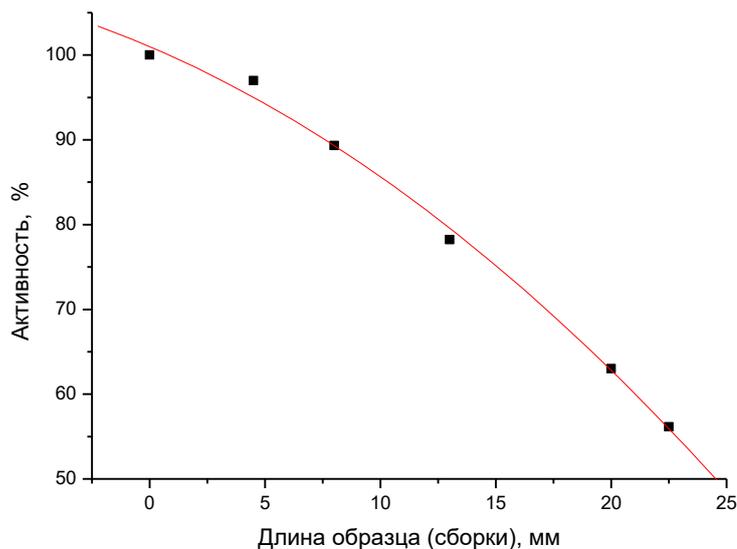


**Рисунок 22.** Гамма-спектры образца ДНА I. а – получены спустя несколько дней после облучения; б – получены непосредственно после облучения [94].

Для определения содержания примесей применяли относительный метод [333]. По результатам измерения активности медных мониторов строили график зависимости их активности от места положения в сборке (Рис. 23). Впоследствии в результаты измерения активности образцов и образцов сравнения вводились соответствующие поправки. Содержание определяемого элемента в образце рассчитывали по формуле

$$m_{\text{элемент}} = m_{\text{стандарт}} \cdot A_{\text{элемент}} / A_{\text{стандарт}} \quad (5),$$

где  $m_{\text{элемент}}$  и  $m_{\text{стандарт}}$  – содержание элемента в анализируемом образце и образце сравнения, соответственно, а  $A_{\text{элемент}}$  и  $A_{\text{стандарт}}$  – соответствующие активности.



**Рисунок 23.** Зависимость активности образца ДНА I от его положения в сборке. Построено по изменению активности медных мониторов, взятых в качестве контрольных точек [94].

Несмотря на то, что образцы сравнения готовили на основании результатов качественного анализа, такой подход не всегда обеспечивает возможность закладки в сборку для облучения всего необходимого перечня элементов в качестве образцов сравнения. Например, в спектрах анализируемых образцов были обнаружены фотопики радионуклидов, образовавшихся из Sr и U, в то время как эти элементы отсутствовали в образцах сравнения. Для определения содержания таких элементов был использован метод единого стандарта, принципы которого в применении к нейтронно-активационному анализу изложены в статье [334] и получили последующее развитие в [335]. В нашем случае содержание определяемого элемента рассчитывали, используя линейный характер функции Бете-Левинджера [336], приняв за опорную точку активность медного или никелевого монитора. Относительная погрешность определения в этом случае не превышает 15 %.

В Табл. 16 представлены обнаруженные после активации изотопы примесных элементов в исследуемых образцах ДНА с указанием их энергии основной линии и времени полураспада  $T_{1/2}$ .

В изученных образцах ДНА обнаружено 12 примесных элементов: Cl, Ti, Cr, Fe, Ni, Zr, Mo, Sb, Sr, Mn, U, Eu [94]. Наименьшее время  $T_{1/2}$  соответствует изотопу  $Cl^{34m}$ , равное 32 мин. Основную активность облученных ДНА составляют короткоживущие изотопы  $C^{11}$ ,  $N^{13}$ ,  $O^{15}$ , которые полностью распадаются в течение часа.

*Таблица 16.* Примесный состав образцов ДНА, определенный по наведенной активности соответствующих радиоизотопов.

Элемент	Ядерная реакция	Аналитические радиоизотопы	Энергия основной линии, кэВ	T <sub>1/2</sub>
Cl	$\gamma, n$	Cl-34m	145,7	32 мин
Ti	$\gamma, p$	Sc-47	159,4	3,349 сут
Cr	$\gamma, n$	Cr-51	320,0	27,7 сут
	$\gamma, n$	Cr-49	152,9	42,3 мин
Fe	$\gamma, p$	Mn-56	846,6	2,579 ч
Ni	$\gamma, n$	Ni-57	1377,6	35,6 ч
Zr	$\gamma, n$	Zr-89	909,2	78,4 ч
Mo	$\gamma, n$	Mo-99	140,5;	66,02 ч
			739,7	
Sb	$\gamma, n$	Sb-122	564,1	2,68 сут
Sr	$\gamma, n$	Sr-87m	388,4	2,8 ч
Mn	$\gamma, n$	Mn-54	834,8	312 сут
U	$\gamma, n$	U-237	208,0	6,75 сут
Eu	$\gamma, n$	Eu-152m	841,6	9,3 ч

На гамма-спектрах некоторых образцов присутствует фотопик Na<sup>24</sup> (1368,6 кэВ), однако однозначно идентифицировать его нельзя, так как он может образоваться как по реакции Mg<sup>25</sup> ( $\gamma, p$ ) → Na<sup>24</sup>, так и по реакции Na<sup>23</sup> (n,  $\gamma$ ) → Na<sup>24</sup> за счет вторичных нейтронов, образующихся на ядрах элементов матрицы. Поэтому при проведении анализа образцов этот изотоп не принимали во внимание. Во всех гамма-спектрах облученных образцов присутствует фоновый фотопик природного радионуклида K<sup>40</sup> (1460 кэВ).

В образцах **I** и **II** имеются фотопики, идентификацию которых можно отнести к разным элементам. Так в образце **I** фотопик с энергией 165 кэВ может принадлежать Ba<sup>139</sup> (T<sub>1/2</sub> = 83,06 мин), образовавшемуся за счет вторичных нейтронов в матрице. Однако других изотопов Ba<sup>129m</sup>, Ba<sup>131</sup>, Ba<sup>133m</sup>, Ba<sup>135m</sup> [337], которые также должны были образоваться в результате этой реакции, в образце не найдено. В спектрах образцов **I** и **II** обнаружены фотопики с энергиями 555, 652, 749 и 1024 кэВ, соответственно, которые надежно можно отнести к Sr<sup>91m</sup>. Этот радионуклид может образоваться только по реакции деления или по реакции (n,  $\alpha$ ) из Zr<sup>94</sup>. Однако следов урана в этих образцах не обнаружено. Поэтому эти радионуклиды, для которых нельзя однозначно определить происхождение, не учитывались в расчете конечного примесного содержания.

Неожиданным результатом оказалось наличие достаточно большого количества Eu в образце IV<sub>A</sub> (Табл. 17), которое не было заявлено поставщиком и также не обнаруживалось ранее [96, 93].

Таблица 17. Состав и количество примесных элементов в образцах ДНА [94].

Элемент	Образцы ДНА, % масс.							
	I	II	III	IV <sub>A</sub>	IV <sub>B</sub>	IV <sub>B</sub> - COOH	IV <sub>B</sub> -H	IV <sub>B</sub> - Gly
<b>Cl</b>	0.10	0.03	0.56	0.08	0.09	0.07	0.05	2.20
<b>Ti</b>	1·10 <sup>-3</sup>	1·10 <sup>-3</sup>	0.02	7·10 <sup>-3</sup>	9·10 <sup>-3</sup>	0.01	6·10 <sup>-3</sup>	0.04
<b>Cr</b>	-	0.34	-	0.68	0.40	0.13	0.15	0.13
<b>Fe</b>	-	0.01	0.41	0.21	0.55	0.45	0.02	0.62
<b>Ni</b>	-	2·10 <sup>-3</sup>	-	0.01	0.01	5·10 <sup>-3</sup>	3·10 <sup>-3</sup>	3·10 <sup>-3</sup>
<b>Zr</b>	1·10 <sup>-3</sup>	-	2·10 <sup>-3</sup>	7·10 <sup>-4</sup>	2·10 <sup>-3</sup>	2·10 <sup>-3</sup>	2·10 <sup>-3</sup>	9·10 <sup>-4</sup>
<b>Mo</b>	-	-	-	2·10 <sup>-4</sup>	3·10 <sup>-3</sup>	4·10 <sup>-4</sup>	7·10 <sup>-4</sup>	2·10 <sup>-4</sup>
<b>Sb</b>	-	3·10 <sup>-3</sup>	-	6·10 <sup>-4</sup>	-	6·10 <sup>-4</sup>	-	-
<b>Sr</b>	4·10 <sup>-4</sup>	3·10 <sup>-4</sup>	7·10 <sup>-4</sup>	2·10 <sup>-4</sup>	-	-	2·10 <sup>-4</sup>	2·10 <sup>-4</sup>
<b>Mn</b>	-	0.03	-	-	-	-	-	-
<b>U</b>	-	-	-	-	3·10 <sup>-3</sup>	4·10 <sup>-3</sup>	-	-
<b>Eu</b>	-	-	-	0.03	-	-	-	-
<b>Σ</b>	0.10	0.41	0.99	1.01	1.05	0.66	0.22	2.99

Элемент Eu был идентифицирован сразу по нескольким фотопикам (Eu<sup>152m</sup> – 122, 344, 841, 963 кэВ, соответственно; Eu<sup>150a</sup> – 334 и 406.5 кэВ, соответственно) и при разном времени детектирования. Поэтому его присутствие в данном образце не вызывает сомнений. В другой партии этой же марки ДНА (образец IV<sub>B</sub>) достоверно идентифицируются следовые количества U<sup>238</sup> (фотопики 56.7 и 208.0 кэВ, соответственно), который также не было заявлен поставщиком, но ранее был обнаружен в других марках ДНА [93]. Возможно, примеси Eu и U содержались в «алмазной шихте» и связаны с использованием определенного вида взрывчатых веществ при синтезе ДНА. Другим потенциальным источником загрязнения может являться проведение

легирования ДНА редкоземельными и тяжелыми металлами в процессе детонации взрывчатых веществ. Полученные данные делают актуальными не только необходимость контроля примесей при выделении и очистке ДНА из «алмазной шихты», но и более тщательный выбор исходного взрывчатого материала для детонационного синтеза НА.

Наибольшее количество примесей в промышленных образцах ДНА имеет образец IV (до 1,05% масс.), где основными примесными элементами являются Cr, Fe, Ni и Cl, а наименьшее – образец I (0,1 % масс. – Cl, Ti, Zr, Sr). Примеси в образце III достигают 0,99% масс., причем основную долю составляют Fe, Cl и Ti. Образец II содержит примеси Cr, Cl, Fe и Mn до 0.41% масс. Содержание Cr в образцах II и IV, по-видимому, связано с использованием соединений хрома при окислительном выделении ДНА из алмазной шихты: при разложении аморфного и  $sp^2$  углерода с помощью  $CrO_3$  или  $K_2Cr_2O_7$  и  $H_2SO_4$  [338]. Также могут вносить примеси отдельные элементы оборудования из нержавеющей стали, применяемые для выделения ДНА из алмазной шихты, в состав которых железо и хром.

Наличие примесей Fe было установлено во всех образцах ДНА за исключением образца I. Так как технология получения ДНА предполагает использование закрытой металлической стальной взрывной камеры, то это неизбежно приводит к загрязнению получаемого продукта примесями элементов, входящих в состав конструкционных сплавов, и прежде всего, железа [87]. В этой связи представляет интерес отсутствие примеси Fe в образце I, что может быть вызвано двумя причинами. Первая – применение качественного сплава, использованного для конструкции детонационной камеры, вторая – применение высокоэффективной методики выделения и очистки ДНА. Последнее предположение согласуется и с минимальным содержанием других примесей в этом образце. Отметим, что технологии получения и очистки ДНА являются промышленным секретом, как правило, содержат ноу-хау и полностью не раскрываются в научных и патентных публикациях.

Другой постоянно присутствующей примесью во всех промышленных образцах ДНА является Ti (Табл. 17). Наибольшее его количество обнаружено в образце III (0,02% масс.), который, по-видимому, был получен путем химического модифицирования и последующего механического диспергирования из образца I. Известно, что образцы I и III представляют собой разные марки промышленного ДНА немецкой фирмы «PlasmaChem». При этом стоимость образца III существенно превышает стоимость образца I. Это может быть связано с попыткой производителя решить сложную проблему дезагрегации частиц ДНА. Наше предположение подтверждается данными работы [326], в которой описаны результаты исследования образцов ДНА I-IV методом ДСК. В образце III было обнаружено наличие «нанофазы» воды, подтверждающее дезагрегированность образца. При этом загрязнения Ti, вероятно, связаны с использованием в процессах выделения, очистки и дезагрегации ДНА ультразвукового

оборудования, где наконечник излучателя ультразвуковых волн, как правило, состоит из сплава титана [117]. Поэтому при всей важности решения проблемы дезагрегации частиц ДНА, особенно при использовании его в биомедицинских приложениях, необходимо учитывать и минимизировать возможные загрязняющие агенты.

Наряду с отличием свойств промышленных ДНА, получаемых по различным технологиям разными производителями, различие характеристик образцов (их физико-химическую неэквивалентность) можно наблюдать и в случае разных серий ДНА одной и той же марки (Табл. 17, образцы **IV<sub>A</sub>** и **IV<sub>B</sub>**) [94]. Наблюдаемые различия при условии полного соблюдения технологии получения и выделения ДНА, как правило, могут быть связаны с изменением конкретных условий проведения технологического процесса и/или различием исходного сырья. Из Табл. 17 следует, что образец **IV<sub>B</sub>** содержит в 2 раза больше примеси Fe по сравнению с образцом **IV<sub>A</sub>**, в 3,5 раза меньше Zr и на 50% меньше Cr. При этом, в отличие от образца **IV<sub>A</sub>**, он не содержит примесей Sb, Sr и Eu, зато в нем обнаружены следовые количества U ( $3 \cdot 10^{-3}$  % масс.). Отсюда можно предположить использование разного исходного сырья для производства образцов данных партий одной и той же марки ДНА.

С целью анализа изменения примесного состава ДНА в процессе химического модифицирования его поверхности был изучен примесный состав образца **IV<sub>B</sub>**. Поверхность карбоксилированного (**IV<sub>B</sub>-COOH**) и гидрированного (**IV<sub>B</sub>-H**) образцов ДНА имеет соответствующие функциональные группы для дальнейшего связывания с БАВ и ЛВ. Из данных, приведенных в Табл. 17, видно, что после окислительного модифицирования поверхности ДНА смесью кислот качественный состав примесей сохраняется с дополнительным появлением примеси Sb на уровне предела обнаружения. Вероятнее всего, примесь Sb содержалась в исходных реактивах. При этом уменьшается содержание Cr, Fe, Ni и Mo до 0,13, 0,45,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$  % масс., соответственно. Содержание остальных примесных элементов изменяется незначительно.

Восстановительное высокотемпературное модифицирование образца **IV<sub>B</sub>** в токе водорода приводит к снижению содержания практически всех примесей: Cr, Fe, Ni, Cl, Ti, полностью удаляется U. Возможно, это связано с образованием летучих соединений этих элементов, например, хлоридов и карбониллов.

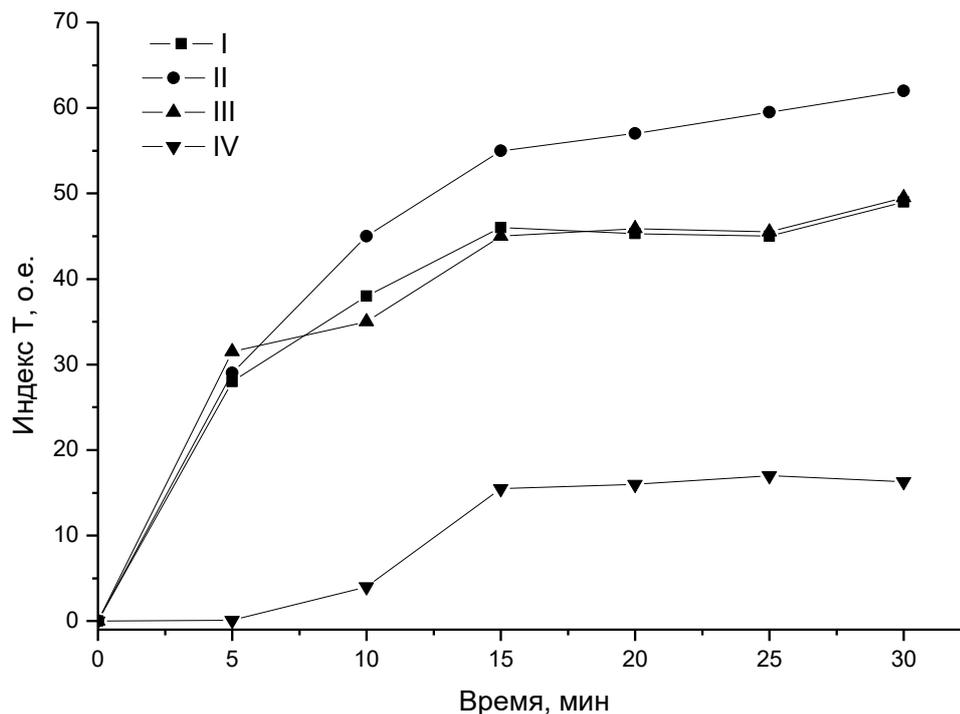
Полученный из гидрированного образца **IV<sub>B</sub>-H** конъюгат **IV<sub>B</sub>-Gly** должен соответствовать фармакопейным требованиям к чистоте фармацевтических субстанций. Так металлы Ni, Mo, Cr, присутствующие в образце конъюгата, относятся к группе металлов, представляющих наибольшую опасность. Хотя железо наименее опасно для человека, во многих экспериментах *in vitro* и *in vivo* оно может ингибировать протекающие взаимодействия и, тем самым, вносить существенную систематическую ошибку.

Из анализа примесного состава конъюгата **IV<sub>B</sub>**-Gly, представленного в Табл. 17, видно, что проведение реакций хлорирования поверхности ДНА и иммобилизации на ней глицина загрязняют конъюгат, в основном, такими элементами как Fe, Ti и Cl. При этом остальные примесные элементы не удаляются. Общее содержание металлических примесей в образце конъюгата доходит до 0,79 % масс. Значительные загрязнения хлором, который находится на поверхности ДНА в адсорбированном состоянии в виде аниона Cl<sup>-</sup>, объясняются использованием при отмывке конъюгата от реагентов 0,9% водного раствора NaCl. Примеси железа также могли попасть в образец при использовании железного шпателя для удаления порошка со стенок колбы после высушивания. В дальнейшем при получении конъюгата ДНА с глицином для минимизации загрязнений необходимо рекомендовать использование только пластиковых шпателей.

Таким образом, для изучения примесей в образцах ДНА впервые применен метод гамма-активационного анализа. Выявлено существенное различие в примесном составе коммерческих образцов ДНА разных марок и разных партий одной марки. Это позволяет сделать вывод, что для применения ДНА в медицине как носителя БАВ и ЛВ необходима его стандартизация.

### 3.1.1. Биологическая активность промышленных ДНА

В работе исследовали влияние разных марок промышленных ДНА на динамику изменения индекса токсичности на модели люминесцентных бактерий (Рис. 24). Данные эксперимента показывают, что интенсивность свечения бактерий снижается при воздействии на них образцов всех марок ДНА с концентрацией 0,1 мг/мл. Наиболее токсичным для люминесцентных бактерий оказался образец **II**, наименее – **IV**. Образцы **I** и **III** имеют схожую динамику изменения индекса токсичности, причем произведены одним производителем. Так как эти образцы отличаются своей химией поверхности и агрегативной устойчивостью, то можно сделать вывод, что эти параметры не влияют на изменение индекса токсичности люминесцентных бактерий. При этом образцы содержат разное количество обнаруженных примесей. В образце **I** содержится 0,1 % масс. примесных элементов, в образце **III** – 1% масс., причем в последнем случае основную примесь составляют Cl (0,56 % масс.) и Fe (0,41 % масс.), ионы которого достаточно активно ингибируют люминесценцию бактерий [308]. Поэтому, вероятно, изменение индекса токсичности люминесцентных бактерий под действием образцов ДНА определяет какой-то иной, неочевидный параметр, влияющий на процесс свечения этих бактерий.



**Рисунок 24.** Изменение индекса токсичности Т во времени при инкубации образцов ДНА (I, II, III, IV) с люминесцентными бактериями в течение 30 мин.

На основании этих данных, а также доступности в промышленном масштабе ДНА под шифром IV (марка УДА-ТАН), который производится в Санкт-Петербурге, дальнейшая работа по химическому модифицированию ДНА и прививке на его поверхность ЛВ и БАВ была выполнена на образцах IV.

### 3.2. Унифицирование физико-химических свойств ДНА

Для применения систем доставки ЛВ в фармации и медицине обязательным условием является стандартизация и унификация используемых наносителей. С этой целью промышленные ДНА необходимо унифицировать по единообразным параметрам и свойствам, прежде всего, по химическому составу и поверхностному функциональному составу. Стандартизация унифицированных ДНА должна оформляться в виде нормативной документации: патентов, технологических регламентов и фармакопейных статей (ФС).

### 3.2.1. Очистка ДНА

#### 3.2.1.1. Очистка от примесей серы и нитрат-аниона

Выделение ДНА из алмазной шихты проводят с помощью окислительной обработки, которая может приводить к различным загрязнениям ДНА. Методом ИКС в образце УДА-ТАН нами было обнаружено наличие нитрат-аниона, по-видимому, оставшегося после выделения ДНА из алмазной шихты азотной кислотой под давлением [89]. При гидрировании же образцов марки УДА-ТАН другой партии был замечен резкий запах сероводорода в потоке выходящих газов. Проведенный элементный анализ этого образца ДНА по количеству выделяющегося  $\text{SO}_2$  показал наличие в образце больших количеств серы (0,55% масс.).

Поэтому было решено провести очистку ДНА в кислотной и щелочной среде, варьируя концентрацию реагентов, температуру и время обработки [339]. В Табл. 18 приведены результаты обработки ДНА щелочью и остаточное содержание серы в образце.

Таблица 18. Результаты щелочной очистки от сернистых соединений ДНА марки УДА-ТАН.

	1 М NaOH			0,1 М NaOH								0,01 М NaOH						
t, ч	2	3	4	1	2	3	4	1	2	4	6	0,5	1	2	4	2	3	4
T, °C	23			23				75				100				23		
c (S), ppm	251	144	198	1820	321	255	117	624	316	261	291	637	454	278	305	608	162	141

После щелочной очистки также удаляются нитрат-анионы, что подтверждается отсутствием интенсивной полосы поглощения  $\text{NO}_3^-$  при  $1385 \text{ см}^{-1}$  в ИК-спектрах образцов (Рис. 25).

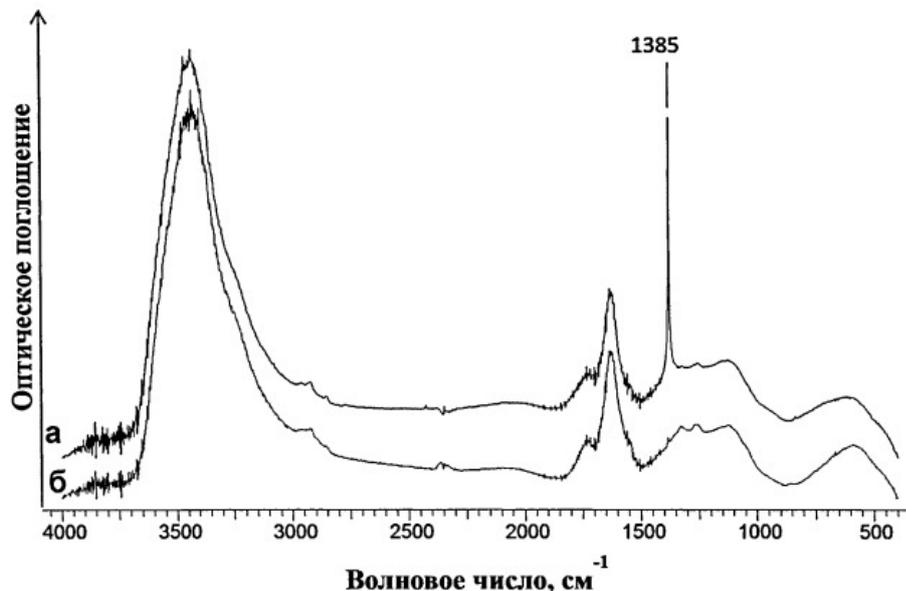


Рисунок 25. ИК-спектры поглощения ДНА: а) до очистки, б) после очистки.

Кипячение ДНА в среде 0,1 М HCl в течение 12 ч позволило снизить содержание серы до 850 ppm. Кипячение в дистиллированной воде в течение 6 ч снизило содержание серы до 1220 ppm [339].

**Вывод:** разработанный способ доочистки поверхности ДНА от азот- и серосодержащих примесей, заключающийся в обработке ДНА водным раствором NaOH с концентрацией 0,01–0,1 М при комнатной температуре, позволяет полностью удалить нитрат-ионы и снизить содержание серы до 0,01 % масс.

### 3.2.1.2. Очистка ДНА от примесей железа

В различных фармако-токсикологических и биологических экспериментах примеси металлов могут существенно влиять на их результаты. Наиболее часто встречающейся металлической примесью в образцах ДНА является железо, которое может влиять, в частности, на субклеточные органеллы. Поэтому разработка способа очистки от железа является актуальной задачей при исследовании влияния функционализированной поверхности ДНА на биообъекты, включая клетки и клеточные органеллы, например, митохондрии [340]. Для снижения содержания примеси Fe в образцах ДНА была применена их очистка в различных кислотах. Результаты этой очистки представлены в Табл. 19.

В результате исследования лучшие результаты показала очистка ДНА в соляной кислоте, которая позволила снизить содержание железа в образце с 0,15 % масс. до  $1 \cdot 10^{-3}$  % [340].

Таблица 19. Результаты очистки ДНА после обработки различными кислотами по данным метода ИСП-МС.

Без очистки	Условия очистки/ С (Fe), ppm		
	HNO <sub>3</sub> (конц.), кип., 12 ч	HCl <sub>конц.</sub> , кип., 12 ч	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (конц.), 100°C, 12 ч
1488	247	11	436

**Вывод:** разработан способ очистки ДНА, позволяющий, используя последовательно обработку ДНА соляной кислотой и щелочью, удалить примеси железа, серы и нитрат-анионов до уровня требований ГФ РФ XIII изд.

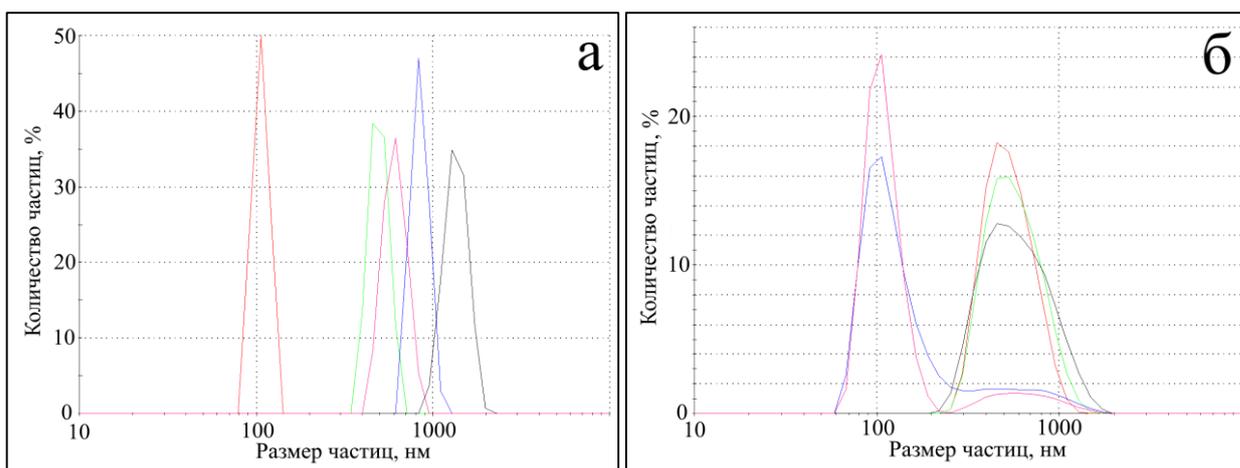
### 3.2.2. Дезагрегация ДНА

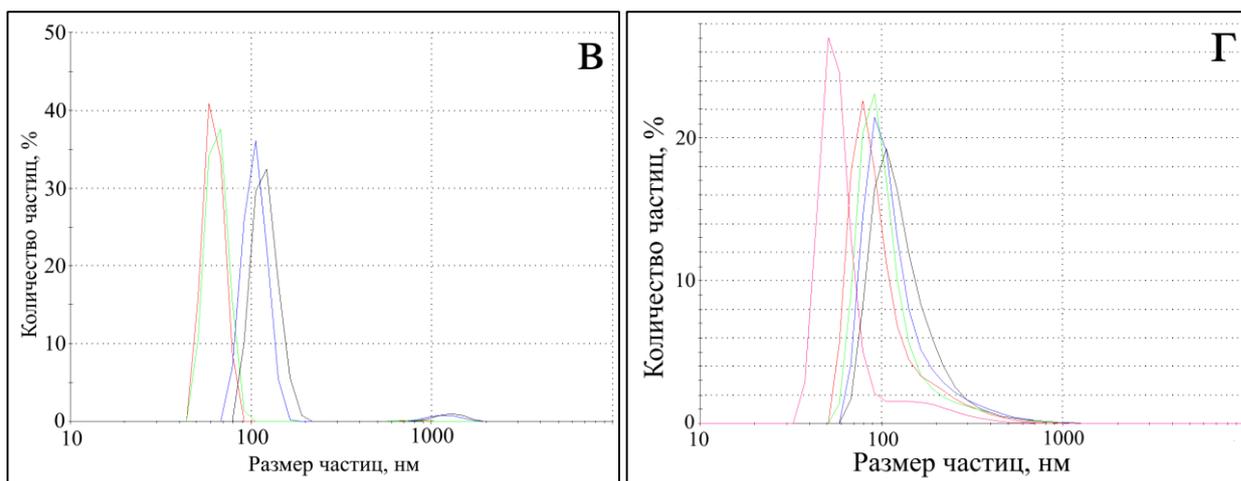
Фармацевтическое применение ДНА практически всегда рассматривает их в виде стабильных гидрозолей. Поэтому подбор оптимальных условий образования гидрозолей ДНА разных марок, оценка размеров частиц, а также их физическая устойчивость является актуальной задачей. Известно, что на способность ДНА образовывать коллоидные растворы влияет не только

состояние поверхности, но и размер частиц. В связи с этим в работе была поставлена задача определить условия, при которых ДНА образовывал бы стабильные суспензии. Из литературы известно, что повышение мощности и времени УЗ-обработки нелинейно влияет на уменьшение размеров агрегатов ДНА. Часто продолжительное УЗ-воздействие на суспензии ДНА в начале приводит к уменьшению размеров агрегатов, а затем – к их увеличению. Поэтому поиск параметров УЗ-обработки для получения гидрозолей ДНА с размерами агрегатов менее 100 нм является важной прикладной задачей.

На 1 этапе исследования дезагрегации частиц ДНА было решено провести исследование влияние мощности УЗ-обработки. Для этого использовались УЗ-ванны мощностью 50 и 300 Вт. Были приготовлены 2%-ные водные суспензии ДНА марки УДА-ТАН, которые подвергались УЗ-обработке с последующей регистрацией спектров ДРС [341].

Из Рис. 26,а видно, что агрегаты ДНА без какой-либо обработки кроме интенсивного перемешивания имеют, в основном, микронные размеры. При этом нужно учитывать, что интенсивность сигнала пропорциональна радиусу частиц в шестой степени  $I \sim r^6$ . Поэтому, если в порошке ДНА имеется 1 частица с радиусом 1 мкм, то вклад в интенсивность от нее будет таким же, как от  $100^6$  частиц радиусом 10 нм. Это означает, что в ДНА могут быть агрегаты меньших размеров, однако данный метод не позволяет их увидеть. В связи с этим на Рис. 26,а один график соответствует размеру агрегатов ДНА около 100 нм, что можно отнести к преобладанию частиц этого размера в измеряемом объеме в данный момент времени (микронные частицы не измерялись).



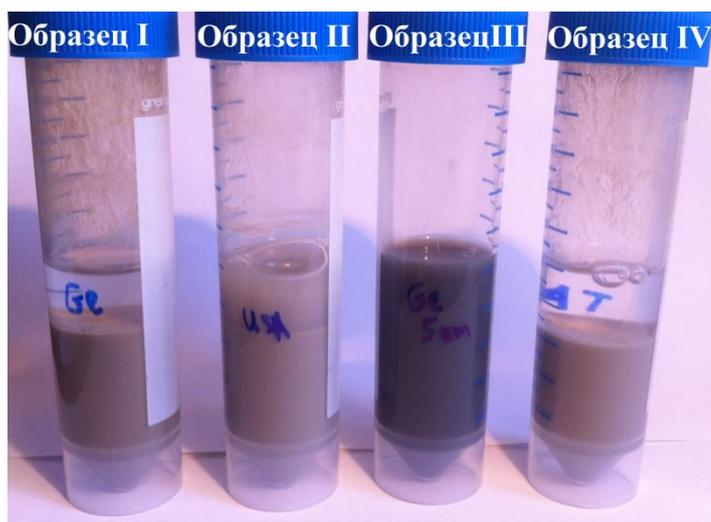


**Рисунок 26.** Размер частиц ДНА (марка УДА-ТАН) до и после ультразвуковой обработки, измеренный последовательно 5 раз методом ДРС: а) – исходная суспензия ДНА; б) суспензия ДНА после УЗ-обработки, УЗ-ванна 50 Вт, 5 мин; в) суспензия ДНА после УЗ-обработки, УЗ-ванна 300 Вт, 5 мин; г) суспензия ДНА после УЗ-обработки, УЗ-ванна 300 Вт, 5 циклов по 1 мин.

Применение УЗ-обработки на ванне с мощностью 50 Вт приводит к появлению на спектре ДРС устойчивого пика агрегатов ДНА размером 100 нм, однако полностью микронные агрегаты не разбиваются (Рис. 26,б). При повышении мощности УЗ-обработки до 300 Вт агрегаты ДНА размером 100 нм также преобладают, но практически отсутствуют микронные агрегаты. При применении циклической УЗ-обработки ДНА отчетливо наблюдается тенденция к уменьшению размерам агрегатов ДНА, размеры которых находятся в области от 50 до нескольких сотен нм .

Следовательно, можно сделать **вывод**, что увеличение мощности УЗ-обработки суспензий ДНА с варьированием времени озвучивания приводит к значительному уменьшению размеров агрегатов, однако не позволяет приблизиться к получению отдельных первичных частиц ДНА размером 5 нм.

В дальнейшем было найдено, что использование после УЗ-обработки суспензий ДНА стадии центрифугирования позволяет убрать большие агрегаты и заметно снизить размеры агрегатов в суспензии. Таким способом проводили измерение и сравнение размеров агрегатов промышленных образцов ДНА разных марок. Каждая 2 %-ная суспензия ДНА была обработана девятью циклами, каждый из которых состоял из «УЗ-обработки (2 мин) и ЦФ (5 мин, 6000 об/мин) (Рис. 26) [342]. После чего регистрировались спектры ДРС для всех приготовленных суспензий промышленных образцов ДНА разных марок.



**Рисунок 27.** Суспензии образцов ДНА I-IV после 9 циклов обработки (УЗО+ЦФ).

Следует отметить, что в отличие от остальных образцов ДНА образец III уже после третьего такого цикла образовал концентрированный стабильный гидрозоль. Это хорошо видно на Рис. 27, где представлены фотографии суспензий образцов ДНА.

После последнего цикла полученные гидрозоли исследовались методом ДРС: определяли  $\zeta$ -потенциалы частиц ДНА в получившихся гидрозолях, а также преобладающие в них размеры агрегатов. На основании этих измерений были получены характеристики гидрозолей, которые сведены в Табл. 20.

*Таблица 20.* Характеристики гидрозолей исходных образцов ДНА после 9 циклов обработки (УЗО+ЦФ) [326].

Образец ДНА	$\zeta$ -потенциал, мВ	Средний размер частиц, нм
<b>I</b>	$- 4,2 \pm 3,0$	600 (25%)
<b>II</b>	$- 10,6 \pm 4,5$	550 (15%)
<b>III</b>	$- 41,6 \pm 10,5$	50 (20%)
<b>IV</b>	$+ 33,8 \pm 4,5$	50 (25%)

Из представленных в Табл. 20 параметров следует, что в полученных гидрозолях ДНА агрегаты значительно различаются по размеру. Причем в гидрозолях образцов III и IV агрегаты достаточно мелкие, в то время как в гидрозолях I и II агрегаты на порядок крупнее. Также из Табл. 20 видно, что наибольшие абсолютные значения  $\zeta$ -потенциалов имеют гидрозоли образцов III и IV. Эти образцы ДНА способны образовывать стабильные суспензии при данной обработке. По-видимому, для гидрозолей образцов I и II данная методика обработки не подходит. Необходимо отметить, что в последующих экспериментах изучались только образцы I, II и IV,

так как гидрозоль образца **III** не требовал дополнительных действий для повышения его физической стабильности и был оставлен для определения времени стабильности.

На примере исходных образцов **I**, **II** и **IV** было проведено сравнение двух экспериментальных методик для подбора оптимальных условий получения стабильных гидрозолей каждого образца ДНА. Первая заключалась в пятикратной обработке суспензий только УЗ в течение 50 с. По второй методике суспензии ДНА подвергались 5-ти кратной обработке циклами «УЗО (50 с) и ЦФ (6000 об/мин, 5 мин)». В табл. 21 приведены значения  $\zeta$ -потенциалов и показаны преобладающие размеры агрегатов в полученных суспензиях.

При сравнении значений  $\zeta$ -потенциалов видно (Табл. 21), что для образца **IV** данные методики не подходят. Напротив, для образцов **II** и **I**, снижение времени УЗ обработки с 2 мин до 50 с приводит к увеличению  $\zeta$ -потенциала, следовательно, и к потенциальной способности образовывать устойчивые суспензии. При этом видно, что в случае образца **I** применение только УЗО позволило уменьшить размеры агрегатов НА в 2 раза, тогда как в случае образца **II** - в 8 раз. Использование комплексной обработки «УЗО+ЦФ» не позволяет эффективно разбивать агрегаты в суспензиях образцов **I** и **II**, тогда как в суспензии образца **IV** были получены агрегаты размером 44 нм [326].

Таблица 21. Сравнение  $\zeta$ -потенциалов (мВ) частиц ДНА после двух способов обработки.

Образец	УЗО (50 с)		УЗО (50 с)+ЦФ	
	$\zeta$ -потенциал, мВ	Максимум распределения при размере, нм	$\zeta$ -потенциал, мВ	Максимум распределения при размере, нм
<b>I</b>	$-11,9 \pm 2$	300 нм (22%)	$-12,1 \pm 2,4$	500 нм (17%)
<b>II</b>	$-27 \pm 2$	68 нм (24%)	$-28 \pm 2,5$	200 нм (22%) 700 нм (<5%)
<b>IV</b>	$+10 \pm 2$	800 нм (20%)	$+4,18 \pm 3$	44 нм (30%)

### 3.3. Характеристики модифицированных ДНА

#### 3.3.1. Гидрированный ДНА

Согласно имеющимся в литературе данным высокотемпературная обработка водородом представляет собой удобный и распространенный способ обработки поверхности ДНА [87]. При этом происходит деструкция одних кислородсодержащих групп (например,  $-\text{COOH}$ ) и восстановление других (например,  $>\text{C}=\text{O}$  до  $>\text{CH}-\text{OH}$  или  $>\text{CH}_2$ ) [78]. Такую обработку НА обычно проводят в течение 5 ч. С целью выявления перспективности использования газофазной

обработки ДНА было изучено влияние времени гидрирования на химическое состояние поверхности ДНА. Были исследованы образцы ДНА марки УДА-ТАН из разных партий – ДНА-I и ДНА-II.

На Рис. 28 приведены ИК-спектры поглощения исходного и гидрированного в течение 2-6 ч образцов ДНА-I (навеска 50-70 мг).

Анализ ИК-спектров образцов показал, что при гидрировании ДНА-I наблюдается увеличение интенсивности полосы при  $2928\text{ см}^{-1}$  и смещение полосы  $2855\text{ см}^{-1}$  до  $2884\text{ см}^{-1}$ , что говорит об увеличении на поверхности количества связей С–Н и качественном изменении функциональной оболочки. Также в спектрах гидрированных образцов, в отличие от исходного ДНА-I, отсутствует “плечо” в области  $3400\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ , характерное для аминогрупп, что позволяет говорить об их удалении. Исчезает полоса поглощения с максимумами при  $1730\text{ см}^{-1}$  и появляется полоса при  $1699\text{ см}^{-1}$ . В то же время, существенного изменения в интенсивностях полос поглощения при  $3436$  и  $1636\text{ см}^{-1}$ , соответственно, не происходит, что свидетельствует об устойчивости поверхностных –ОН-групп в условиях данной восстановительной обработки, а также о наличии в образцах сорбированной воды. Также следует отметить исчезновение полосы поглощения при  $1385\text{ см}^{-1}$ , относящейся к нитрат-иону, который полностью уходит с поверхности ДНА-I уже после 2 ч обработки. При дальнейшем гидрировании заметных изменений в ИК-спектрах образцов не наблюдается. Следовательно, можно сделать **вывод**, что поверхность образцов ДНА-I в использованной навеске восстанавливается уже через 2 ч обработки и не претерпевает заметных изменений при увеличении времени реакции. Изучение образцов с помощью метода РФЭС (Табл. 22) показало, что в результате гидрирования происходит заметное уменьшение содержания кислорода в ДНА-I [343].

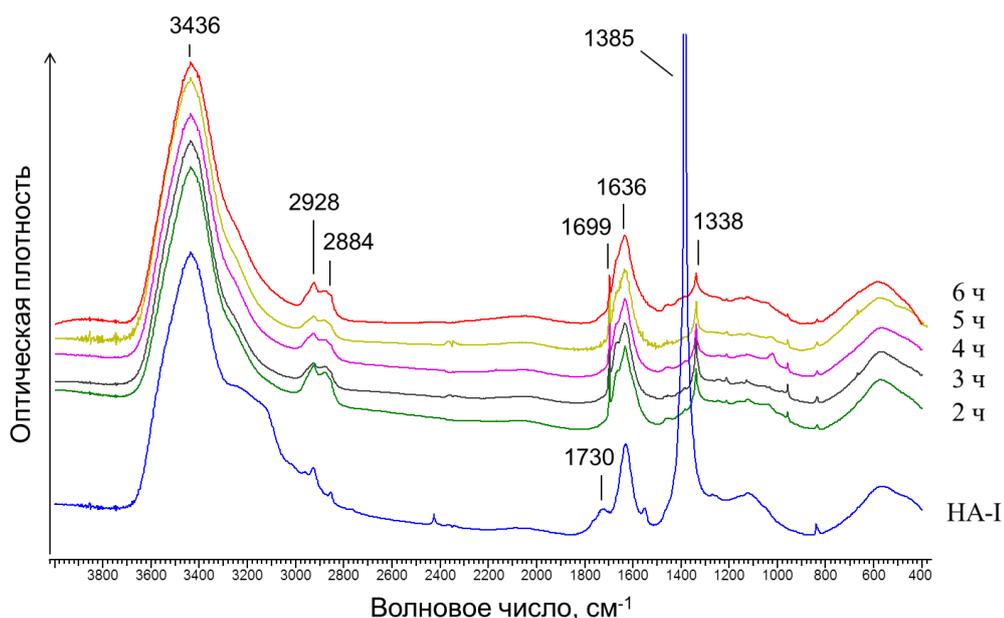


Рисунок 28. ИК-спектры поглощения образцов исходного и гидрированных ДНА.

Таблица 22. Поверхностный состав поверхности ДНА-I ( по данным РФЭС)

Образец	Элементный состав, ат. % (нормировано на С, О, N)		
	С	О	N
ДНА -I исходный	89,4	8,7	1,9
ДНА-I гидрированный	92,5	5,5	2,0

На Рис. 29 приведены ИК-спектры поглощения исходных и гидрированных в тех же условиях образцов ДНА-II [343].

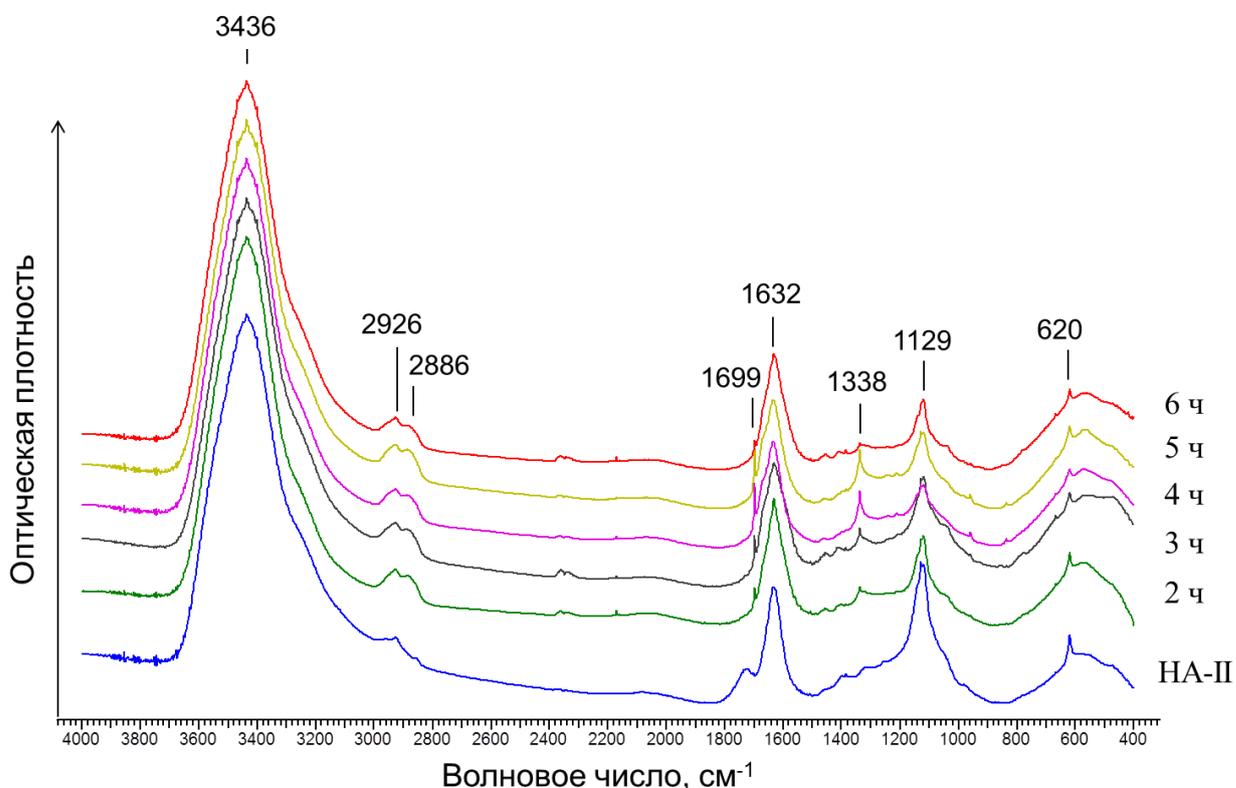


Рисунок 29. ИК-спектры поглощения образцов исходного и гидрированных ДНА-II.

В диапазоне  $3600-1400\text{ см}^{-1}$  изменения в ИК-спектрах гидрированных образцах ДНА-II идентичны изменениям, наблюдаемым для спектров образцов ДНА-I (Рис. 29), за исключением полосы поглощения аминогрупп при  $3400-3000\text{ см}^{-1}$ . В ИК-спектре образца ДНА-II отсутствует узкая интенсивная полоса поглощения при  $1385\text{ см}^{-1}$ , характерная для ДНА-I, и полоса при  $1129\text{ см}^{-1}$ , которая может быть обусловлена колебаниями серосодержащих групп. При гидрировании ДНА-II в течение 2 ч наблюдается снижение интенсивности поглощения в данной области спектра в 1,5-2 раза и при дальнейшем гидрировании заметного уменьшения интенсивности не происходит. Такие же изменения наблюдаются и со слабой полосой при  $620\text{ см}^{-1}$ . Полученные

данные позволяют предполагать устойчивость серосодержащих групп на поверхности ДНА, даже при таких высоких температурах, как 800°C.

Разный химический состав ДНА обусловлен, в основном, функциональным составом их поверхности. Для унифицирования нами была использована высокотемпературная обработка образцов ДНА водородом (800 °С, 5 ч), которая привела к унифицированию функционального состава поверхности всех изучаемых образцов. В ходе восстановительной обработки происходит образование новых гидридных групп на поверхности ДНА, преимущественно за счет восстановления и деструкции большинства кислородсодержащих групп, что показано методами ИКС (Рис. 30) [326].

Из ИК-спектров, представленных ДНА (Рис. 30), видно, что после гидрирования образцы ДНА имеют одинаковый поверхностный состав, обусловленный унифицированием их поверхности до –Н и –ОН-групп. При восстановлении ДНА в ИК спектрах всех образцов исчезают полосы поглощения с максимумами при 1730 и 1793 см<sup>-1</sup>, соответственно. Наряду с этим увеличиваются интенсивности полос в области валентных колебаний связей С–Н. В то же время интенсивности полос поглощения в областях 3700-3000 и 1630 см<sup>-1</sup>, соответственно, не меняются, что подтверждает устойчивость поверхностных –ОН-групп в условиях данной восстановительной обработки. В области валентных колебаний гидридных групп наибольшую интенсивность имеют полосы с максимумами при 2881 и 2925 см<sup>-1</sup>, соответственно. Эти полосы, согласно [344], обусловлены колебаниями связей С–Н на гранях НА соответственно {100} и {111}. Также стоит отметить исчезновение полосы поглощения при 1338 см<sup>-1</sup> в образце IV, которая соответствует иону NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

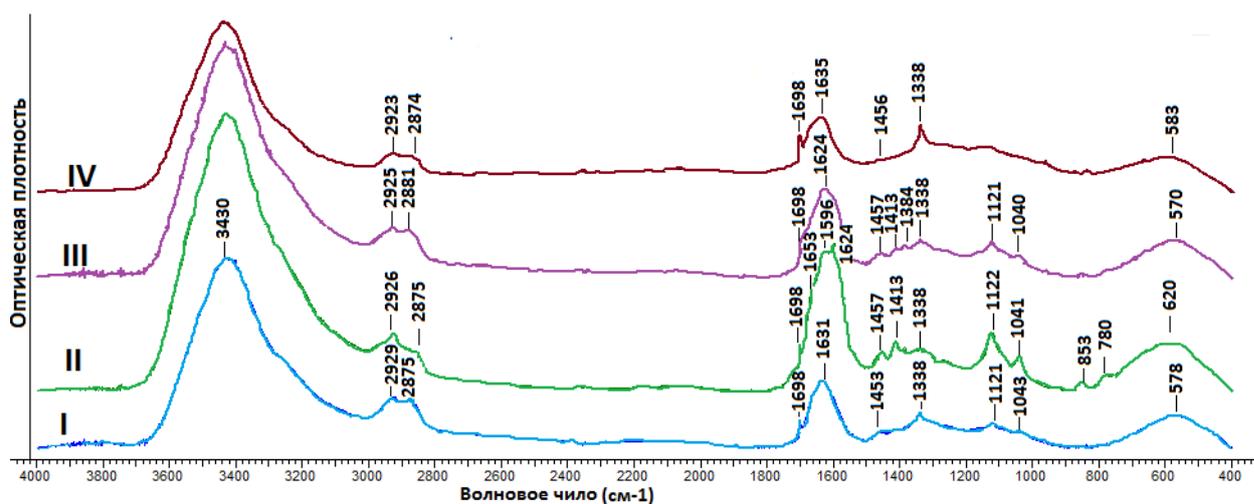


Рисунок 30. ИК-спектры гидрированных образцов ДНА.

Таким образом, использование восстановительной обработки может быть предложено в качестве метода унифицирования и стандартизации поверхности ДНА. Более того, анализ ИК-спектров гидрированных образцов ДНА показывает практически полное унифицирование всех

образцов, что подтверждает дополнительное изучение параметров гидрозолей восстановленных ДНА и поведением в реакциях ковалентной прививки органических веществ.

Также в работе были получены гидрозоли гидрированных образцов ДНА путем 5-ти кратной обработки циклами «УЗО и ЦФ». Найденные значения  $\zeta$ -потенциалов и преобладающие размеры агрегатов в гидрозолях восстановленных образцов ДНА приведены в Табл. 23. Установлено, что гидрированные ДНА образуют стабильные суспензии с одинаковым размером агрегатов (порядка 50 нм), а величина  $\zeta$ -потенциала частиц ДНА в гидрозолях находится в интервале 40 - 45 мВ [326].

Таблица 23.  $\zeta$ - потенциалы суспензий восстановленных ДНА (5 УЗО).

Образец	$\zeta$ -потенциал, мВ	Средний размер частиц, нм
<b>I</b>	+ 45 ± 3	50 (25%)
<b>II</b>	+ 40 ± 4	50 (21%)
<b>III</b>	+ 41 ± 5	45 (23%)
<b>IV</b>	+ 45 ± 12	70 (21%)

**Вывод:** Разработан способ унификации и стандартизации образцов ДНА путем высокотемпературного гидрирования водородом их поверхности. В результате его применения все образцы ДНА имеют одинаковый элементный состав, идентичные ИК-спектры, образуют стабильные гидрозоли с одинаковыми размером агрегатов 50 нм и величиной  $\zeta$ -потенциала +40-45 мВ.

### 3.3.2. Окисленный ДНА

Данные по влиянию восстановительного и окислительного модифицирования на изменение удельной поверхности образцов ДНА приведены в Табл. 24, из которой следует, что модифицирование приводит к увеличению поверхности ДНА, причем этот эффект сильнее выражен при обработке воздухом.

Увеличение поверхности образцов ДНА в результате окислительного модифицирования может быть связано с уменьшением электростатического взаимодействия между частицами, что приводит к уменьшению размеров агрегатов ДНА. Одновременно с этим могут раскрываться захлопнутые поры в агрегатах. Последнее может быть обусловлено тем, что при обработке выделяется много летучих продуктов, которые приводят к разрушению части агрегатов.

Таблица 24. Влияние модифицирования ДНА газами на площадь удельной поверхности  $S_{уд}$ .

Исследуемый образец ДНА, условия реакции	Удельная поверхность $S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г
УДА-СТП	240 ± 1
УДА-СТП (Н <sub>2</sub> , 800°С)	272 ± 5
УДА-СТП (О <sub>2</sub> , 400°С)	331 ± 10

По данным производителя на поверхности исходных ДНА содержались следующие функциональные группы:  $\equiv\text{C}-\text{H}$ ,  $=\text{CH}_2$ ,  $\equiv\text{C}-\text{O}-\text{C}\equiv$ ,  $=\text{C}=\text{O}$ ,  $\equiv\text{C}-\text{CHO}$ ,  $\equiv\text{C}-\text{OH}$ ,  $\equiv\text{C}-\text{COOH}$ ,  $\equiv\text{C}-\text{CH}_3$ ,  $\equiv\text{C}-\text{OH}$ ,  $\equiv\text{C}-\text{NO}_2$ ,  $\equiv\text{C}-\text{O}-\text{NO}_2$  и др. Эти группы и обуславливают элементный состав исходных ДНА. При их термообработке происходят изменения поверхностных функциональных групп наноалмазных частиц вследствие разложения, обмена, восстановления и др. реакций. В работе было проверено влияние условий обработки ДНА на изменение их состава [345]. Полученные данные для исходных и некоторых модифицированных воздухом и водородом ДНА представлены в Табл. 25 [346].

Таблица 25. Влияние модифицирования газами на С-, Н-, N-состав ДНА.

Условия модифицирования	Содержание С, Н, N, масс. %			
	Углерод	Азот	Водород	Кислород + несгораемый остаток*
Исходный ДНА	88,41	3,18	0,20	8,21
Воздух, 400°С	87,82	2,86	0,13	9,19
Водород, 800°С	91,59	2,41	0,53	5,47

\*) Рассчитано по разности. Так как содержание несгораемого остатка в навесках было постоянным (~1 масс. %), то цифры в этой колонке характеризуют именно изменение содержания кислорода.

Из данных, представленных в Табл. 25, следует, что окислительная и восстановительная обработка ДНА приводит к изменениям его химического состава, прежде всего, функционального покрова.

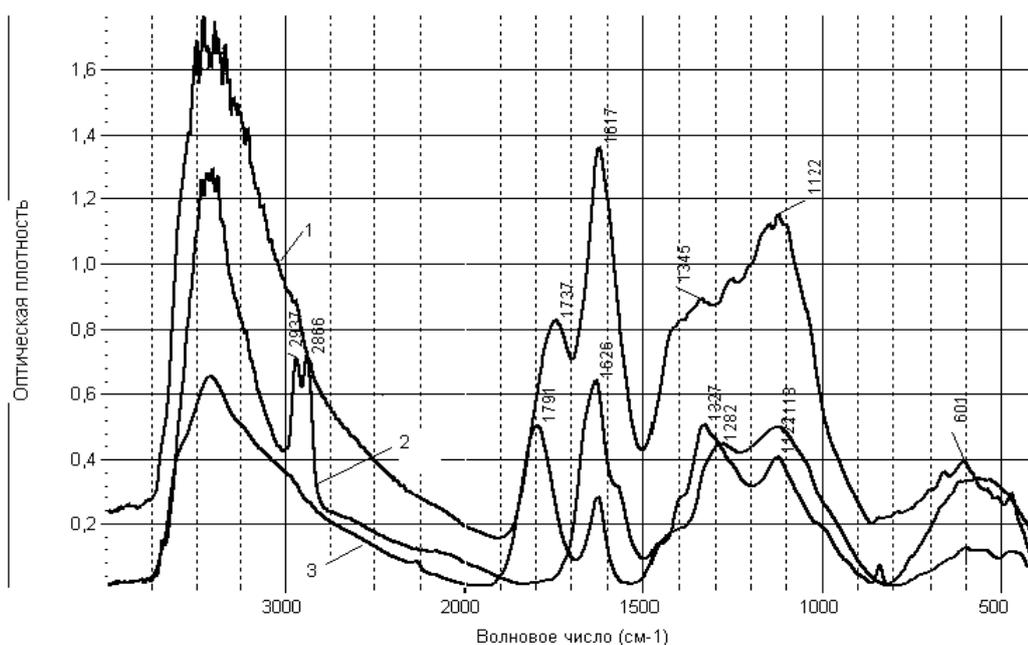
Высокое содержание кислорода в исходных и окисленных воздухом ДНА согласуется с величиной отношения  $S_{пов.}/S_{общ.}$  и количеством возможных функциональных групп на поверхности частиц. Модифицирование воздухом доокислило исходные углеводородные, альдегидные и др. водородсодержащие группы (например, до ангидридоподобных  $\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{C}(\text{O})$  групп), поэтому и снижено содержание водорода в составе модифицированных воздухом ДНА.

Понижение содержания кислорода и повышение водорода в ДНА после модифицирования водородом, вероятно, связано с восстановлением поверхностных карбонильных групп до углеводородных и гидроксильных.

По-видимому, азот находится в ДНА как в виде азотсодержащих функциональных групп, так и входит в состав примесных центров кристаллического алмазного ядра (как и в алмазах других типов) [346]. И именно азот функциональных групп ДНА удаляется при газофазной обработке, а в ядре остается. Этот результат согласуется с известными литературными данными [78]. Как следует из полученных в работе данных, такая форма присутствия азота в ДНА является преимущественной.

Было изучено влияние газофазной обработки в различных средах на изменение химического состояния поверхности ДНА. Для изучения природы функциональных групп на поверхности ДНА использовали методы ИК- и КР-спектроскопии.

ИК - спектры поглощения ДНА марки УДА-СТП представлены на Рис. 31, а отнесение полос поглощения к определенным группам представлено в Табл. 26.



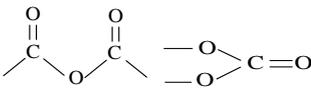
**Рисунок 31.** ИК спектры поглощения образцов ДНА марки УДА-СТП: 1 – исходный ДНА; 2 – ДНА, модифицированный водородом при 800 °С, 5 ч; 3 – ДНА, модифицированный воздухом при 400 °С, 5 ч.

В спектре поглощения исходного ДНА (спектр 1) присутствует интенсивная полоса связанных водородными связями поверхностных гидроксильных групп и адсорбированной воды с широким максимумом при 3405  $\text{см}^{-1}$ . В области валентных колебаний связей С-Н (2800-3000  $\text{см}^{-1}$ ) наблюдаются малоинтенсивные полосы. Полоса 1737  $\text{см}^{-1}$  обусловлена присутствием на поверхности

карбонильных групп ( $>C=O$ ). При  $1617\text{ см}^{-1}$  наблюдаются деформационные колебания гидроксильных групп как на поверхности ДНА, так и в воде, адсорбированной на ДНА. Широкая полоса  $1345\text{--}1122\text{ см}^{-1}$  соответствует колебанию алмазной решетки. После обработки воздухом (спектр 3) полоса  $1737\text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебанию карбонильных групп, значительно смещается в сторону больших волновых чисел ( $1791\text{ см}^{-1}$ ), что свидетельствует об образовании при  $400\text{ }^\circ\text{C}$  мостиковых С-О-С связей, соседствующих с карбонильными группами [346]. После модифицирования водородом в ИК-спектре (спектр 2) полностью исчезает полоса поглощения карбонильных групп, но появляются интенсивные полосы поглощения  $2941$  и  $2877\text{ см}^{-1}$ , соответственно, указывающие на образование новых С-Н связей при  $sp^3$ -гибридизованном атоме углерода.

Изменение функционального покрова ДНА, происходящее при их окислительно-восстановительной обработке, отражено в Табл. 26 [346].

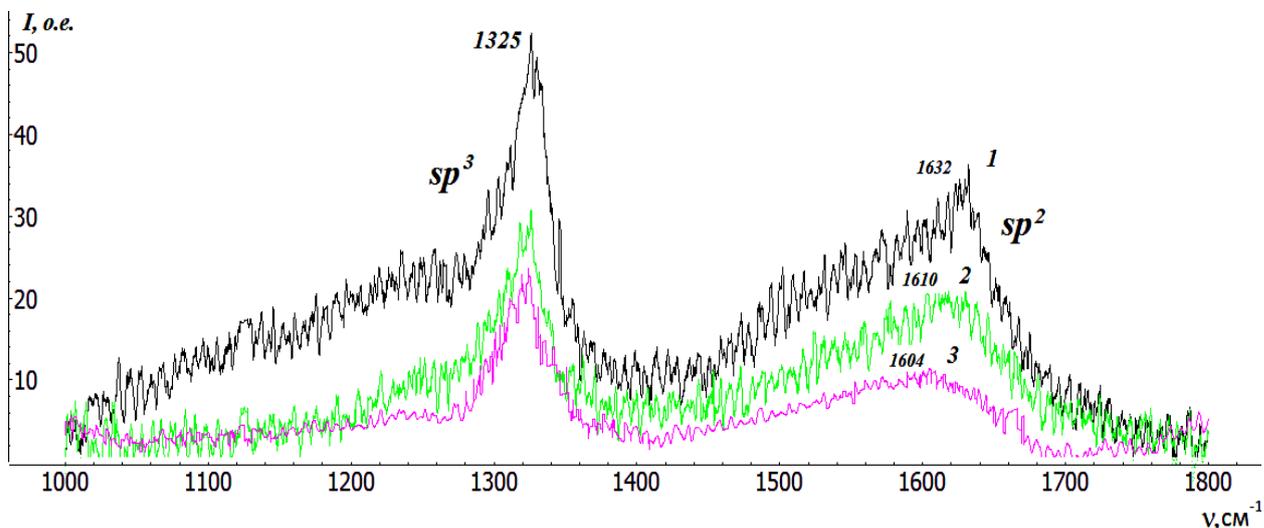
Таблица 26. Отнесение полос в ИК- спектрах поглощения ДНА.

Волновое число, $\text{см}^{-1}$	Группы	Исходный ДНА	ДНА после обработки	
			воздухом	водородом
1617	Гидроксильные ( $-OH$ )	есть		
1626			есть	есть
1737	Карбонильные ( $>C=O$ )	есть		
1791	Мостиковые С-О-С, типа 		есть	
2866, 2937	$-H$ при $sp^3$ -атоме углерода	оч. слабая	оч. слабая	есть
3400	Адсорбированная вода, $-OH$	есть	есть	есть
3680	Изолированные $-OH$			есть

Спектры КР для этих же образцов ДНА марки УДА-СТП представлены на Рис. 32.

Основная полоса КРС алмаза обычно проявляется в виде характерной узкой линии на частоте  $1330\text{ см}^{-1}$  [347]. В случае всех исследованных нами образцов ДНА полоса, соответствующая  $sp^3$ -углероду алмазной решетки, проявилась при одной и той же частоте –  $1325$

см<sup>-1</sup>. Небольшое смещение в низкочастотную область и уширение полосы обусловлено, согласно работе [348], наноразмером алмазных частиц.

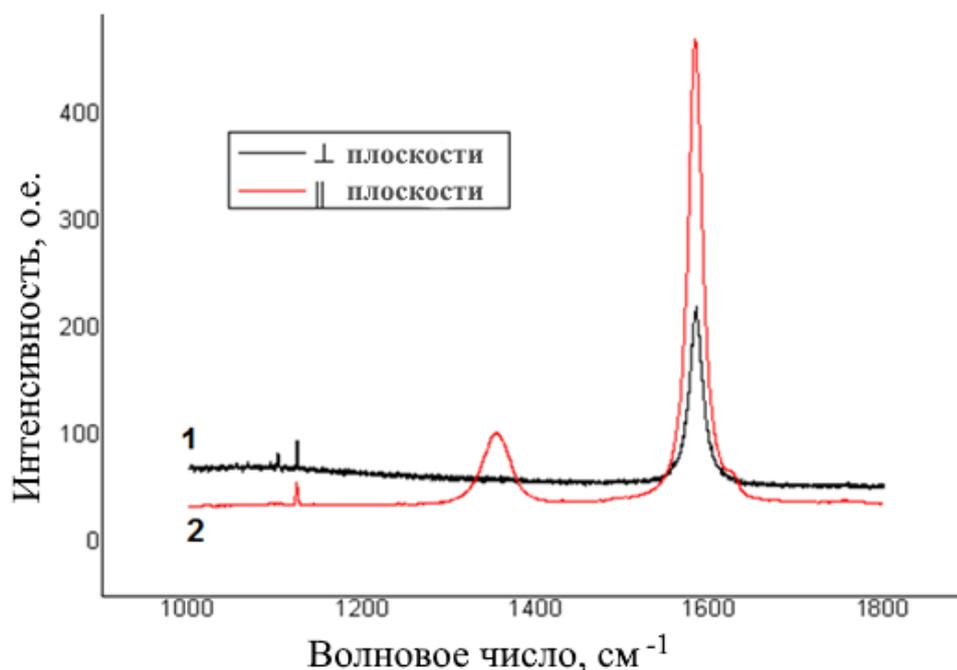


**Рисунок 32.** КР спектры ДНА марки УДА-СТП: 1 – исходный ДНА; 2 – ДНА, окисленный воздухом при 400 °С, 5 ч; 3 – ДНА, восстановленный водородом при 800 °С, 5 ч.

Вторая полоса, соответствующая  $sp^2$ -углероду в графите и графитсодержащих материалах, обычно проявляется в области 1560-1580 см<sup>-1</sup>. В КР спектрах исследуемых образцов ДНА вторая полоса проявляется при 1632, 1610 и 1604 см<sup>-1</sup>, соответственно для исходного, окисленного и восстановленного ДНА [346]. Следовательно, наибольшее смещение наблюдается для исходного ДНА, в котором имеется максимальное содержание карбонильных групп (см. Рис. 32 и Табл. 26), а наименьшее – для восстановленного образца, на котором карбонильные группы по ИК спектрам не обнаруживаются. Можно предположить, что размер частиц также влияет на положение второй полосы КРС и приводит к смещению ее, но это смещение от характерной для графита частоты слишком большое. К тому же оно зависит и от условий обработки ДНА. Из литературы известно [349], что для карбонильных соединений характерны полосы в КР спектрах в области 1600-1700 см<sup>-1</sup>. Поэтому нами предположено, что, поскольку на поверхности образцов ДНА присутствуют различные группы, содержащие  $sp^2$ -углерод, связанный с кислородом, то он и проявляется в этой области КР - спектра наряду со связью С=С, аналогичной связи в графите, но несколько искаженной [346]. Это подтверждают данные о строении частицы ДНА, в которой вокруг алмазного ядра имеется нарушенная алмазная оболочка.

В подтверждение выдвинутой гипотезы можно привести работу [350], в которой изучены КР-спектры высокоориентированного пиролитического графита (НОРГ). Последний обычно используется как инструмент калибровки для исследований, так как в его структуре очень мало

дефектов. Авторы приводят КР-спектры НОРГ (Рис. 33) в зависимости от ориентации образца: спектр 1 – луч лазера перпендикулярен базальной грани графита (в спектре одна полоса  $1580\text{ см}^{-1}$ ); спектр 2 – луч лазера параллелен ей (в спектре появляется полоса  $1332\text{ см}^{-1}$  и плечо при  $1620\text{ см}^{-1}$ ). Это авторы работы [350] объясняют краевыми дефектами, связанными с появлением связей С–С ( $sp^3$ -углерод) и искажением связей С=C ( $sp^2$ -углерод).



**Рисунок 33.** КР- спектры графита (НОРГ): 1 – луч лазера перпендикулярен базальной плоскости, 2 – луч лазера параллелен базальной плоскости [350].

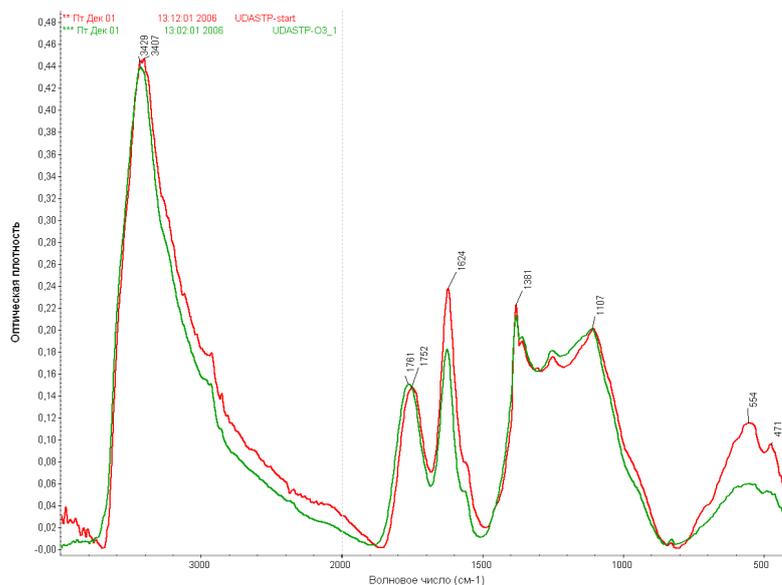
Однако, при объяснении этого эффекта авторы работы [350] не учли химию поверхности графита. А именно, известно, что на базальных плоскостях графита никаких функциональных групп нет, а на его призматических гранях содержатся в большом количестве различные кислородсодержащие группы (карбоксильные, лактонные, фенольные, хинонные, ангидридные). И это обязательно должно проявиться в КР спектре графита [351]. Подтверждением этого предположения может служить КР спектр «пористого» графита, полностью идентичный спектру 2 на Рис. 33. Правда, автор работы [351] объясняет вид спектра так же, как и авторы работы [350], однако, именно условия получения «пористого» графита, в частности, обработка кислотами-окислителями приводят к образованию на графите кислородсодержащих групп, в которых присутствуют связи С=О [346].

Наличие дополнительных слабо проявляющихся полос в спектре КР исходного ДНА, возможно, обусловлено наличием дефектных структур и адсорбированных соединений. После высокотемпературной обработки воздухом и водородом эти полосы исчезают (спектр существенно сглаживается). Поэтому можно считать, что адсорбированные соединения удалены

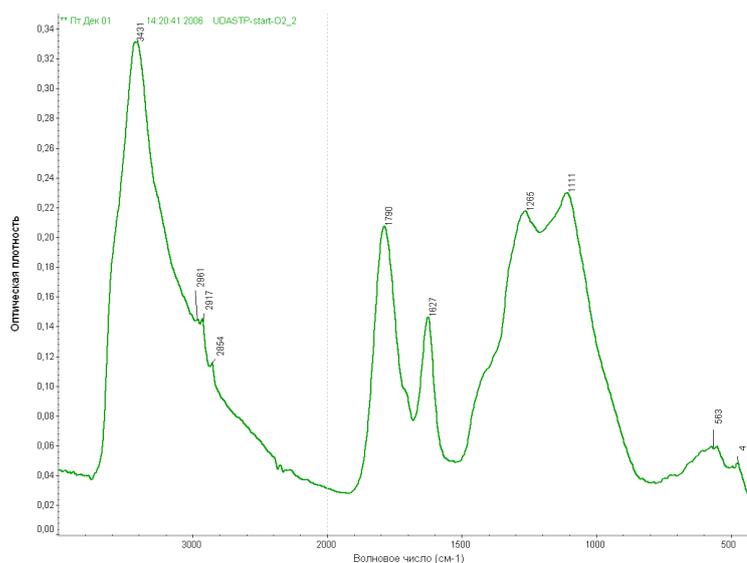
с поверхности, т.е. наноалмаз стал более «чистым», причем при более высокой температуре обработки (водородом при 800 °С) поверхность становится более «чистой», чем при более низкой (воздухом при 400 °С) [346].

**Озонирование ДНА.** Первый эксперимент по озонированию ДНА был выполнен на исходном образце ДНА марки УДА-СТП без какой-либо предварительной обработки. Анализ воздушной смеси после озонирования показал, что с поверхности ДНА удаляется большое количество газа, в том числе, и сорбированная на поверхности вода. После этого все образцы были подвергнуты обработке при температуре 180 °С в течении 3 ч. После этого образцы ДНА хранились в бьюксах и эксикаторе до следующего эксперимента. Далее три образца (УДА-СТП исходный, УДА-СТП – окисленный воздухом, УДА-СТП – восстановленный водородом) были проозонированы.

Для всех образцов ДНА до и после озонирования были зарегистрированы ИК- спектры, которые представлены на Рис. 34-37.

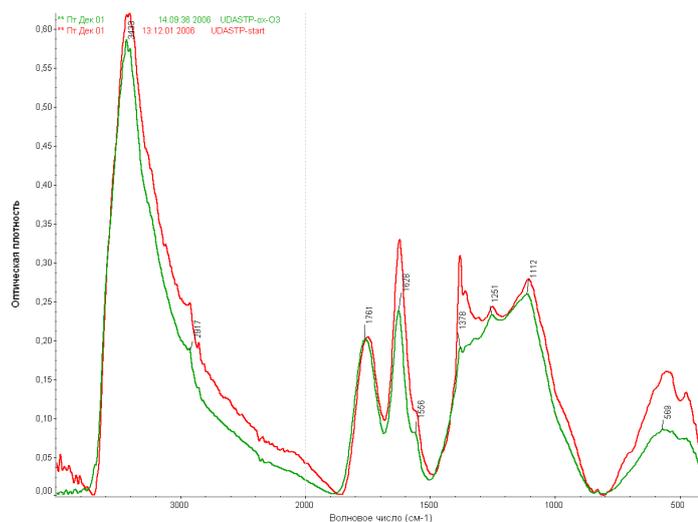


**Рисунок 34.** ИК-спектры исходного ДНА марки УДУ-СТП (красный) и после озонирования без предварительной температурной обработки (зеленый).



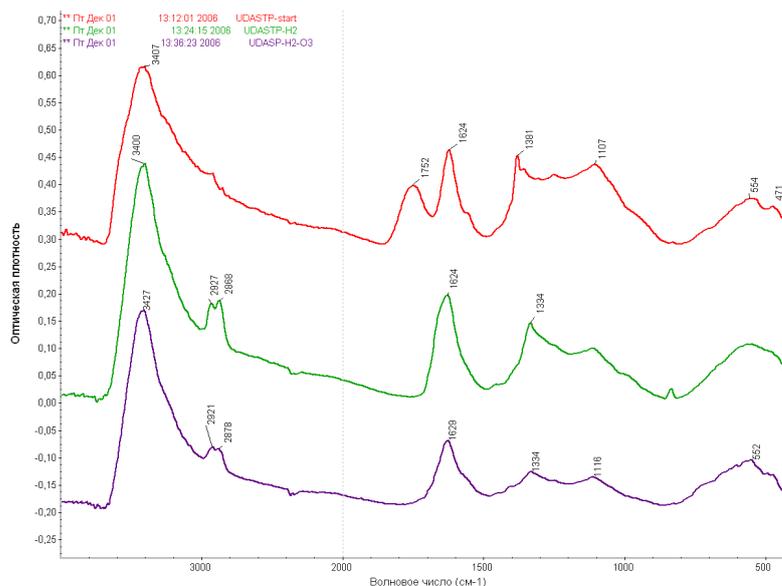
**Рисунок 35.** ИК спектр исходного ДНА марки УДУ -СТП (прогретого) после озонирования.

Из сопоставления Рис. 34 и 35 видно, что содержание карбонильных групп на поверхности ДНА увеличилось, а гидроксильных групп уменьшилось по сравнению с непрогретым образцом.



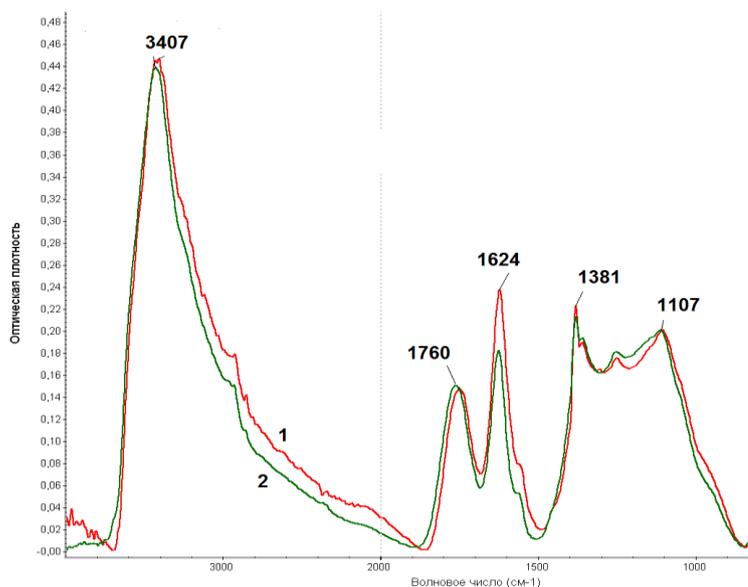
**Рисунок 36.** ИК спектр ДНА марки УДУ-СТП окисленного воздухом до (красный) и после (зеленый) озонирования.

По данным ИКС можно сделать **вывод**, что при озонировании ДНА поверхностные группы окисляются плохо. На образце ДНА марки УДА-СТП (исходн.) наблюдается небольшое уменьшение количества связей  $\text{-OH}$  ( $1626 \text{ см}^{-1}$ ). На образце УДА-СТП (водород) уменьшается количества  $\text{C-N}$  связей при  $\text{sp}^3$  атоме углерода ( $2866$  и  $2937 \text{ см}^{-1}$ , соответственно) и не образуется карбонильных групп. На образце УДА-СТП (воздух) заметных изменений ИК-спектра не наблюдается.



**Рисунок 37.** ИК спектры ДНА марки УДУ-СТП: исходный (красный), восстановленный водородом (зеленый) и озонированный (фиолетовый).

По данным ИКС можно сделать **вывод**, что при озонировании ДНА поверхностные группы окисляются плохо. На образце ДНА марки УДА-СТП (исходн.) наблюдается небольшое уменьшение количества связей  $\text{-OH}$  ( $1626 \text{ см}^{-1}$ ). На образце УДА-СТП (водород) уменьшается количества  $\text{C-H}$  связей при  $\text{sp}^3$  атоме углерода ( $2866$  и  $2937 \text{ см}^{-1}$ , соответственно) и не образуется карбонильных групп. На образце УДА-СТП (воздух) заметных изменений ИК-спектра не наблюдается.

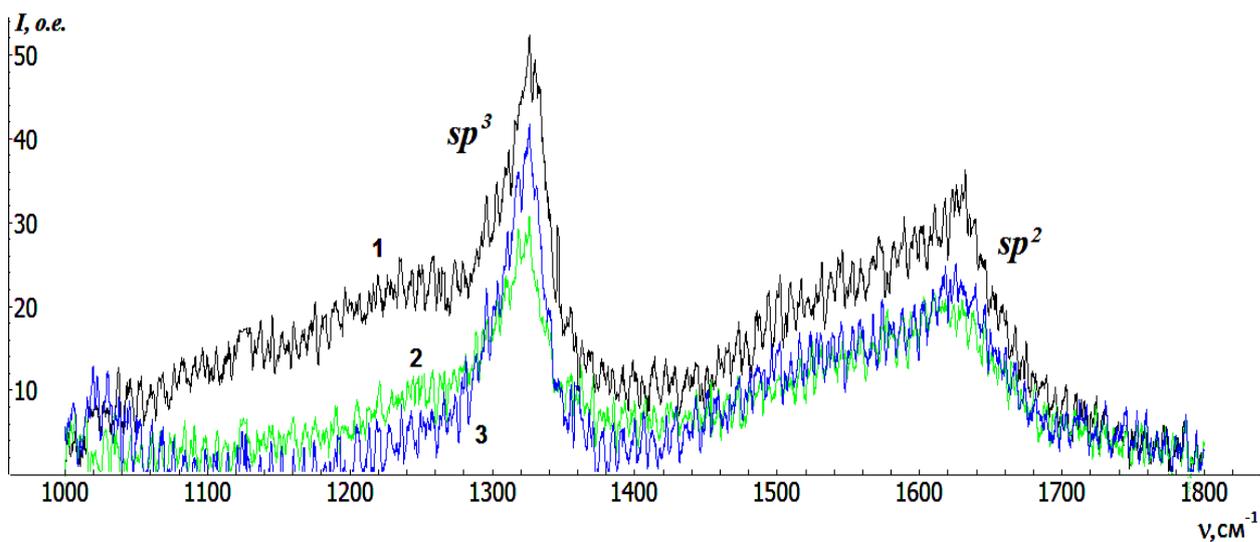


**Рисунок 38.** ИК спектры ДНА марки УДА-СТП: 1 – исходный ДНА; 2– ДНА, модифицированный озонем при комнатной температуре в течение 1 ч.

Далее в работе было проведено озонирование ДНА марки УДА-СТП после различной обработки (прогрев при 200 °С; окисление воздухом при 400 °С; восстановление водородом при 800 °С). Во всех случаях уменьшение массы образцов не превышало 1%, а  $\text{CO}_2$  в смеси на выходе из реактора содержался в следовых количествах. На Рис. 38 представлены ИК-спектры образцов ДНА до и после озонирования.

Из Рис. 38 следует, что при озонировании ДНА наблюдается небольшое уменьшение интенсивности полосы  $1624 \text{ см}^{-1}$ , соответствующей -ОН группам, что может свидетельствовать об удалении с поверхности ДНА сорбированной воды; полосы  $1760$ ,  $1381$  и  $1107 \text{ см}^{-1}$ , соответственно, практически не изменяются. На основании спектров, представленных на Рис. 33, можно сделать вывод, что при озонировании химическое состояние поверхности ДНА практически не меняется.

Озона в выходящей из реактора смеси обнаружено не было, что свидетельствует о том, что на ДНА происходит практически полное каталитическое разложение озона без значительного воздействия на поверхностные группы. Отсюда был сделан **вывод**, что озонирование при комнатной температуре для модифицирования поверхности ДНА использовать неэффективно.



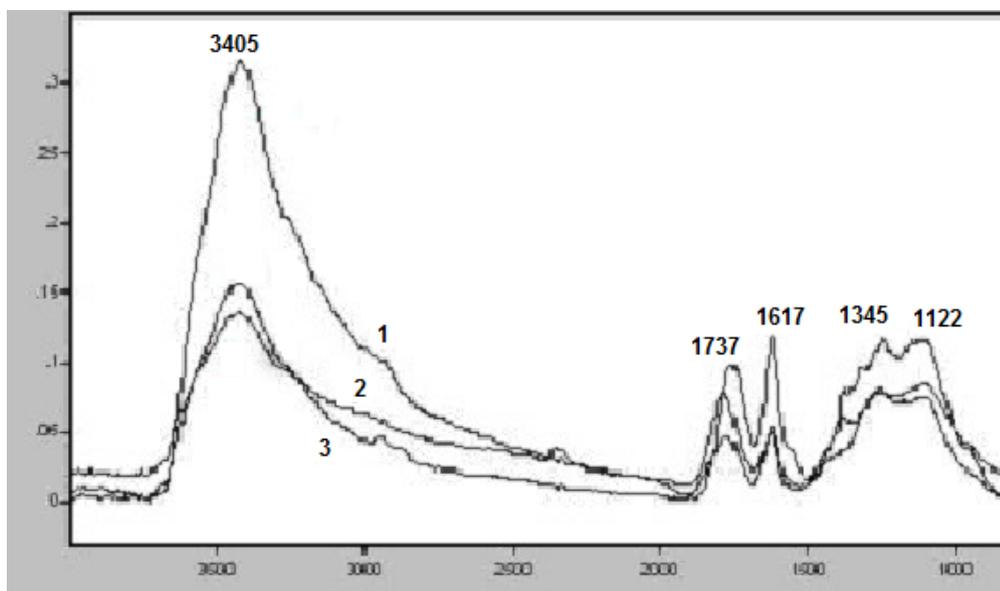
**Рисунок 39.** КР- спектры ДНА марки УДА-СТП: 1 – исходный ДНА; 2 – ДНА, модифицированный водородом при 800 °С, 5 ч; 3 – ДНА, озонированный при комн. темп, 1 ч.

Из сравнения КР-спектров, приведенных на Рис. 39, следует, что при окислении ДНА озоном происходит значительное сглаживание спектра, что свидетельствует о лучшей очистке поверхности ДНА, чем при обработке воздухом при 400 °С. Видимо, именно поэтому озоновую очистку предпочтительно использовать при выделении наноалмаза из продуктов детонации, в том числе, и в промышленности.

**Окисление в воздушной плазме.** 3 образца ДНА (исходный, после окисления воздухом и после восстановления водородом) были обработаны в потоке воздуха, активированного тлеющим разрядом.

Из порошков ДНА были приготовлены спиртовые суспензии. После испарения спирта при комнатной температуре в течение 12 ч они имели следующие различия: наиболее равномерный по толщине слой порошка (при равных массах навесок) был в случае ДНА марки УДА-СТП (водород), наименее равномерный, с наличием комьев и обнаженных участков дна лодочки слой порошка наблюдался в случае ДНА марки УДА-СТП (исходный).

В процессе обработки ДНА в воздушной плазме с помощью масс-спектрометра наблюдали увеличение сигналов ионов массой 28 и 44 а.е.м (предположительно CO и CO<sub>2</sub>) по сравнению с исходным потоком воздуха. Взвешивание порошков до и сразу после обработки обнаруживало убыль массы в десятых долях миллиграмма (примерно 2-3% от общей массы образца). ИК спектры этих образцов представлены на Рис. 40. Заметного различия в ИК - спектрах образцов (с различной предварительной обработкой) в случае воздействия кислородной плазмы не обнаружено. Поэтому можно говорить о незначительном окислении поверхностных групп на поверхности ДНА воздушной плазмой.



**Рисунок 40.** ИК-спектры образцов ДНА марки УДА-СТП после обработки в воздушной плазме: 1 - исходный, 2 –восстановленный, 3 – окисленный.

**Выводы.** Методом ИКС установлено, что состояние поверхности ДНА перед обработкой озоном и тип обработки практически не сказываются на функциональном покрове алмазной поверхности. Показано, что в процессе озонирования происходит каталитическое разложение озона на поверхности ДНА вне зависимости от условий предварительной обработки образцов.

Увеличение поверхности в результате газофазного модифицирования ДНА может быть обусловлено изменением функционального состава поверхности и разрушением агрегатов.

### 3.3.3. Определение функциональных групп на поверхности модифицированных ДНА

#### 3.3.3.1. Кислотные группы

Методом потенциометрического титрования было оценено количество кислотно-функциональных групп (КФГ) на поверхности ДНА [345]. Из данных Табл. 27 видно, что условия обработки влияют на содержание КФГ. При окислении кислородом воздуха в 3 раза возрастает количество кислотных центров по сравнению с исходным образцом за счет окисления С-Н связей до С-ОН, СООН, >С=О. При восстановлении образца ДНА водородом содержание КФГ уменьшается в 10 раз за счет удаления кислородных групп с поверхности и образования новых С-Н связей.

Восстановленный ДНА содержит КФГ в 15 раз меньше по сравнению с исходным образцом. Это связано с уменьшением КФГ в результате восстановления поверхности ДНА, что подтверждено методом ИКС.

Таблица 27. Содержание поверхностных групп на образцах ДНА, подвергнутых различной обработке.

Исследуемый образец ДНА (условия обработки)	Содержание КФГ, 10 <sup>-4</sup> моль/г
ДНА (УДА-СТП)	3,2±0,1
ДНА (H <sub>2</sub> , 800°С)	0,2±0,1
ДНА (O <sub>2</sub> , 400°С)	9,9±0,1

#### 3.3.3.2. Аминогруппы

Для определения количества аминогрупп в образцах аминированных ДНА была использована методика с применением 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты (TNBS) [182]. Этот реагент образует с первичными аминогруппами окрашенное соединение (Рис. 41), которое детектируется при длине волны 408 нм [352].

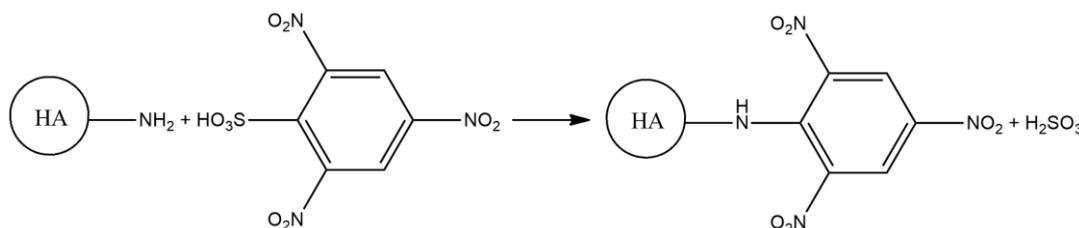
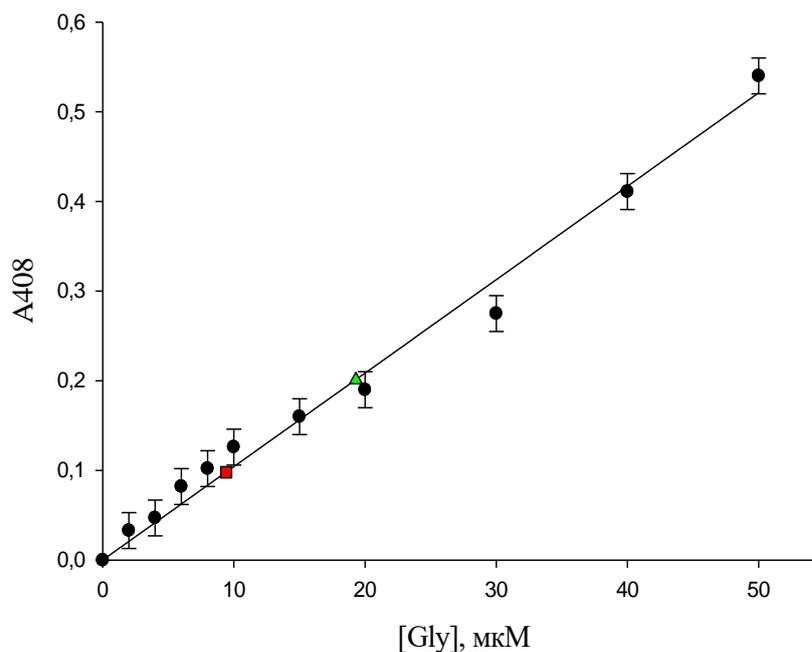


Рисунок 41. Модификация NH<sub>2</sub>-групп под действием TNBS.

Сначала строили градуировочную зависимость, используя аминокислоту глицин в качестве модельного первичного амина (Рис. 41). Затем определяли количество модифицированных групп в образцах ДНА-NH<sub>2</sub> и ДНА-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> (изображено красным и зеленым символами на Рис. 42, соответственно). Количество аминогрупп в образце ДНА-NH<sub>2</sub> составило 118 мкМ/г ДНА, в образце ДНА-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> – 277 мкМ/г ДНА [182]. Эти результаты согласуются с данными, полученными методом РФЭС.



**Рисунок 42.** Модификация аминогрупп ДНА под действием TNBS. Черные точки соответствуют градуировочной зависимости, построенной по глицину; зеленый треугольник - данные для образца ДНА-NH<sub>2</sub>; красный квадрат – для образца ДНА-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>.

### 3.3.5. Получение [<sup>3</sup>H]-ДНА

Введение трития в ДНА потребовало поиска оптимальных условий введения радиоактивной метки с помощью метода МТАТ [353]. Были изучены различные варианты охлаждения разных частей реактора жидким азотом: полностью, все стенки и только дно. Оказалось, что при охлаждении стенок реактора удельная активность образца после отмывки меньше, чем при охлаждении дна, где собираются различные примеси образовавшиеся в ходе реакции. Поэтому, в дальнейшей работе был применен вариант с охлаждением только дна реактора.

В процессе синтеза [<sup>3</sup>H]-ДНА тритий идет на замещение водорода и восстановление различных функциональных групп, вследствие чего давление в реакторе падает. Если давление

снижается слишком сильно, то преимущественным является процесс восстановления, а не замещения. Слишком малое изменение давления может свидетельствовать об отсутствии реакции с тритием и требует дополнительного подбора условий эксперимента.

Многократное повторение различных процедур позволило в работе удалить весь тритий из лабильных групп на поверхности ДНА ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$  и др.), а также возможные радиоактивные примеси. В результате весь тритий остался в жестко-связанных ковалентных  $\text{C}-^3\text{H}$  связях [353].

После проведения синтеза ДНА с тритиевой меткой на стенках реактора смывали водно-этанольным раствором. Полученную суспензию выдерживали несколько суток, осаждали ДНА центрифугированием, отделяли супернатант и добавляли новую порцию растворителя. Из этой суспензии отбирали 10 мл в аппендорф, добавляли 1-1,5 мл сцинтиллятора и измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta 1215 (Финляндия).

Удельная радиоактивность впервые полученного ДНА, меченого тритием, после многократных промывок для удаления трития из лабильных положений (т.е групп  $-\text{O}^3\text{H}$ ,  $-\text{COO}^3\text{H}$  и др.), а также возможных радиоактивных примесей была равна 34 ГБк/г. В случае, когда метку вводили в гидрированный ДНА, его удельная радиоактивность оказалась равной 90 ГБк/г, хотя начальные удельные радиоактивности препаратов были близки. Это свидетельствует о примерно равном количестве химических групп на поверхности двух образцов. Поэтому унификация поверхности ДНА позволяет увеличить выход меченого тритием ДНА в 3 раза и повысить разрешающую способность обнаружения частиц ДНА в растворах, биологических жидкостях, тканях и органах [354].

Через год радиоактивность ДНА снизилась на 5%, что обусловлено распадом трития за этот период. Используя стабильные гидрозолы с размером частиц 50 нм в работе был разработан способ повышения степени введения трития в ДНА и впервые получен наноалмаз с величиной радиоактивности 2600 ГБк/г [353, 355].

После этого в даднейшей работе для реакции тритирования было решено наносить на стенки колбы не порошок гидрированного ДНА, а его гидрозоль с размерами частиц 40-50 нм. По расчетам количество нанесенного на стенки колбы ДНА должно было составить монослой, что позволяет существенно повысить эффективность мечения ДНА. В результате после отмывки меченого тритием ДНА его активность составила 2600 ГБк/г, что соответствует замещению 50% атомов водорода в ДНА (по данным элементного анализа в гидрированном ДНА количество атомов Н составило 0,5%) [353].

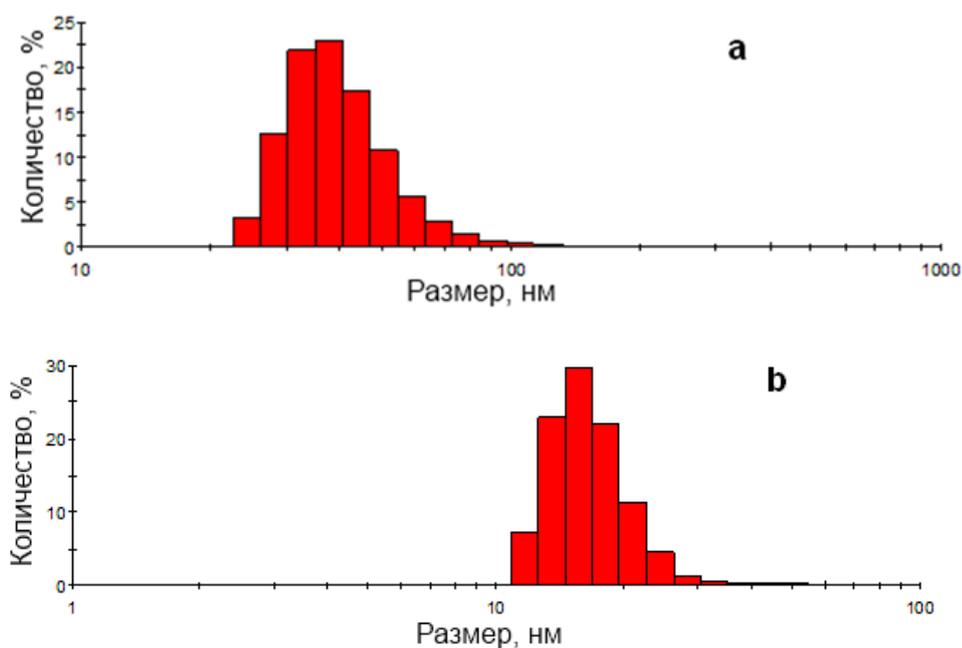
**Вывод:** впервые синтезированы тритийзамещенные наноалмазы [ $^3\text{H}$ ]-ДНА. Установлено, что предварительное восстановление поверхности ДНА водородом приводит к получению [ $^3\text{H}$ ]-ДНА с большей радиоактивностью: активность [ $^3\text{H}$ ]-ДНА исходного равна 34 ГБк/г, активность

[<sup>3</sup>H]-НА, предварительно восстановленного, равна 90 ГБк/г, после мечения монослоя ДНА его радиоактивность составила 2600 ГБк/г.

### 3.4. Гидрозоли ДНА

#### 3.4.1. Дезагрегация

В связи с отсутствием в литературе описания эффективных способов получения гидрозолей ДНА в работе были разработаны оригинальные методики получения и стерилизации стабильных высококонцентрированных (до 40 мг/мл) гидрозолей ДНА с параметрами, необходимыми для их биомедицинского использования ДНА в системах доставки в качестве носителей БАВ и ЛВ. Разработанные методики позволяют получать гидрозоли ДНА с определенным (от 15 до 100 нм) размером и узким гранулометрическим распределением частиц (Рис. 43).



**Рисунок 43.** Распределение частиц ДНА по размерам в гидрозолях: **a** – гидрозоль получен в результате УЗ-обработки водной (с добавкой 0,9% масс. NaCl) суспензии ДНА в течение 10 мин (УЗ-ванна, 300 Вт) и последующего центрифугирования при 9000 об/мин. **b** – гидрозоль получен в результате УЗ-обработки водной суспензии ДНА в течение 18 мин (УЗ-диспергатор, 250 Вт/см<sup>2</sup>) и последующего центрифугирования при 11000 об/мин.

Полученные гидрозоли физически устойчивы и не осаждаются в течение более 1 года (время наблюдения). Измерения, необходимые для определения срока годности, продолжаются.

Для исследования полученных гидрозолей ДНА методом спектрофотометрии, прежде всего, необходимо, чтобы они проявляли стабильность во времени. Предварительно полученные гидрозоли ДНА оказались нестабильными. Образцы ДНА марки УДА-ТАН, полученные от производителя, не образовали устойчивых гидрозолей даже при многократной обработке ультразвуком, что согласуется с данными работ [235, 95]. Поэтому с целью получения устойчивых гидрозолей этой марки ДНА был применен комплексный подход к дезагрегации: химическое модифицирование путем газофазного гидрирования и жидкофазного окисления с дальнейшим чередованием УЗО и ЦФ. Причем, было показано, что, если использовать многократное чередование циклов «УЗО – ЦФ», то при увеличении числа циклов степень дезагрегации и концентрация ДНА в гидрозоле увеличиваются.

### 3.4.2. Количественное определение ДНА в гидрозоле

#### 3.4.2.1. Спектрофотометрическое определение

Полученные гидрозоли ДНА были исследованы методом ДРС, позволившего определить распределение агрегатов частиц по размерам и их  $\zeta$ -потенциалы (Табл. 28).

Таблица 28. Распределение частиц по размерам в гидрозолях образцов ДНА и  $\zeta$ -потенциал их частиц.

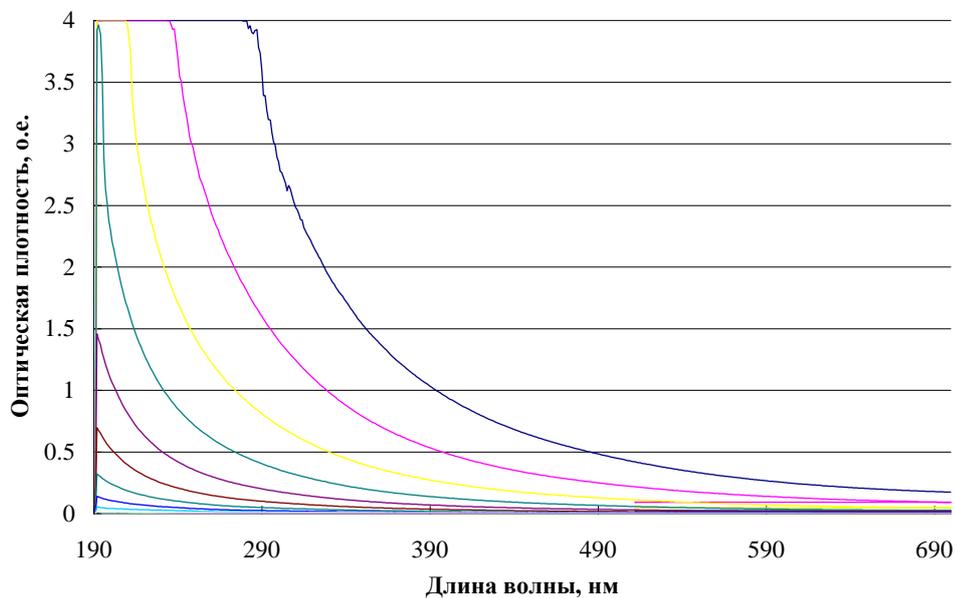
Образец ДНА	$\zeta$ -Потенциал, мВ	Размер основной массы частиц , нм (их содержание, %)
ДНА-Н	$+33.2 \pm 9.0$	25-35 (44%)
ДНА-COOH	$+34.1 \pm 9.9$	13-20 (32%)
SDND	$- 41.3 \pm 9.5$	40-55 (58%)

Из представленных в Табл. 28 данных следует, что абсолютная величина  $\zeta$ -потенциала частиц ДНА во всех гидрозолях превышает  $|30|$  мВ и обеспечивает хорошую устойчивость к агрегированию.

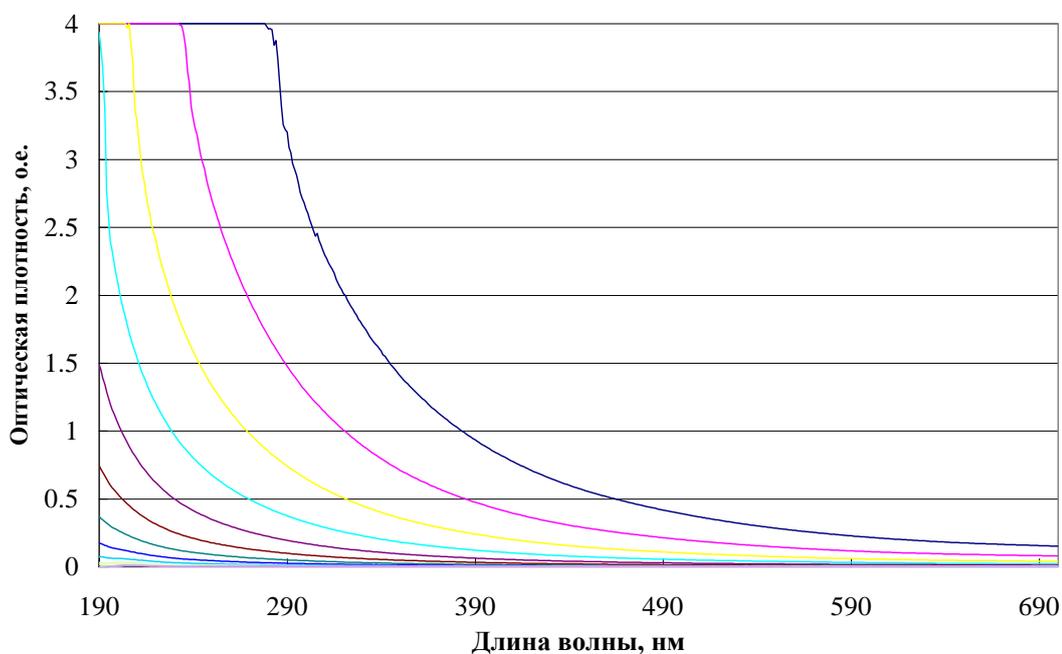
Как следует из литературного обзора, размер первичных кристаллитов ДНА составляет 4-6 нм, которые агрегируют как до устойчивых агрегатов со средним размером 50 нм, так и до более крупных, но менее прочных агрегатов. По данным метода ДРС, приготовленные и исследуемые в работе образцы гидрозолей содержат агрегаты частиц в диапазоне 15-50 нм, следовательно, в работе удалось разработать способ разрушения даже прочных агрегатов ДНА. Известно [235], что на характер поглощения электромагнитного излучения может влиять размер

наночастиц, поэтому при построении градуировочных зависимостей необходимо было учитывать этот параметр.

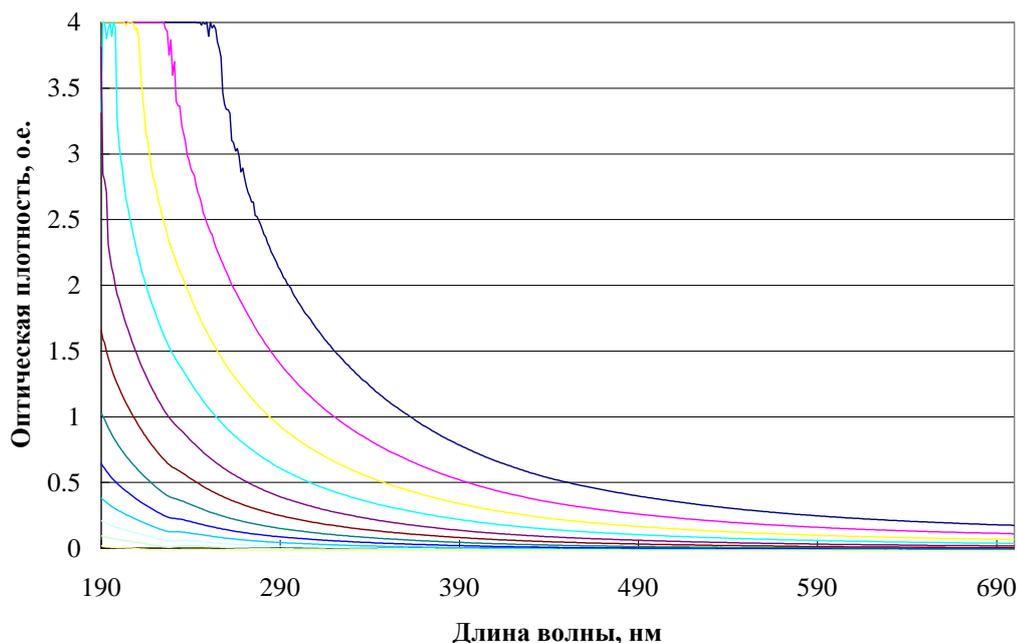
Спектры поглощения гидрозолей ДНА-Н, ДНА-СООН и SDND представлены на Рис. 44-46, соответственно.



**Рисунок 44.** Спектры поглощения гидрозолей образца ДНА-Н при последовательном разбавлении от 1000 мкг/мл до 2 мкг/мл ( $l = 1$  см).



**Рисунок 45.** Спектры поглощения гидрозолей образца ДНА-СООН при последовательном разбавлении от 1000 мкг/мл до 0,06 мкг/мл ( $l = 1$  см).



**Рисунок 46.** Спектры поглощения гидрозолей образца ДНА марки SDND при последовательном разбавлении от 500 мкг/мл до 6 мкг/мл ( $l = 1$  см).

Как видно из Рис. 44-46, УФ-спектры ДНА не имеют характеристических полос поглощения и представляют собой гладкую, экспоненциально возрастающую при движении в УФ-область кривую, что характерно для слабопоглощающих и сильно рассеивающих образцов. Необходимые для построения градуировочной функции максимумы поглощения отсутствовали, в связи чем для нее выбирали значения оптической плотности при длинах волн от 190 до 700 нм с шагом 50 нм [356]. Из Рис. 44-46 видно, что при построении калибровочной зависимости выбор длины волны будет определять предельные измеряемые концентрации гидрозолей. Так, смещение выбранной длины волны в более длинноволновую область позволяет измерять концентрацию более концентрированных растворов в области оптической плотности 1,2-0,01. И, наоборот, выбор длины волны, смещённой в УФ-область спектра при построении калибровочной зависимости, позволит измерять более низкие концентрации частиц ДНА в гидрозоле. Поэтому для всех образцов гидрозолей ДНА были построены градуировочные зависимости оптической плотности от концентрации при разных длинах волн. Необходимо было проверить, сохраняется ли линейность зависимости оптической плотности от концентрации в исследуемом диапазоне концентраций при разных длинах волн. Для этого находили коэффициенты экстинкции  $\varepsilon$  по формуле  $\varepsilon = \frac{A}{lC}$ . Значения интегральной величины оптической плотности наносили на графики в зависимости от концентрации ДНА в гидрозолях, выраженной в мкг/мл, и аппроксимировали линейной функцией. Искомый коэффициент экстинкции находили как тангенс угла наклона

градуировочной функции (Табл. 29). Погрешность измерения складывалась из погрешности отбора пробы и приборной погрешности спектрофотометра и составила 0,6%.

Таблица 29. Сравнение коэффициентов экстинкции в зависимости от длины волны излучения для образцов ДНА-Н, ДНА-СООН и ДНА марки SDND.

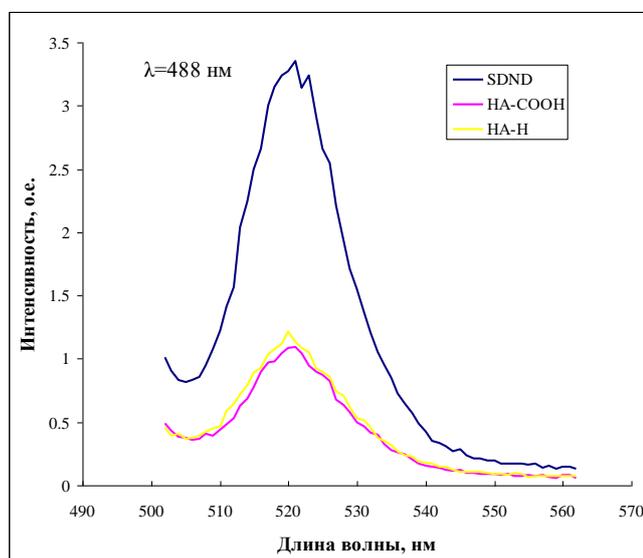
Значения коэффициентов экстинкции $\varepsilon \cdot 10^3$ , мл·см <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>			
$\lambda$ , нм	НА-Н	НА-СООН	SDND
190	23.7±0.2	24.0±0.2	23.4±0.2
200	17.1±0.1	16.7±0.1	20.9±0.2
250	5.60±0.04	5.40±0.04	7.70±0.05
300	2.80±0.02	2.60±0.02	3.80±0.03
350	1.50±0.01	1.40±0.01	2.30±0.02
400	0.944±0.05	0.848±0.05	1.50±0.01
450	0.633±0.004	0.554±0.004	1.11±0.01
488	0,488±0.003	0,423±0.003	0,853±0.005
500	0.451±0.003	0.389±0.003	0.801±0.005
550	0.330±0.002	0.282±0.002	0.632±0.004
600	0.252±0.002	0.215±0.002	0.521±0.003
650	0.202±0.002	0.174±0.002	0.446±0.003
700	0.172±0.002	0.151±0.002	0.392±0.003

На основании Табл. 29 можно сделать вывод, что для всех образцов ДНА коэффициенты экстинкции возрастают с уменьшением длины волны излучения [356]. Зависимость оптической плотности от концентрации линейна во всем диапазоне концентраций и длин волн. В работе [235] предположено, что значения коэффициентов экстинкции могут зависеть от размеров частиц в гидрозолях. Так, в работе [235] при длине волны 488 нм для образца SDND со средним размером частиц 18 нм коэффициент экстинкции оказался равен  $0,203 \cdot 10^3 \cdot \text{мл} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ . Из данных Табл. 29 видно, что при длине волны 488 нм для образца SDND с размером частиц 40 нм  $\varepsilon = 0,853 \cdot 10^3 \cdot \text{мл} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ . Следовательно, при сравнении литературных данных с данными Табл. 29 значение  $\varepsilon$  повышается при увеличении размеров частиц ДНА в гидрозоле. В частности, гидрозоли ДНА марки SDND обладают в среднем большим коэффициентом поглощения, чем гидрозоли образцов ДНА-Н и ДНА-СООН, что может быть связано с большим размером частиц. Различие в коэффициентах экстинкции также может быть связано с разным составом функциональных групп на поверхности частиц ДНА. Образцы ДНА-Н и ДНА-СООН имеют небольшие различия в коэффициентах экстинкции, что может быть обусловлено разными

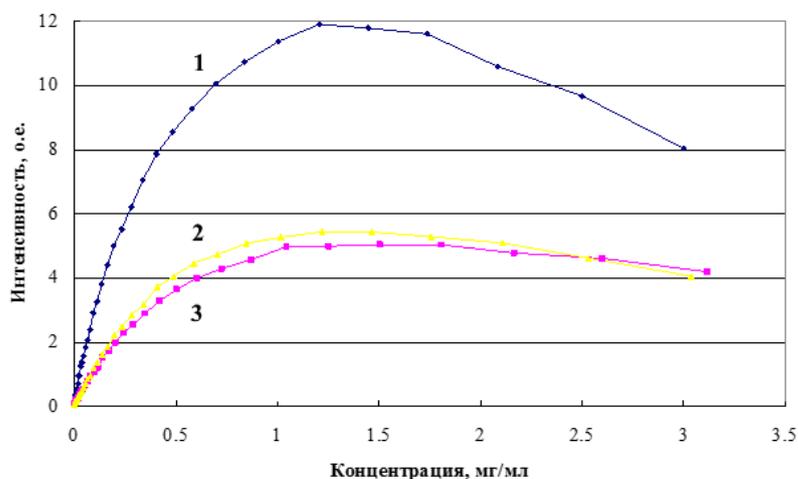
методиками их обработки, а незначительное различие в величине  $\varepsilon$  – с тем, что образцы были получены из одной марки наноалмаза УДА-ТАН, который имеет свой характерный функциональный покров. Тогда как сильно отличающийся функциональным составом образец ДНА марки SDND имеет существенно больший коэффициент экстинкции.

### 3.4.2.2. Флуориметрическое определение

В предварительных экспериментах гидрозоли ДНА возбуждались излучением с длинами волн в диапазоне 210-690 нм. Было показано, что максимальная интенсивность фотолюминесценции образцов достигалась при возбуждении с длиной волны 488 нм, что полностью согласуется с литературными данными [306]. Типичные спектры люминесценции образцов ДНА представлены на Рис. 47.



**Рисунок 47.** Спектры фотолюминесценции образцов ДНА ( $\lambda = 488$  нм).

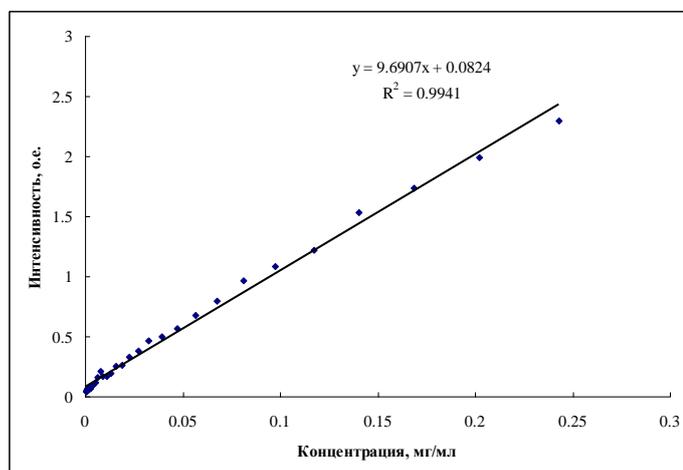


**Рисунок 48.** Зависимость интенсивности фотолюминесценции от концентрации гидрозолей наноалмаза: 1 – SDND; 2 - ДНА-Н; 3 -ДНА-СООН.

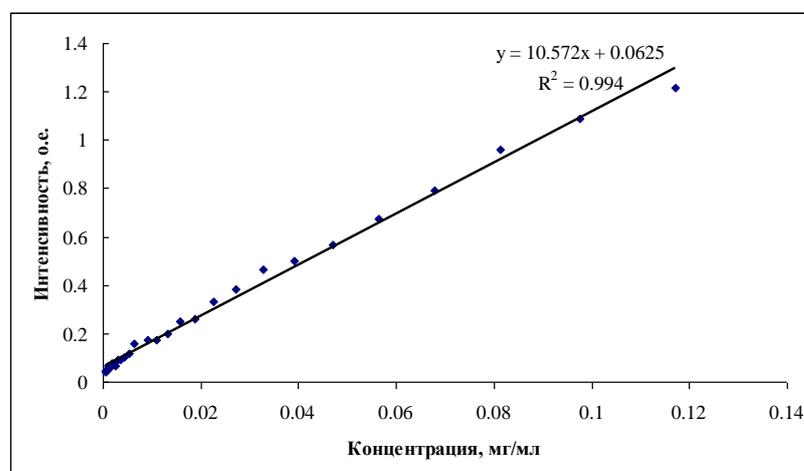
Измеренный спектр люминесценции ДНА представлял собой широкую полосу в диапазоне 390-650 нм с плохо выраженной структурой (аналог А-полосы природных алмазов).

Из Рис. 47 видно, что интенсивность люминесценции образца ДНА марки SDND значительно превышает интенсивность люминесценции образцов ДНА-Н и ДНА-СООН. Это может быть связано с существенным различием в функциональном составе образцов двух марок ДНА. Далее были построены графики зависимости интенсивности люминесценции от концентрации частиц в гидрозоле, представленные на Рис. 48.

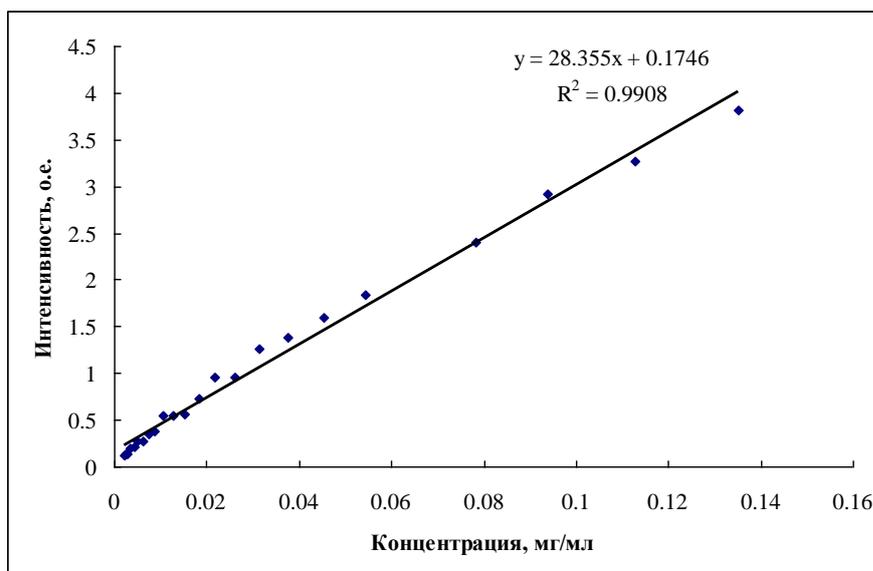
По причине тушения люминесценции зависимость интенсивности люминесценции от концентрации не может быть линейна на всем диапазоне концентраций. Поэтому по результатам зарегистрированных спектров был проведен поиск градуировочной зависимости с наилучшими показателями линейности ( $R^2 > 0,95$ ). Градуировочные функции для образцов гидрозолей ДНА-Н, ДНА-СООН и ДНА марки SDND представлены на Рис. 49-51, соответственно [356].



**Рисунок 49.** Градуировочная зависимость интенсивности фотолюминесценции от концентрации гидрозоля ДНА-Н ( $c = 0.5 - 240$  мкг/мл).



**Рисунок 50.** Градуировочная зависимость интенсивности люминесценции от концентрации гидрозоля ДНА-СООН ( $c = 0.5 - 117$  мкг/мл).



**Рисунок 51.** Градуировочная зависимость интенсивности фотолюминесценции от концентрации гидрозоля ДНА марки SDND ( $c = 0.27 - 140$  мкг/мл).

В результате для каждого типа ДНА, используя их люминесцентные свойства, выявлен диапазон измеряемых концентраций, который можно надежно измерить методом люминесцентного анализа. По результатам измерения концентраций составлена сводная Табл. 30 диапазона измеряемых концентраций для 2 методов определения концентраций разных образцов гидрозолей ДНА.

*Таблица 30.* Диапазоны измеряемых концентраций различных образцов ДНА для методов спектрофотометрии и флуориметрии.

Образец ДНА	Метод	
	Спектрофотометрия, мкг/мл	Флуориметрия, мкг/мл
ДНА-Н	4 – 1000	0.5 – 240
ДНА-COOH	4 – 1000	0.5 – 117
SDND	8 – 1000	0.27 – 140

**Вывод:** с помощью метода спектрофотометрии по сравнению с методом флуориметрии на основе разработанной в работе методики определения концентрации ДНА в гидрозоле выявлена возможность определения более высоких концентраций ДНА. Метод флуориметрии позволяет определять в гидрозоле на порядок более низкие концентрации ДНА – до 0,3 мкг/мл. Однако из-за сильного самотушения люминесценции метод флуориметрии не применим для высококонцентрированных образцов. Используя оба метода, можно экспрессно, просто и эффективно определить необходимые концентрации ДНА в гидрозолях.

### 3.4.3. Стерилизация гидрозолей ДНА

При использовании в медицине ДНА и его конъюгатов с ЛВ, как правило, необходимым требованием является стерильность образцов. В работе были применены два метода стерилизации образцов – фильтрация и термическая обработка.

Сложность метода фильтрации состоит в том, что золь ДНА представляет собой дисперсную систему, частицы которой могут задерживаться на фильтре. Для решения этой проблемы в работе на примере синтезированного конъюгата ДНА с антибиотиком амикацином была разработана методика стерилизации золя ДНА и его конъюгатов путем ультрафильтрации через фильтры из разных материалов с размером пор 0,22 и 0,45 мкм. Результаты фильтрования и параметры фильтрата приведены в Табл. 31. Из всех 8 испытанных фильтров, изготовленных из разных материалов, лишь 3 из них (№№ 3,4 и 6) показали удовлетворительный результат, тогда как остальные практически задерживали все частицы конъюгата ДНА-амикацин. Таким образом, было установлено, что для стерилизации гидрозолей ДНА оптимальными являются фильтры из нейлона и полиэфирсульфона.

Таблица 31. Влияние материала фильтра на параметры фильтрата при стерилизации гидрозоля конъюгата ДНА-амикацин.

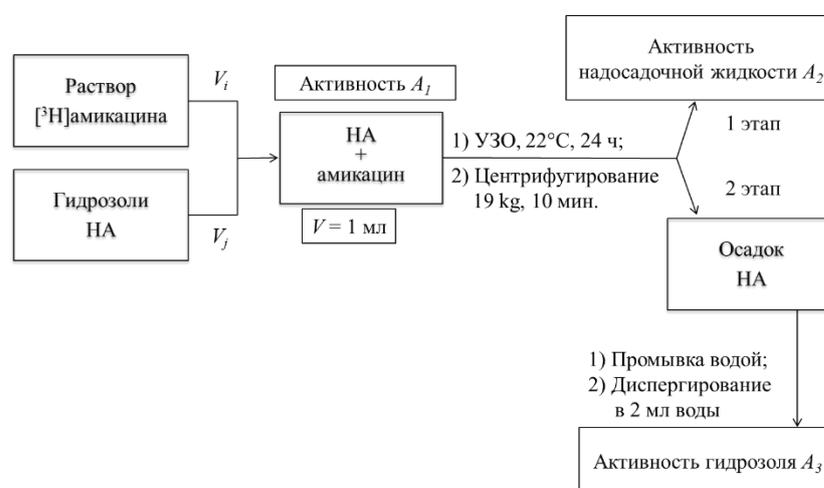
№ п/п	Материал фильтра	Д пор, мкм	Концентр. фильтрата, мг/мл	Размер частиц, нм	ξ-потенциал, мВ
1	Ацетат целлюлозы	0,45	<0,1	255	-10 ± 5
2	Гидрофобный тефлон		<0,1	122 (9,8%)	-7 ± 3
<b>3</b>	<b>Полипропилен</b>		<b>5,0</b>	<b>59</b>	<b>+37 ± 4</b>
<b>4</b>	<b>Нейлон</b>	0,22	<b>9,0</b>	<b>44 (23%)</b>	<b>+31 ± 5</b>
5	Тефлон		<0,1	51	+26 ± 4
<b>6</b>	<b>Полиэфирсульфон</b>		<b>1,8</b>	<b>16</b>	<b>+26 ± 7</b>
7	Смешанные эфиры целлюлозы		<0,1	18	+27 ± 7
8	Гидрофильный тефлон		<0,1	38	+27 ± 7

Термическая обработка осуществлялась как при кипячении на воздухе в течение 2-6 ч, так и автоклавированием при 120 °С в течение 5-30 мин в зависимости от объема раствора. Методом ДРС было показано отсутствие агрегации частиц ДНА после стерилизации.

### 3.5. Имобилизация соединений на поверхности ДНА

#### 3.5.1. Адсорбционная иммобилизация амикацина

В работе для изучения иммобилизации химических веществ на ДНА было проведено сопоставление ковалентной и адсорбционной иммобилизации амикацина [150]. Для изучения адсорбции был специально синтезирован и очищен меченный тритием амикацин. Последний в смеси с немеченым амикацином был использован для приготовления растворов, из которых проводили сорбцию. Исследование адсорбции проводилось с использованием предварительно полученных гидрозолей ДНА-СООН и ДНА-Н. Эксперимент по адсорбции проводили согласно схемы, указанной на Рис. 52.



**Рисунок 52.** Схема эксперимента по адсорбции амикацина на наноалмазе.

Определение адсорбции амикацина на ДНА осуществляли, используя расчеты:

$$A_{уд(до)}^V = \frac{V_i \times A_{уд}^V}{V_i \times V_j} \quad (6),$$

$$C_{Amic(до)} = \frac{A_{уд(до)}^m}{A_{уд(исх)}^m} \quad (7),$$

$$C_{НА(смесь)} = \frac{V_j \times c_{НА(исх)}}{V_i + V_j} \quad (8),$$

где,  $A_{уд(до)}^V$  – удельная (объемная) радиоактивность смеси амикацина с ДНА,

$V_i$  – объем исходного раствора амикацина, добавленного в каждую пробирку,

$V_j$  – объем исходного гидрозоля НА, добавленного в каждую пробирку,

$C_{Amic(до)}$  – концентрация амикацина в смеси до адсорбции,

$A_{уд(до)}^m$  – удельная (массовая) радиоактивность смеси амикацина с ДНА,

$A_{уд(исх)}^m$  – удельная (массовая) радиоактивность исходного раствора амикацина с ДНА,

$C_{НА(смесь)}$  – концентрация НА в смеси,

$C_{НА(исх)}$  – концентрация НА в исходных гидрозолях ДНА–СООН и ДНА–Н.

Рассчитывали равновесную концентрацию амикацина в надосадочной жидкости для каждого из трех отборов по формуле:

$$C_{Amic(до)}^k = \frac{A_k}{V_k} \quad (9),$$

где  $A_k$  – радиоактивность  $k$ -го отбора пробы надосадочного раствора,

$V_k$  – объем  $k$ -го отбора пробы надосадочного раствора.

Далее, рассчитывали среднюю равновесную концентрацию амикацина в надосадочной жидкости после адсорбции по формуле:

$$C_{Amic(до)}^{ср} = \frac{A_{уд(после)}^{V,ср}}{A_{уд(исх)}^m} \quad (10),$$

где  $A_{уд(после)}^{V,ср}$  – средняя удельная радиоактивность надосадочного раствора в каждой пробирке после адсорбции.

По формуле (10) рассчитали равновесную адсорбцию амикацина на ДНА-СООН ( $\Gamma_{с.,равн.}$ ) и ДНА-Н ( $\Gamma_{н,равн.}$ ):

$$\Gamma = \frac{m_{Amic(сорб)}}{m_{НА}} \quad (11),$$

где  $m_{Amic(сорб)}$  – масса сорбировавшегося на ДНА амикацина в каждой пробирке,

$m_{НА}$  – масса НА в каждой пробирке, где масса ДНА уже известна, а массу равновесно адсорбированного на нем амикацина для каждой смеси рассчитывали по формуле:

$$m_{Amic(сорб)} = (A_{уд(до)}^V - A_{уд(после)}^{V,ср}) \times (V_i + V_j) \quad (12)$$

По формуле (12) рассчитывали необратимую адсорбцию амикацина на ДНА:

$$\Gamma = \frac{A'_{сусп}}{A_{уд(исх)}^m \times c'_{НА} \times m_{сусп}} \quad (13),$$

где  $A'_{сусп}$  – радиоактивность отбора каждой гидрозоли ДНА с адсорбированным на нем амикацином,

$c'_{НА}$  – концентрация НА в суспензии полученной после его промывки,

$m_{сусп}$  – масса отбора каждой суспензии.

Массу амикацина, содержащуюся в отобранном объеме каждого фугата, рассчитывали по формуле:

$$m_{сорб(Amic)}^{отб} = \frac{A''_{\phi}}{A_{уд(исх)}^m} \quad (14),$$

где общую массу антибиотика, перешедшего с поверхности ДНА в раствор, вычисляли по формуле (10):

$$m'_{сорб(Amic)} = \frac{m''_{сорб(Amic)} \times m'_{сусп(отб)}}{m_{\phi}^{отб}} \quad (15),$$

Отсюда, по формуле (11) рассчитывали массу амикацина, оставшегося на поверхности ДНА:

$$m''_{Amic(адс)} = m_{сорб(Amic)} - m'_{сорб(Amic)} \quad (16),$$

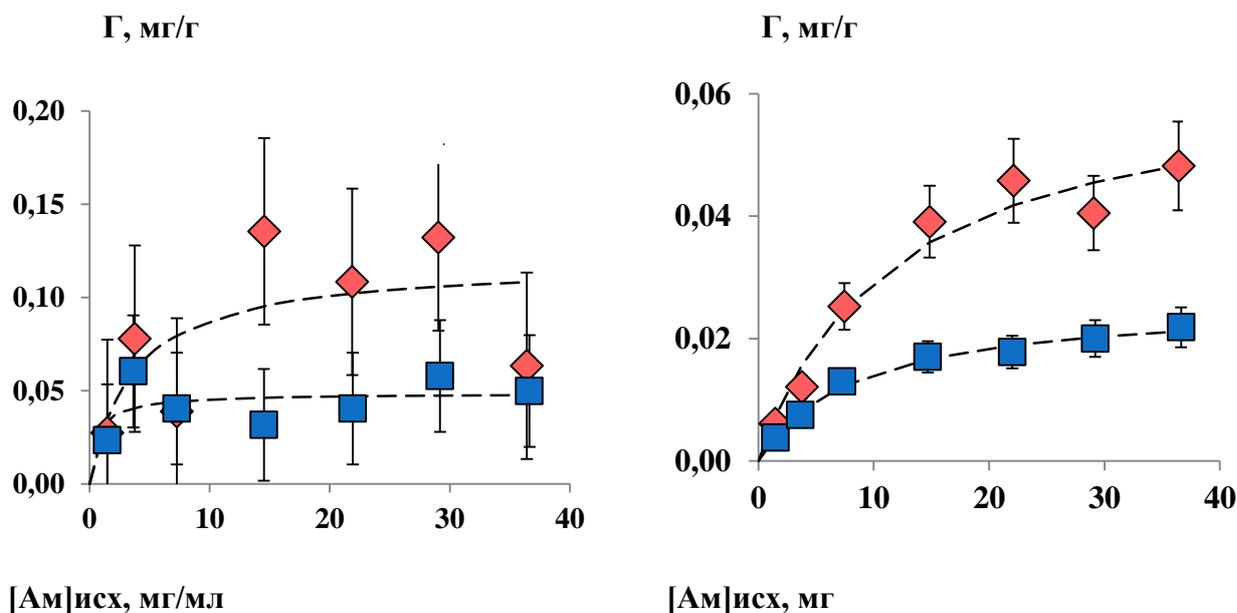
Конечный расчет адсорбции амикацина на ДНА в течение 1 месяца рассчитывали по формуле:

$$\Gamma = \frac{m''_{Amic(адс)}}{m'_{НА}} \quad (17),$$

где массу ДНА, содержащегося в каждом образце, рассчитывали по формуле:

$$m'_{НА} = m'_{сусп(ост)} \times c'_{НА} \quad (18).$$

Было установлено, что величина адсорбции амикацина на ДНА существенно зависит от природы поверхностных функциональных групп (Рис. 53). Так, для карбоксилированного и гидрированного ДНА значение максимальной величины равновесной адсорбции амикацина составило 130 и 50 мг/г, соответственно. При этом количество необратимо сорбированного антибиотика оказалось равным 48 и 22 мг/г, соответственно [150].

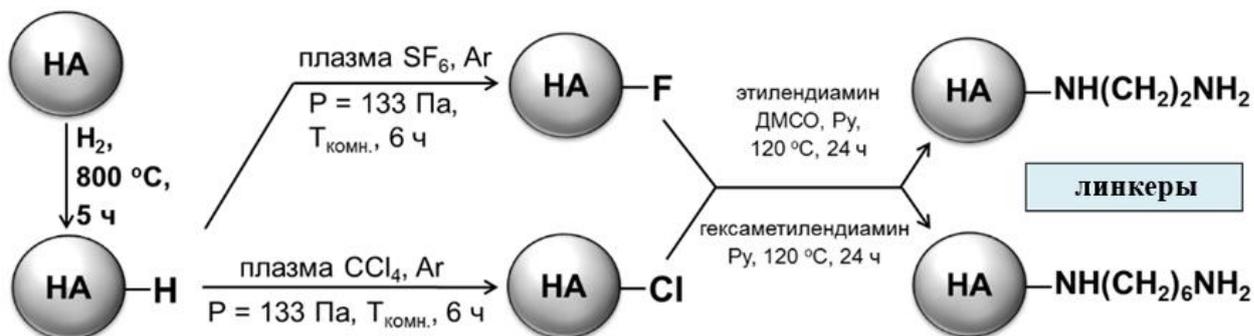


**Рисунок 53.** Адсорбция амикацина на поверхности окисленного ДНА (красный) и гидрированного ДНА (синий): левый - изотермы равновесной адсорбции; правый - количество прочно связанного амикацина с поверхностью ДНА.

### 3.5.2. Прививка этилен- и гексаметилендиамина к поверхности ДНА

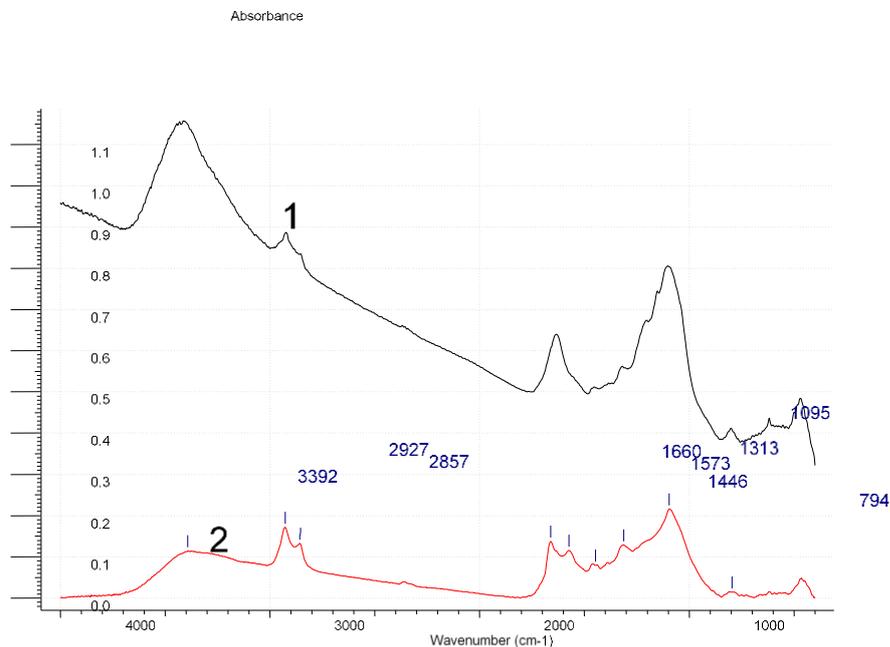
Диамины являются потенциальными спейсерами различной длины, в которых одна  $NH_2$ -группы является якорной, а другая – функциональной для дальнейшего ковалентного связывания с модификаторами, в частности, БАВ и/или ЛВ. Изменение длины алкильной цепи диамина может использоваться для стерического контроля прививаемых объемных БАВ и ЛВ.

В работе были осуществлен синтез и проведено исследование физико-химических свойств конъюгатов ДНА с привитыми этилен- и гексаметилендиамином (Рис. 54) [156].



**Рисунок 54.** Схема прививки диаминов на поверхность ДНА.

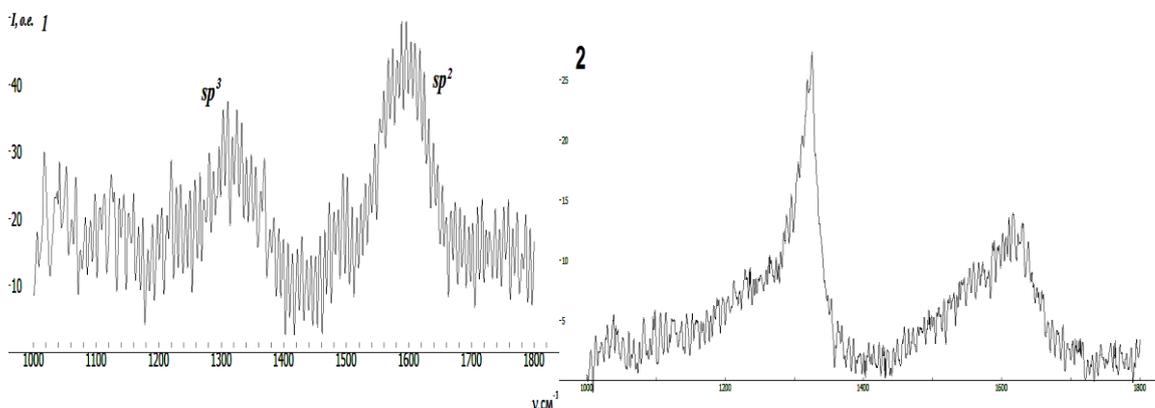
Каждый из диаминов прививали на два образца ДНА марки УДА-ТАН: хлорированный в плазме и фторированный в плазме. Был проведен РФЭС - анализ для фторированного ДНА с привитым гексендиамином: С – 91% ат., О-7,2% ат., N- 1,7% ат. Такое незначительное содержание азота указывает на то, что гексендиамин практически не привился к поверхности. По данным ИКС (Рис. 55) уменьшается интенсивность полосы  $3392\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует о малом содержании воды в образце. Наблюдается относительное увеличение интенсивности полос  $2927$  и  $2857\text{ см}^{-1}$ , соответственно, что может объясняться увеличением количества С-Н



**Рисунок 55.** ИК спектры ДНА марки УДА-ТАН: 1 – фторированный ДНА; 2 – фторированный ДНА с привитым гексендиамином.

групп на поверхности ДНА. Также присутствует характерная для аминов в области 1200-1500  $\text{cm}^{-1}$  группа полос, однако поглощение, характерное для вторичных аминов в области 3100-3300  $\text{cm}^{-1}$ , не наблюдается. ИК-спектр привитого гексендиамин на хлорированном образце ДНА имеет точно такой же вид, как спектр 2 на Рис. 55 [357].

КР-спектр ДНА с привитым гексендиамином представлен на Рис. 56.

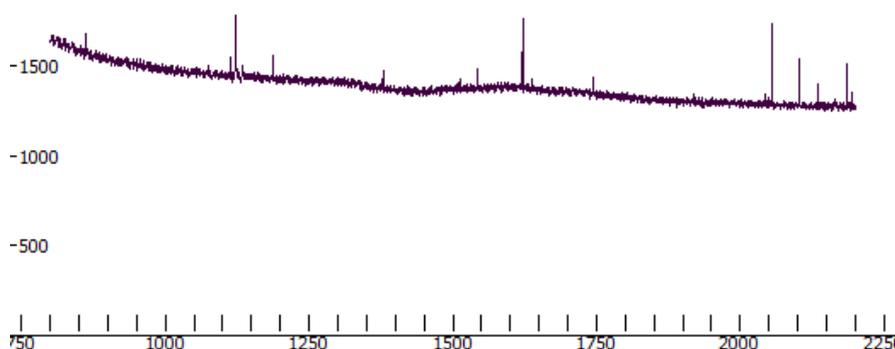


**Рисунок 56.** КР спектр: 1 – ДНА фторированный с привитым гексилдиамином; 2 – исходный ДНА.

Из КР- спектров на Рис. 56 видно, что основные две полосы, характерные для  $sp^3$  и  $sp^2$  углерода на поверхности ДНА, сохраняются, меняется лишь их относительная интенсивность [357].

Из данных РФЭС следует, что при прививке этилендиамин к хлорированному ДНА количество хлора на поверхности снижается с 8,7 до  $\leq 3\%$  ат., а азота - увеличивается до 2,9% ат. При прививке этилендиамин к фторированному образцу ДНА количество фтора на поверхности снижается с 14,5 до 4,4% ат., при этом концентрация азота становится равной 3,5% ат. Если сопоставить исходное соотношение атомов фтора и хлора на образцах ДНА (1,66:1) и соотношение атомов азота на этих образцах после прививки этилендиамин (1,2:1), то можно сделать вывод, что менее прочная связь С-Cl оказывается более реакционноспособной, чем связь С-F [156].

КР спектр фторированного ДНА с привитым этилендиамином приведен на Рис. 57.



**Рисунок 57.** КР спектр ДНА фторированный с привитым этилендиамином

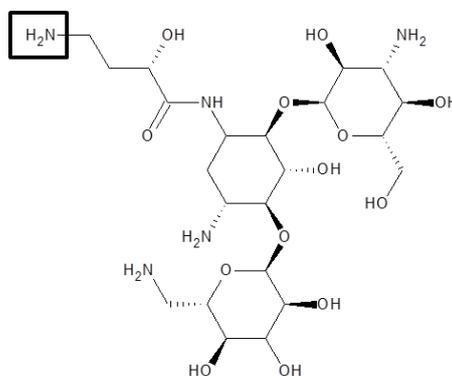
Из Рис. 57 следует, что образец ДНА с привитым этилендиамином обладает сильной люминесценцией (примерно в 60 раз интенсивнее по сравнению с исходным ДНА), что может свидетельствовать об изменении свойств поверхности ДНА и, соответственно, прививке этилендиамина к ДНА.

**Вывод:** выявлено, что ДНА с привитым слоем аминокосодержащих соединений обладают значительной люминесценцией. Обнаружено, что проявление люминесценции и ее интенсивность существенно зависит от химической природы диаминов.

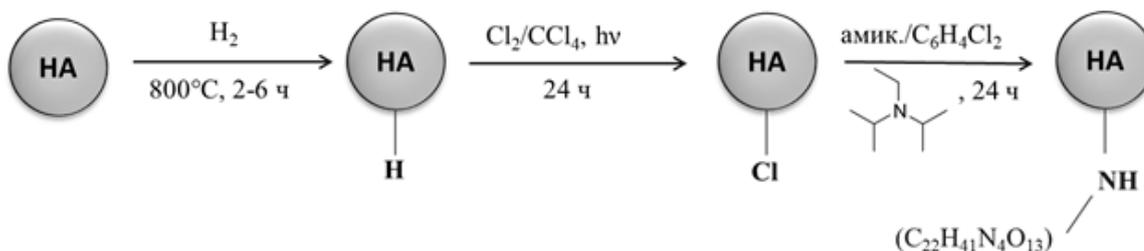
### 3.5.3. Синтез конъюгатов ДНА с БАВ методом ковалентной прививки

#### 3.5.3.1. Конъюгат ДНА-амикацин

Амикацин представляет собой вещество сложного строения из группы полусинтетических аминогликозидов, в основе которого находится агликон и связанные с ним через кислородные мостики два аминсахара. Исходя из особенностей его строения, было необходимо соответствующим образом подготовить поверхность ДНА для ковалентного связывания амикацина через его аминогруппу. Наиболее реакционноспособной и доступной является аминогруппа в 4-амино-2-гидрокси-1-оксобутил радикале молекулы амикацина, которая выделена на Рис. 58.

**Рисунок 58.** Химическое строение молекулы амикацина.

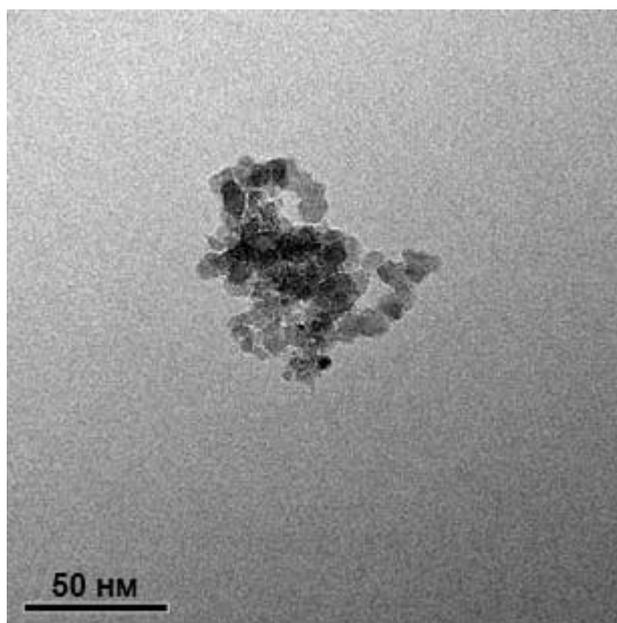
Прививку амикацина на поверхность ДНА проводили согласно схеме на Рис. 59 [150].



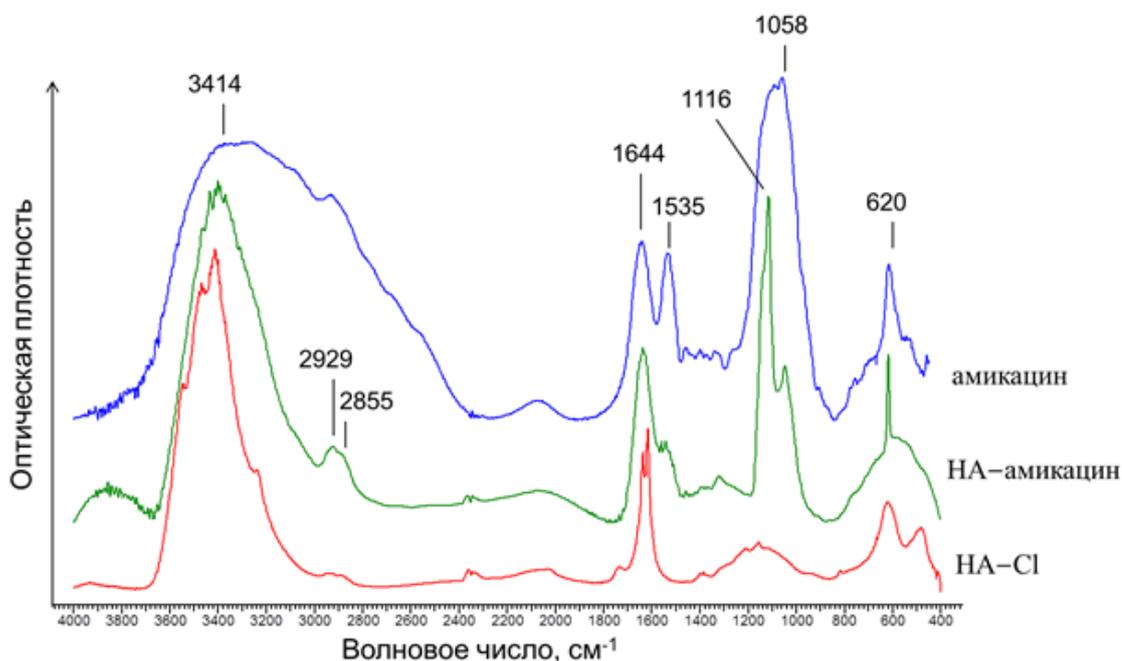
**Рисунок 59.** Схема прививки амикацина на ДНА.

Предварительно исходный ДНА подвергали газофазному гидрированию. Затем часть С–Н групп на его поверхности путем хлорирования заменили на группы С–Cl. Ковалентная прививка амикацина была осуществлена путем взаимодействия его аминогруппы с поверхностными атомами хлора.

На Рис. 60 приведена микрофотография ПЭМ конъюгата ДНА-амикацин. На Рис. 61 приведены ИК-спектры амикацина, хлорированного ДНА и ДНА с привитым амикацином.



**Рисунок 60.** Микрофотография ПЭМ конъюгата ДНА-амикацин



**Рисунок 61.** ИК-спектры хлорированного ДНА, ДНА-амикацин и нативного амикацина.

В ИК-спектре хлорированного ДНА по сравнению с гидрированным ДНА уменьшается интенсивность полос поглощения в области 2850-2950  $\text{см}^{-1}$  и появляется полоса при 1730  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая колебаниям  $>\text{C}=\text{O}$  группы. Последняя образуется при воздействии на ДНА хлорноватистой кислоты, которая получается при взаимодействии хлора с поверхностными гидроксильными группами ДНА. В ИК-спектре ДНА с привитым амикацином появились интенсивные полосы поглощения при 1116 и 1058  $\text{см}^{-1}$ , соответственно. Они могут быть отнесены соответственно к ассиметричным валентным колебаниям эфирных связей  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  и валентным колебаниям гидроксильных групп амикацина,  $\nu$  свободного (нативного) амикацина в этом диапазоне наблюдается интенсивная полоса поглощения, которая, к тому же, может быть обусловлена поглощением сульфат-ионов (коммерческий амикацин находился в виде сульфата). Кроме того, в ИК-спектре модифицированного амикацином ДНА появляется характерная для амикацина полоса поглощения при 1535  $\text{см}^{-1}$ . Данные ИКС свидетельствуют о прививке амикацина на поверхность ДНА. Количество привитого амикацина было оценено по ИК-спектрам. Для этого использовали калибровочные кривые зависимости интенсивности сигнала от массы амикацина в таблетке с КВг для полос 620, 1058, 1106 и 1535  $\text{см}^{-1}$ . Более точная оценка проведена методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией амикацина. Найдено, что плотность прививки амикацина составляет 0,7 молекул/ $\text{нм}^2$  [150].

### 3.5.3.2. Конъюгат ДНА-янтарной кислоты

Синтез конъюгата ДНА с поверхностными гидроксильными группами через образование сложноэфирной связи с интермедиатом цикла Кребса янтарной кислотой осуществили по её карбоксильной группе [358]. С этой целью был получен ДНА с повышенной концентрацией гидроксильных групп на поверхности. Для этого исходный ДНА был жидкофазно окислен, образовавшиеся карбоксильные группы были восстановлены алюмогидридом лития до гидроксильных. Элементный анализ методом РЭС показал отсутствие примесей лития и алюминия в полученных образцах ДНА [150]. Схема получения конъюгата ДНА-янтарная кислота представлена на Рис. 62.

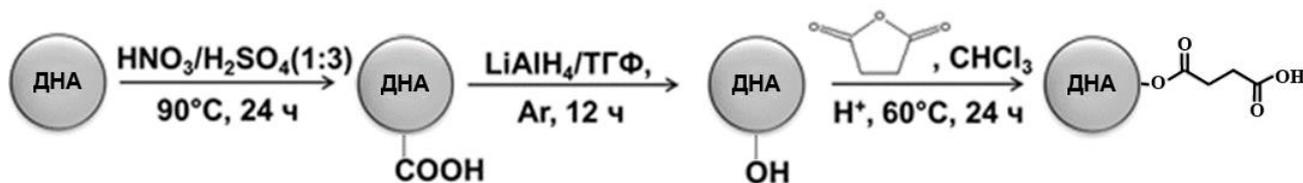
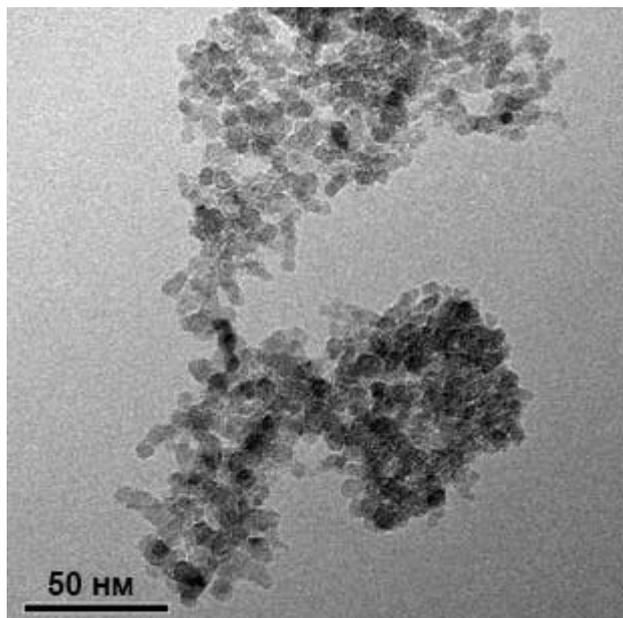
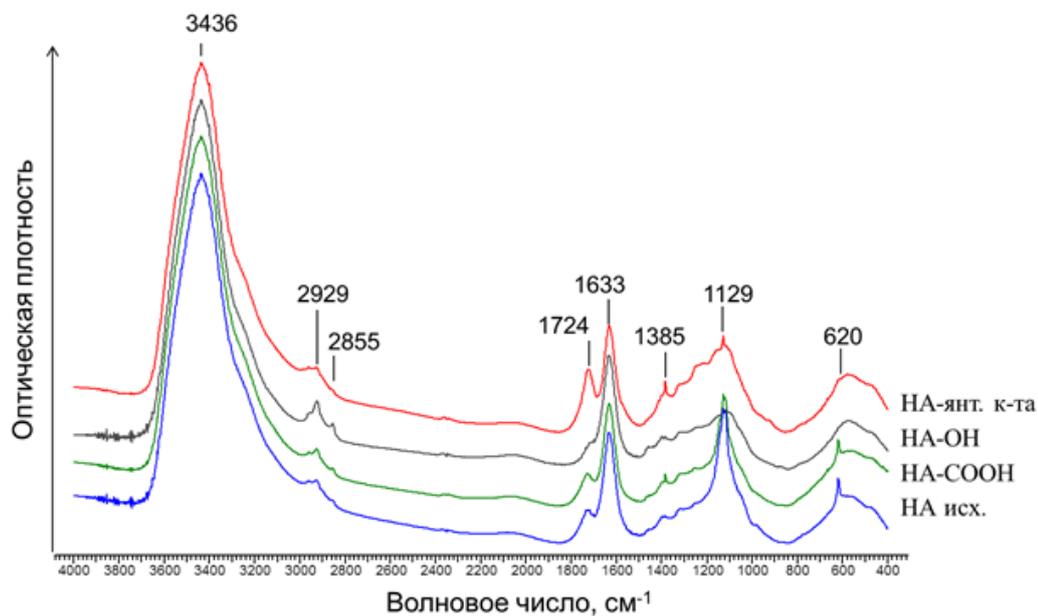


Рисунок 62. Схема получения конъюгата ДНА-янтарная кислота.

Микрофотографии ПЭМ конъюгата ДНА-янтарная кислота представлены на Рис. 63. ИК-спектры ДНА на всех стадиях модифицирования представлены на Рис. 64.



**Рисунок 63.** Микрофотография ПЭМ конъюгата ДНА-янтарная кислота.



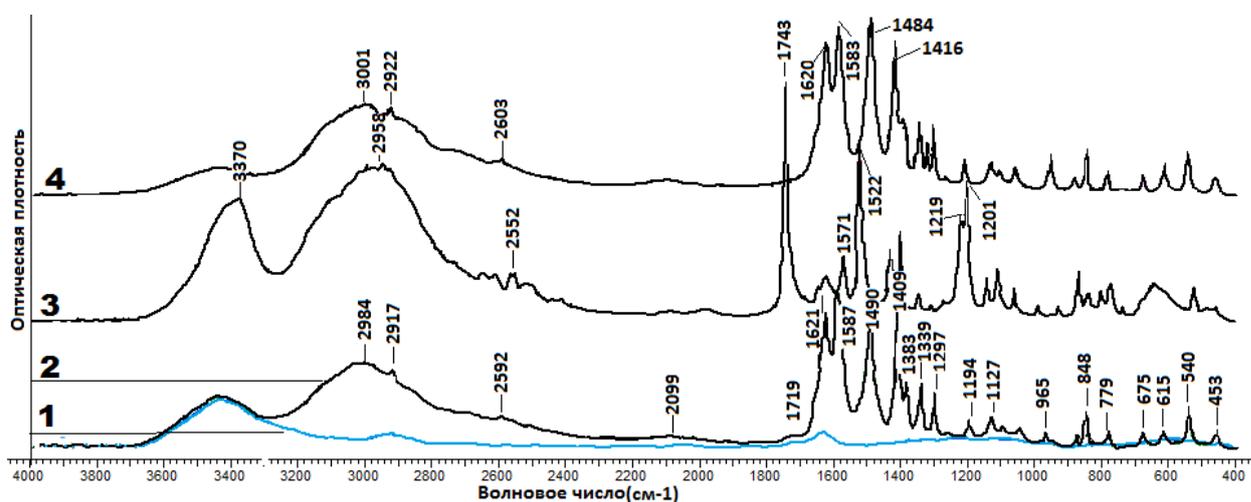
**Рисунок 64.** ИК-спектры ДНА исходного и модифицированных в процессе синтеза конъюгата ДНА-янтарная кислота.

Из приведенных на Рис. 64 ИК-спектров видно, что при жидкофазном окислении образца исходного ДНА смесью азотной и серной кислот заметных изменений не происходит, за исключением снижения интенсивности пика при  $1129\text{ см}^{-1}$ . Это может быть связано с удалением

части сульфат-ионов в процессе отмывки ДНА-II от кислоты после реакции. Карбоксильные группы на поверхности ДНА проявляются полосой поглощения в ИК-спектре при  $1724\text{ см}^{-1}$ . В результате реакции карбоксильные группы восстанавливаются до гидроксильных, о чем свидетельствует заметное снижение поглощения при  $1724\text{ см}^{-1}$ . В то же время заметно снижается интенсивность поглощения при  $1129\text{ см}^{-1}$ , что можно объяснить уходом сульфат-ионов с поверхности ДНА. О прививке янтарной кислоты к поверхности ДНА можно судить по существенному возрастанию поглощения при  $1724\text{ см}^{-1}$  за счет увеличения количества карбонильных групп, входящих в состав второй  $-\text{COOH}$  группы янтарной кислоты [150].

### 3.5.3.3. Конъюгат ДНА-цистеин

Прививку цистеина в сравнительном аспекте осуществляли на разных марках ДНА. В качестве прививаемого вещества был выбран гидрохлорид этилового эфира L-цистеина, наличие серы в котором позволит легко и надежно определить степень прививки к каждому образцу ДНА. Так как прививка к поверхности НА могла пройти не только с образованием C-S связи на поверхности НА, а также по аминогруппе, так и по карбоксильной группе, последние защитили гидрохлоридом и этиловым эфиром, соответственно, проведя реакцию этерификации (см. раздел 2.4.4). Ковалентная прививка этилового эфира L-цистеина оценивалась с помощью методов ИК-спектроскопии и РФЭС. ИК-спектры хлорированного образца I, цистеина, S-метилцистеина и образца I, модифицированного гидрохлоридом этилового эфира L-цистеина представлены на рис. 15.

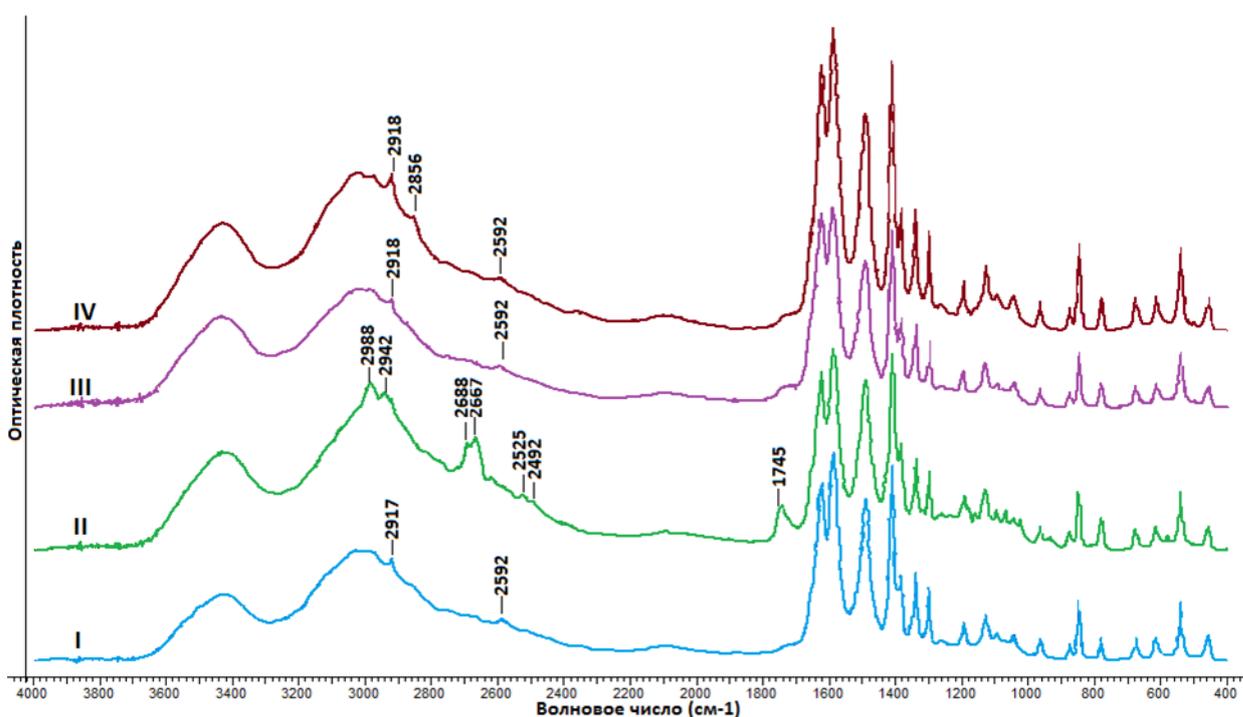


**Рисунок 65.** ИК-спектры: 1 - хлорированный ДНА I, 2 - ДНА I, модифицированный гидрохлоридом этилового эфира L-цистеина, 3 – гидрохлорид L-цистеина, 4 – S-метилцистеин

Для доказательства прививки этилового эфира L-цистеина на хлорированную поверхность НА, мы сравнили полученный спектр 2 со спектрами чистого S-метилцистеина

(спектр 4), цистеина (спектр 3) и хлорированного образца I (спектр 1). Из рис. 65 видно, что спектры хлорированных образцов ДНА и после ковалентной прививки сильно различаются. В спектре модифицированного образца I отсутствует полоса поглощения при  $2552\text{ см}^{-1}$ , которая имеется в спектре гидрохлорида L-цистеина и отвечает колебания S–H связи. Однако, в спектре модифицированного образца I присутствует полоса поглощения  $2952\text{ см}^{-1}$ , которая, очевидно, обусловлена колебаниями связи C–S (в спектре S-метилцистеина -эта полоса имеет максимум при  $2603\text{ см}^{-1}$ ). Это показывает, что на поверхности ДНА ковалентно привился этиловый эфир L-цистеина с образованием C-S связи.

ИК-спектры всех образцов НА с ковалентно привитым этиловым эфиром L-цистеина приведены на рис. 66.



**Рисунок 66.** ИК-спектры разных марок ДНА с привитым цистеином.

Из полученных спектров видно, что образец II отличается от всех остальных образцов, присутствием полос поглощения с максимумами  $2688$  и  $2525\text{ см}^{-1}$ . В первую очередь, можно предположить, что часть L-цистеина прочно сорбирована на поверхности образца II, так как полоса поглощения с максимумом  $2525\text{ см}^{-1}$  соответствует колебаниям S–H связи.

Для оценки степени прививки по содержанию S в образцах использовали метод РФЭС (Табл. 32). Из Табл. 32 видно, что для I и II образцов зафиксировано наибольшее количество серы. В то время как для образцов III и IV серы в 1,5 раза меньше. Таким образом, по количеству обнаруженной серы в образцах ДНА можно однозначно судить о её ковалентной прививке цистеина ко всем образцам ДНА.

Таблица 32. Элементный состав модифицированных образцов (по данным РФЭС)

Образец ДНА	Содержание элементов, ат. % (нормировано на С, О, N, Cl, S)				
	С	О	N	Cl	S (масс. %)
I	64,2	22,0	7,2	0,6	6,0 (13,3)
II	68,0	18,8	7,0	1,0	5,2 (11,7)
III	72,2	18,1	5,4	0,6	3,7 (8,6)
IV	72,6	19,0	4,7	0,5	3,2 (7,5)

#### 3.5.3.4. Конъюгаты ДНА с протеолитическими ферментами

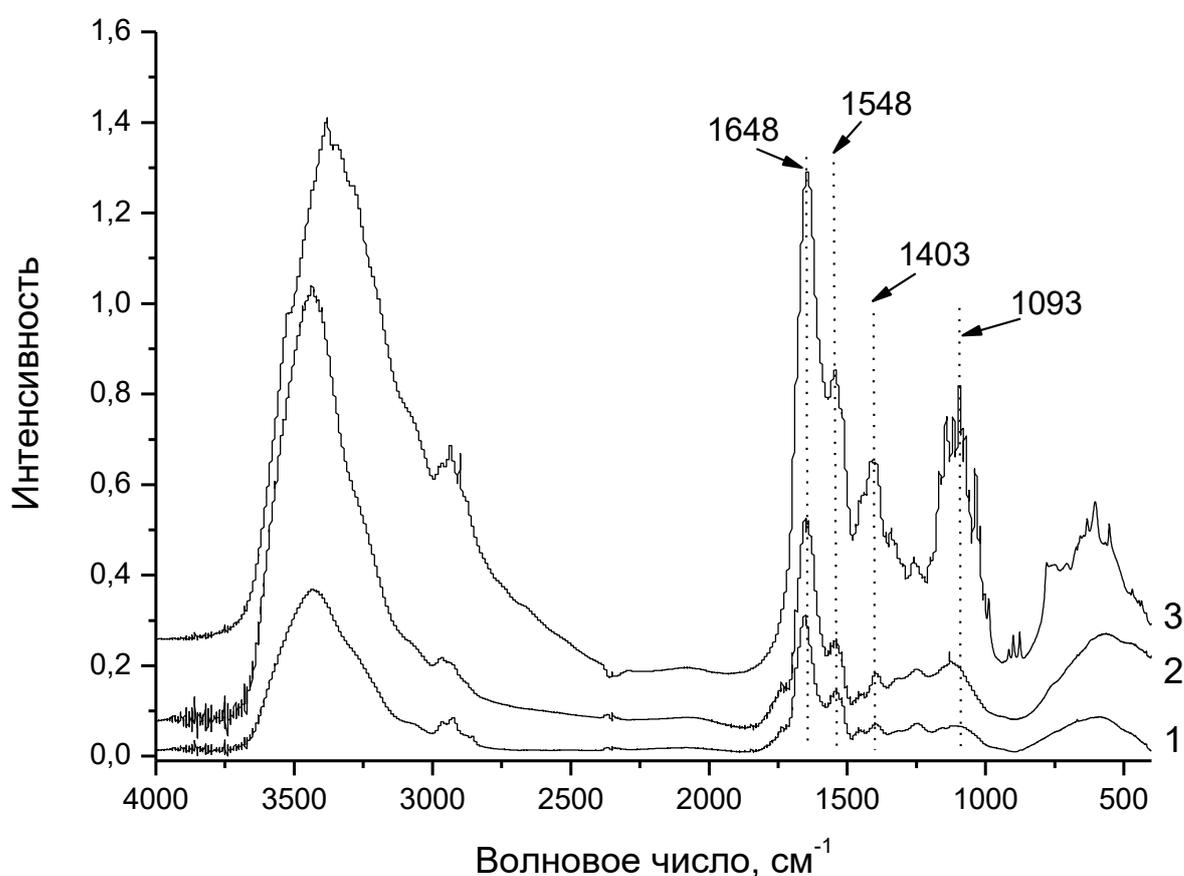
Результаты ВЭЖХ-аминокислотного анализа (Табл. 33), показывают наличие ферментов в образующихся конъюгатах и отсутствие их разрушения в процессе синтеза. Все ферменты сохраняли свой состав и соотношение аминокислот. Включение протеиназ при их иммобилизации на наноалмазе определяли по результатам аминокислотного анализа. Содержание иммобилизованного на ДНА трипсина, папаина и химотрипсина составило 24,0, 7,0 и 7,4% масс., соответственно (Табл. 33).

Таблица 33. Результаты аминокислотного анализа образцов конъюгатов ДНА с иммобилизованными протеолитическими ферментами.

Обнаруженные аминокислоты	Молярная масса, г/моль	Количество аминокислот в пробе ДНА-трипсин, мкг	Количество аминокислот в пробе ДНА-папаин, мкг	Количество аминокислот в пробе ДНА-химотрипсин, мкг
Asp	133,1	1,47	1,63	1,72
Thr	119,1	0,49	0,74	1,12
Ser	105,1	1,33	0,86	1,64
Glu	147,1	1,08	2,64	1,62
Pro	115,1	0,31	0,77	1,14
Gly	75,1	0,96	1,27	1,20
Ala	89,1	0,74	0,81	0,98
Val	117,1	1,04	1,16	1,33
Met	149,2	0,13	0,05	0,21
Ile	131,2	0,92	0,60	0,45
Leu	131,2	1,10	0,99	0,87
Tyr	181,2	1,27	1,71	0,37
Phe	165,2	0,32	0,62	0,48
Lys	146,2	0,90	1,36	0,67
His	155,2	0,37	0,25	0,09

Arg	174,2	0,14	0,92	0,09
Масса аминокислот, мкг	–	12,6	16,4	14,0
Навеска образца ДНА с иммобилизованным папаином, мкг	–	52,5	220,0	220,0
Содержание фермента в образце, %	–	<b>24</b>	<b>7,0</b>	<b>7,4</b>

На рис. 67 представлены ИК-спектры образцов ДНА с иммобилизованными на них ферментами трипсином, папаином и химотрипсином.



**Рисунок 67.** ИК-спектр образцов ДНА с иммобилизованным: 1 - трипсином, 2 – папаином; 3 - химотрипсином.

По сравнению с ИК-спектром карбоксилированного ДНА, который являлся исходным для иммобилизации образцом, в ИК-спектре образцов ДНА с иммобилизованными ферментами появляются: полоса средней интенсивности с максимумом при 1548 см<sup>-1</sup> и слабые сигналы с максимумами при 1403 и 1093 см<sup>-1</sup>, соответственно. Максимум при 1630 см<sup>-1</sup>, смещается в

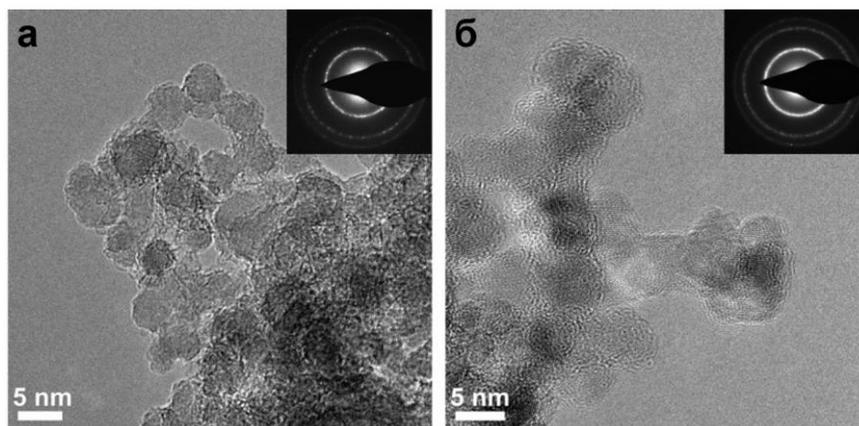
область  $1648\text{ см}^{-1}$ , что связана с колебаниями пептидных связей белкового остова: C=O, C–N валентные колебания и N–H поперечные колебания. Максимум при  $1548\text{ см}^{-1}$  соответствует N–H деформационным колебаниям, а максимум при  $1403\text{ см}^{-1}$  – C–N валентным колебаниям, которые проявляются при  $1200\text{--}1400\text{ см}^{-1}$  [359]. Появившийся наклон интенсивного максимума при  $3500\text{--}3400\text{ см}^{-1}$ , имеющийся у карбоксилированного ДНА, в более низкочастотную область может свидетельствовать о наличии валентных колебаний N–H [359].

**Вывод.** В работе была осуществлена иммобилизация протеолитических ферментов на поверхности ДНА. Образцы ДНА, модифицированных ферментами, были охарактеризованы методом ИКС. Методом ВЭЖХ - анализа для них доказан аминокислотный состав, идентичный нативным ферментам. Содержание иммобилизованного на ДНА трипсина, папаина и химотрипсина составило 24,0, 7,0 и 7,4 % масс., соответственно.

### 3.5.3.5. Конъюгат ДНА-пирофосфатаза

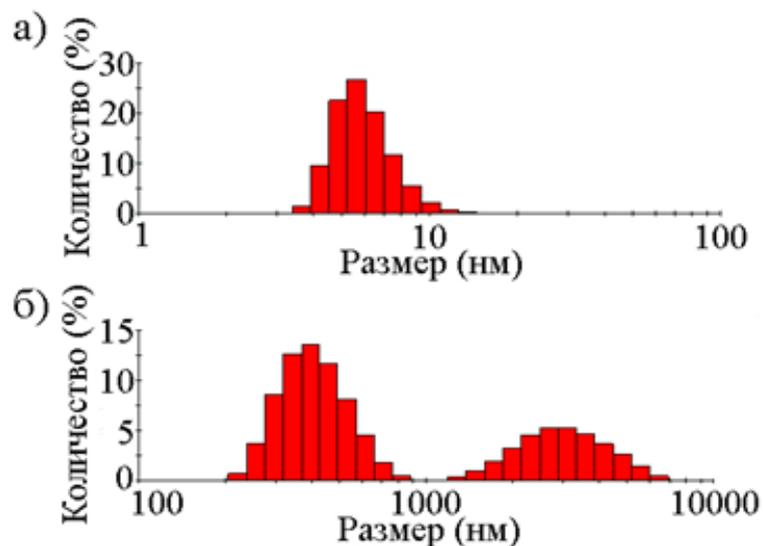
Анализ молекулярной поверхности РРазы показывает, что на ней расположено большое число аминокислотных групп, которые могут быть использованы для ковалентной пришивки к твёрдым матрицам. Для пришивки по аминокислотным группам стандартной является методика с использованием диальдегидов с разной длиной цепи, образующих основание Шиффа. Реакция осуществляется в мягких условиях, не разрушающих ферменты, и полученные сшивки впоследствии могут быть восстановлены для более прочного связывания, но и без восстановления при нейтральных pH они достаточно прочные. В качестве диальдегидного реагента нами был выбран глутаровый альдегид, стандартно используемый для этой цели. Анализ молекулярной поверхности РРазы показывает, что на ней расположено большое число аминокислотных групп, которые могут быть использованы для ковалентной пришивки к поверхности ДНА [360].

Количество пришитого фермента составило  $0,81 \pm 0,05$  мг на 1 мг ДНА, что определено по разности концентрации фермента в супернатанте до и после синтеза (при учете концентрации фермента в промывочной жидкости) [182]. Образцы иммобилизованной РРазы на ДНА имели большой средний размер частиц (до 1  $\mu\text{м}$ ) и отрицательный  $\zeta$ -потенциал. Если провести расчет при предположении, что все частицы ДНА имеют размер 4,2 нм и содержат 7000 атомов углерода, из которых 1000 атомов (15%) находятся на поверхности, то на 2 частицы ДНА садится 1 молекула РРазы. Взаимное положение ДНА и фермента частиц в этом материале можно сравнить с булочкой с изюмом, где изюм (ДНА) составляет около 50%. Электронная микрофотография ПЭМ ДНА до и после иммобилизации РРазы представлено на Рис. 68.



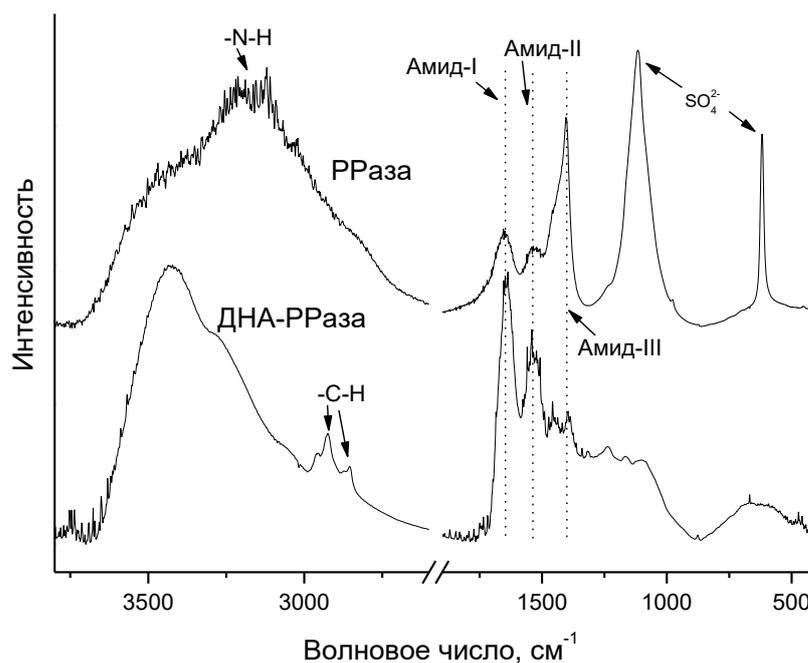
**Рисунок 68.** Микрофотография ПЭМ частиц ДНА до (а) и после (б) иммобилизации РРазы.

Так как молекула белка, в основном, состоит из углерода и других элементов с аналогичными атомными зарядами, электронные свойства ДНА и белка весьма близки и их трудно отличить с помощью ПЭМ. Тем не менее, выраженное различие можно наблюдать в поверхностном слое частиц. Непосредственно частицы определяются благодаря узкому слою неупорядоченной материи, соответствующей, скорее всего, аморфному углероду. Кристаллическая природа, типичная для ядра наноалмаза, видна по дифрактограмме, показанной в качестве вставки. После иммобилизации РРазе (Рис. 68,б) частицы ДНА сохраняют кристаллическую основу, но план становится размытым, что, очевидно, связано с толстым слоем неупорядоченной органической фазы на поверхности, включающей белковые молекулы. Можно предположить, что белковая молекула после иммобилизации сохраняет, по крайней мере, частично способность к нековалентной адсорбции и служит звеном, соединяющим частицы ДНА, приводя к материалу типа «булочка с изюмом». Это подтверждается существенным увеличением размера системы ДНА-РРазы по данным ДРС (Рис. 69). При этом было показано, что  $\zeta$ -потенциал нативной РРазы изменяется с  $+30 \pm 4$  мВ до  $-19 \pm 3$  мВ для иммобилизованной [361].



**Рисунок 69.** Данные ДРС для образцов: а) нативной РРазы; б) РРазы, иммобилизованной на ДНА.

ИК-спектр РРазы до и после иммобилизации на ДНА представлен на Рис. 70.



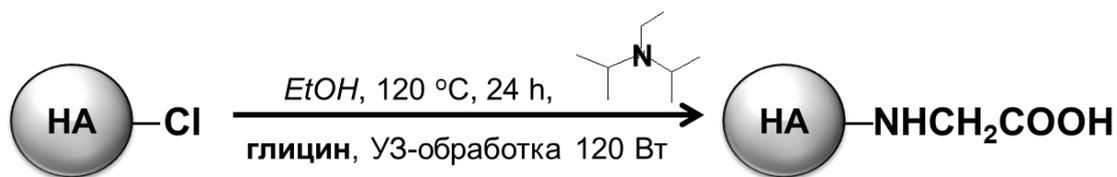
**Рисунок 70.** ИК-спектры нативной (сверху) и иммобилизованной РРазы (внизу).

Наиболее характеристическими полосами в ИК-спектре РРазы как и других белков являются максимумы, соответствующие амидным колебаниям [359]. Эти максимумы возникают из-за колебаний пептидных связей белкового остова: C=O, C-N валентные колебания и N-H поперечные колебания («амид-I» полосы при 1600–1700 см<sup>-1</sup>); N-H деформационные колебания

(«амид-II» полосы при 1510–1580  $\text{cm}^{-1}$ ); и C–N валентные колебания («амид-III» полосы при 1200–1400  $\text{cm}^{-1}$ ) [359]. После химической иммобилизации РРазы на ДНА полученная система ДНА-РРазы сохраняет основные характеристические максимумы белков: амид I (1630  $\text{cm}^{-1}$ ), амид-II (1541  $\text{cm}^{-1}$ ), амид-III (1400  $\text{cm}^{-1}$ ), что позволяет предположить успешную иммобилизацию РРазы на поверхности ДНА. Новый широкий максимум вблизи 3250–3150  $\text{cm}^{-1}$  также может быть связан с валентными колебаниями N–H [359]. Максимумы нативной РРазы при 1100 и 613  $\text{cm}^{-1}$ , соответственно, относятся к сульфат-аниону, поскольку белок хранили в растворе сульфата аммония, который отмывается не полностью. Все образцы содержали гидроксильные группы, о чём свидетельствуют полосы при 3450 и 1630  $\text{cm}^{-1}$ , соответствующие –ОН валентным колебаниям. Однако, спектральные полосы гидроксильных групп свободной воды, лежащие в тех же спектральных диапазонах 1630 и 3450  $\text{cm}^{-1}$ , соответственно, могут усложнить определение. Все амидные частоты чувствительны к конформации белка. Два широких пика с максимумами при 3220 и 3120  $\text{cm}^{-1}$ , наблюдаемые для нативной РРазы, не разрешаются в спектре иммобилизованной РРазы и объединяются в один пик с максимумом при 3260  $\text{cm}^{-1}$ . Известно, что поверхностно-связанный белок может изменить свою конформацию при адсорбции на хорошо структурированной твёрдой матрице, например, такой как ДНА [166]. Слияние этих двух максимумов можно отнести к некоторой конформационной перестройке РРазы, вызванной её иммобилизацией на ДНА [182].

### 3.5.3.6. Конъюгат ДНА-глицин

Глицин является простейшей ахиральной аминокислотой и может быть ковалентно закреплен на поверхности ДНА двумя способами – за аминогруппу и за карбоксильную группу. В работе была разработана оригинальная методика, в которой атомы хлора хлорированного ДНА в присутствии основания Хунига (N,N-диизопропилэтиламин) замещались на аминогруппы молекул глицина (Рис. 71) [150, 153, 151, 152].



**Рисунок 71.** Схема прививки глицина на ДНА.

Полученный конъюгат был охарактеризован методом РФЭС (Табл. 34). Как видно из данных Табл. 34, происходит существенное увеличение содержания азота на поверхности ДНА, что свидетельствует о прививке глицина на поверхность ДНА. По базам NIST [362] атом N 1s в

молекуле свободного глицина характеризуется энергиями связи 400,6 и 398,7 эВ. В конъюгате эта энергия оказалось равна 399,6 эВ, что соответствует среднему значению.

Таблица 34. Данные РФЭС конъюгата ДНА-глицин.

Наименование характеристики	Химические элементы		
	C	O	N
Атомные %,	80,1±0,1	11,5±0,1	8,4±0,1
Энергии связи, эВ	285,2±0,5	530,7±0,5	399,6±0,5

На микрофотографиях ПЭМ конъюгата ДНА-глицин в отличии от всех остальных образцов была зафиксирована оболочка вокруг частиц, которая имела размеры не более 1 нм. По-видимому, это может свидетельствовать о большей доле глицина, включенного в конъюгат (Рис. 72).

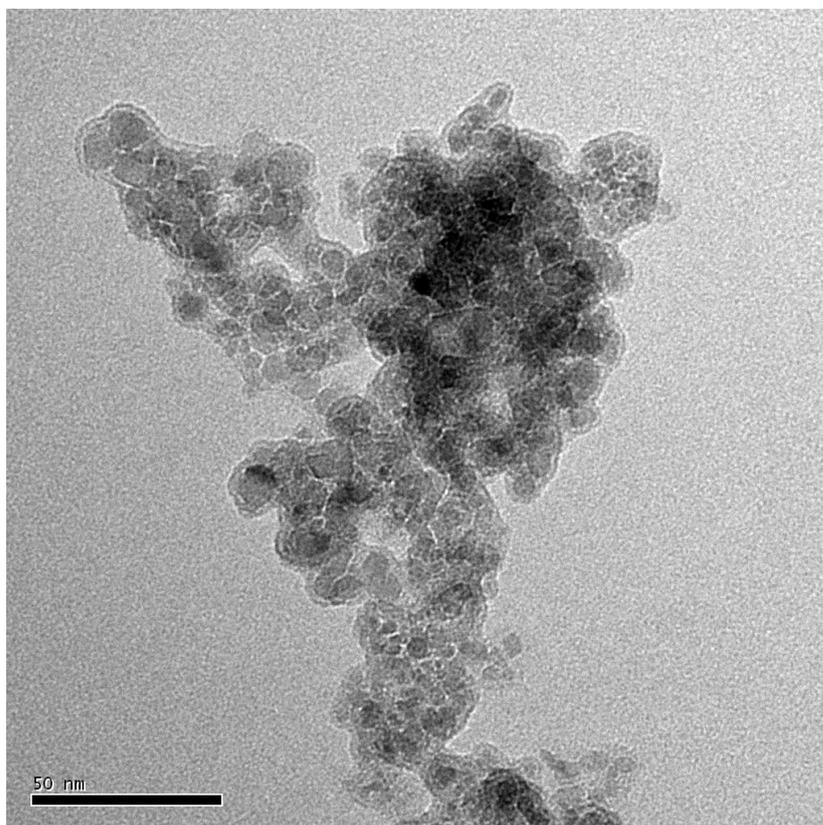
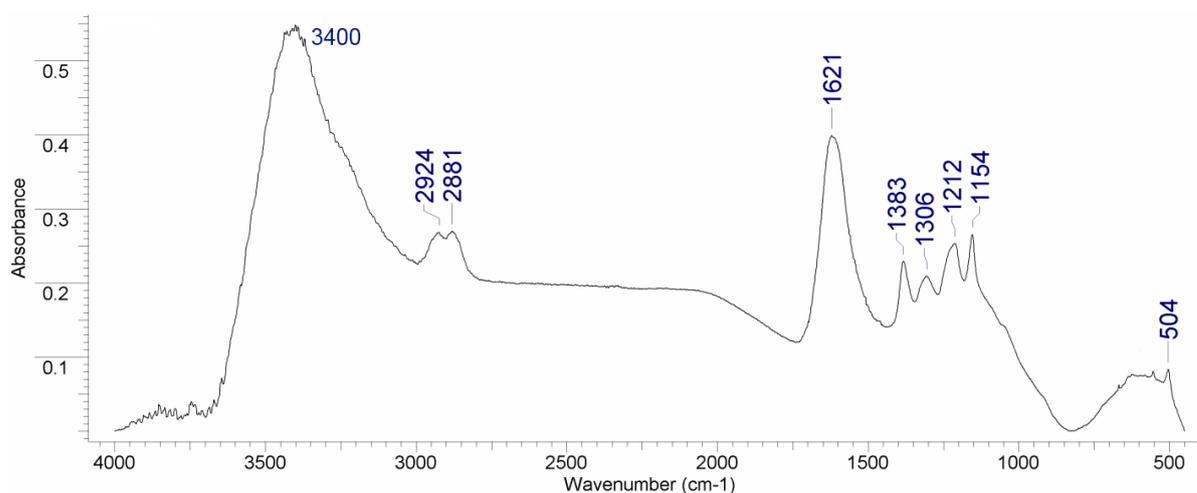


Рисунок 72. Микрофотография ПЭМ конъюгата ДНА-глицин.

На ИК-спектре конъюгата ДНА-глицин (Рис. 73) присутствуют: интенсивная широкая полоса с максимумом  $3400\text{ см}^{-1}$ , сильный сигнал при частоте  $1621\text{ см}^{-1}$ , шесть полос средней интенсивности при  $2924$ ,  $2881$ ,  $1383$ ,  $1306$ ,  $1212$  и  $1154\text{ см}^{-1}$ , соответственно, и слабый характеристический сигнал при  $504\text{ см}^{-1}$  [151]. Спектр имеет максимумы при  $1383$ ,  $1306$ ,  $1212$  и

1154  $\text{cm}^{-1}$ , соответствующие максимумам исходной аминокислоты глицина, которые из-за образования ковалентной связи с поверхностью ДНА сместились в область 1400–1100  $\text{cm}^{-1}$ .



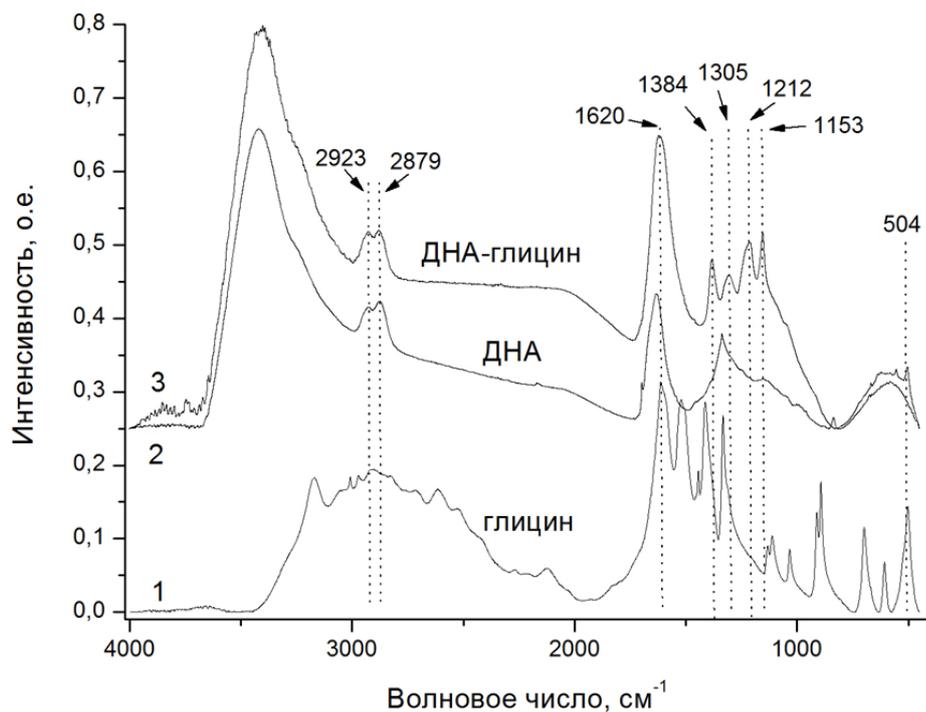
**Рисунок 73.** ИК-спектр конъюгата ДНА-глицин.

### 3.5.4. Особенности взаимодействия глицина с поверхностью ДНА

В качестве метода исследования кристаллических веществ часто используется метод ИКС. Особенно это характерно для исследования поверхности твердых тел. ИКС является одним из наиболее информативных аналитических методов для изучения привитых слоев на поверхности твердых тел [101]. Поэтому с помощью ИКС подробнее рассмотрим особенности прививку глицина на поверхность ДНА. Это связано с тем, что только привика на поверхность ДНА глицина в отличие от других биологически активных веществ (амикацин, янтарная кислота, ферменты) обнаружила существенное изменение колебаний связи привитой молекулы, что характерично проявилось на ИК-спектре конъюгата.

Основные изменения ИК-спектра касаются области 1400-1100  $\text{cm}^{-1}$ , в которой присутствуют 4 пика конъюгата ДНА-глицин – 1384, 1305, 1212, 1153  $\text{cm}^{-1}$ , соответственно (Рис. 73). При этом данные максимумы отсутствуют на спектрах исходных веществ-компонентов – глицина и ДНА. Пики являются уширенными, что согласуется с уширением пиков в ИК-спектре привитых веществ [101], и имеют разный наклон плеча, что указывает на их сложное строение и объединение нескольких близлежащих максимумов в один.

Максимум поглощения при 1630  $\text{cm}^{-1}$ , отвечающий колебаниям –ОН групп, в конъюгате ДНА-глицин по сравнению с исходным ДНА смещается в область 1620  $\text{cm}^{-1}$ , что совпадет с максимумом поглощения в глицине. Также в спектре ДНА-глицин можно выделить слабый максимум при 504  $\text{cm}^{-1}$ , который совпадает с максимум свободного глицина. Поглощения в других областях конъюгата ДНА-глицин идентичны поглощению ДНА (Рис. 74).



**Рисунок 74.** ИК-спектры поглощения: 1 – глицина; 2 – ДНА; 3 – конъюгата ДНА-глицин.

Таким образом, можно сделать **вывод**, что при прививке глицина на поверхность ДНА колебания связей в молекуле глицина существенно изменяются по сравнению с самой молекулой глицина. Как показано на химических и фармакологических моделях *in vitro* и *in vivo* (Разделы 3.8 и 4.5), активность конъюгата ДНА-глицин также значительно изменяется по интенсивности и спектру своего фармакологического действия по сравнению с нативным глицином и ДНА.

При этом можно предположить несколько процессов, приводящим к таким качественным и количественным изменениям: образование новой, более активной полиморфной формы глицина на поверхности ДНА, полимеризация глицина или образование новой супрамолекулярной структуры, состоящей из ядра ДНА и поверхностных молекул глицина и обладающей свойствами нового вещества с присущим только ему оригинальными как химическими и физико-химическими, так и фармакологическими свойствами. Рассмотрим эти варианты.

Ни в каталогах, ни на упаковке товарных реактивов глицина (как нативного вещества, так и в составе многокомпонентных лекарственных форм) не указывается, какие полиморфные модификации глицина присутствуют в каталожном образце. В описании использованного в работе глицина также не была указана его полиморфная форма. Если воспользоваться данными об ИК-спектрах трех известных в литературе  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ - полиморфных модификаций глицина [363] (Табл. 35), то на основе сравнительного анализа этих спектров и ИК-спектра конъюгата ДНА-глицин (Рис. 74) можно предположить, что использованная в работе исходная

аминокислота представляла собой широко распространенную  $\alpha$ -модификацию глицина. Однако, по данным [364], известно, что только  $\gamma$ -форма глицина проявляет повышенную биологическую активность по сравнению с  $\alpha$ -формой.

Как видно из Табл. 35, полосы поглощения в ИК-спектре всех полиморфных форм глицина не соответствуют новым максимумам в спектре ДНА-глицин, приведенном на Рис. 74. Следовательно, изменение колебаний связи, показанных на ИК-спектре привитого на поверхность ДНА глицина, не связано с изменением или образованием его полиморфной формы.

Второй вариант – полимеризация глицина в процессе реакции, - может быть также изучен сравнительным анализом ИК-спектров конъюгата ДНА-глицин и олигомерных форм глицина. В разделе 1.8.2.1 проведено подробное сравнение ИК-спектров форм полиглицина с ИК-спектрами конъюгатов ДНА-глицин, полученных в работах [120, 218], которое выявило наличие на поверхности ДНА в его конъюгате с глицином олигомера - гексаглицина II. Характеристические пики в ИК-спектре конъюгата ДНА-глицин, полученного нами в работе, в области  $1400-1100\text{ см}^{-1}$  не совпадают ни с одним из пиков ИК-спектра олигомеров глицина. Условия получения конъюгата ДНА-глицин ( $T = 78-80^\circ\text{C}$ ) также не способствуют полимеризации глицина. Следовательно, при осуществленной нами прививке глицина на поверхность ДНА, олигомеры последнего не образуются.

Таблица 35. Соотнесение полос поглощения в ИК-спектрах полиморфных модификаций глицина [363].

Полиморфная модификация глицина		
$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Волновое число, $\text{см}^{-1}$		
3165	3188	3100
3007	3006	2999
2969	2969	2962
2128	2136	2172
1611	1655	1663
-	-	1632
1584	1606	1580
1526	1562	
1513	1543	1496
1503	1526	
1444	1445	1437
1414	1416	1397
1333	1336	1336
1314	-	1326
1132	1135	1155
1112	1120	1129
1034	1041	1044
911	916	930
893	894	892
702	704	686

Третий вариант – образование новой межмолекулярной структуры, связывающей ДНА с глицином в единую супрамолекулу [365], удобно рассмотреть на ближайших аналогах ДНА. Из литературного обзора следует, что на поверхности ДНА помимо атомов С, находящиеся в  $sp^3$ -гибридизации, могут находиться фуллереноподобные каркасы, состоящие из  $sp^2$ -углерода, к которым может также идти прикрепление веществ [83]. Поэтому при рассмотрении ИК-спектральных характеристик супрамолекулы конъюгата ДНА-глицин может быть полезным рассмотрение ряда модельных соединений, или аналогов конъюгата ДНА-глицин.

Например, таким модельным веществом может являться N-фенилглицин, у которого один атом водорода при азоте замещен на некую жестко-каркасную структуру, в данном случае, – простейшую – фенил. Так, в ИК-спектре N-фенил-аминоуксусной кислоты, в которой один атом водорода заменен на фенильный радикал, в области  $1400\text{-}1100\text{ см}^{-1}$  находятся следующие максимумы: 1386, 1327, 1315, 1301, 1234, 1189, 1040, 1008 и  $1001\text{ см}^{-1}$ , соответственно [366]. Колебательные максимумы в другой области не рассматриваем, так как максимумы глицина в его конъюгате с ДНА не проявляются в других частотных интервалах. В ИК-спектре конъюгата ДНА-глицин (Рис. 75) максимумы поглощения в этой области находятся при 1384, 1305, 1212,  $1153\text{ см}^{-1}$ , соответственно. В отличие от характеристичных максимумов глицина, которые не совпадают с максимумами в ИК-спектре конъюгата ДНА-глицин, сравнение последнего с максимумами фениламиноуксусной кислоты дает близкое совпадение, по крайней мере, 3 из 4 пиков.

Если рассматривать ближайший структурный аналог наноалмаза – фуллерен, то деформационные колебания  $\text{C}=\text{O}$  связи в карбоксильной группе глицина отвечают максимуму при  $1404\text{ см}^{-1}$ , а в аддукте  $\text{C}_{60}$ -глицин – максимумам при 1399 и  $1225\text{ см}^{-1}$ , соответственно [211]. При учете смещения в  $10\text{-}20\text{ см}^{-1}$  в более длинноволновую область, которое может быть связана с различием в структуре/массе ДНА и фуллерена, эти частоты совпадают с полосами в ИК-спектре конъюгата ДНА-глицин, в котором присутствуют максимумы при 1384 и  $1212\text{ см}^{-1}$ , соответственно.

В работе [212] были построены расчетные ИК-спектры фуллерена  $\text{C}_{24}$  с ковалентно присоединенной через атом азота молекулой глицина. Авторами отмечается наличие интенсивного максимума при  $1183\text{ см}^{-1}$ , отвечающего колебаниям  $\omega$  ( $\text{CH}_2$ ),  $\alpha$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ ) в карбоксильной группы. Также в области  $1400\text{-}1100\text{ см}^{-1}$  присутствуют максимумы при 1401, 1372, 1353 и  $1241\text{ см}^{-1}$ , соответственно. Этот расчетный спектр также близок к спектру конъюгата ДНА-глицин при учете в последнем наличия «размытых» широких максимумов.

Элементарной структурной ячейкой алмазной решетки является адамантан, следовательно, его также можно рассматривать как модельное соединение. Известно присоединение адамантильного радикала к разным аминокислотам, в том числе, глицину [367].

При этом, наряду с глицином и сам адамантовый радикал тоже является фармакофорным центром. Было показано [368], что в результате введения адамантового фрагмента в структуру вещества наблюдается пролонгирование фармакологических эффектов исследуемых БАВ, повышается их устойчивость к метаболическим превращениям в организме и изменяется характер взаимодействия с рецепторами мембран [369, 370]. Следовательно, введение адамантового фрагмента в молекулу ЛВ может усиливать или приводить к появлению новых видов биологической активности [367].

Аналогичный эффект обнаружен нами в случае гетерогенного взаимодействия наночастицы с молекулой ЛВ, в частности, при ковалентной прививке глицина к поверхности ДНА. В этом случае, по данным ИКС и результатам химико-биологических экспериментов, значительно меняются характеристики иммобилизованной аминокислоты, прежде всего, интенсивность и спектр специфической активности. Для объяснения этого явления нами предложена рабочая гипотеза, что при ковалентном связывании частицы ДНА с молекулой глицина происходит обобществление их электронных структур – молекулярных электростатических потенциалов (МЭП). Образуется новая молекулярная структура – супрамолекула конъюгата ДНА с глицином - с новым обобщенным МЭП, проявляющая новые физико-химические, химические и биологические свойства. Исходя из представлений молекулярной фармакологии, это явление расширения спектра и интенсивности фармакологического действия ЛВ при его иммобилизации на поверхность ДНА обозначено рабочим термином «эффект амплификации модифицирующей активности биологически активных веществ» (эффект АМАБАВ) [371].

**Вывод.** В работе впервые получен не содержащий атомов фтора конъюгат ДНА с лекарственным веществом – аминокислотой глицином, проявляющий свойство расширения спектра и усиления фармакологического действия ЛВ при его иммобилизации на поверхность ДНА - «амплификации модифицирующей активности БАВ» (эффект АМАБАВ), подтвержденный исследованием активности конъюгата на химической модели *in vitro* и биологических моделях *in vitro* и *in vivo*, механизм которого предположен на основании данных ИКС.

### 3.6. Способы визуализации ДНА

В работе были разработаны три способа визуализации частиц ДНА (мечение тритием, ковалентное связывание рентгеноконтрастного соединения - триодбензилового спирта и образование люминесцентной метки на поверхности наноалмаза за счет её окисления), пригодные для использования в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

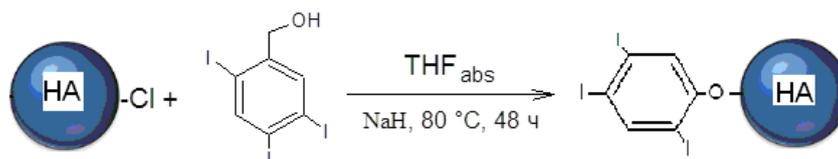
### 3.6.1. Синтез наноалмаза с тритиевой меткой

Впервые синтезирован меченный тритием ДНА и изучены его физико-химические свойства [353]. Синтез проводили бомбардировкой поверхности наноалмаза атомами трития из газовой фазы методом термической активации трития:



### 3.6.2. Синтез конъюгата ДНА с триодбензиловым спиртом

Чтобы визуализировать ДНА *in vivo* на основе метода рентгеновской компьютерной томографии (РКТ), сначала была разработана методика прививки рентгеноконтрастного соединения триодбензилового спирта на поверхность ДНА [150]. Для этого ДНА предварительно гидрировали, затем хлорировали и далее прививали триодбензиловый спирт (Рис. 75) [372].

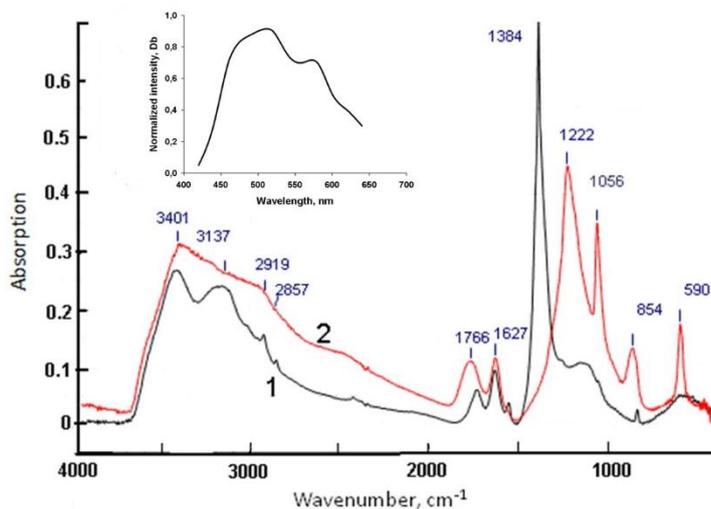


**Рисунок 75.** Схема введения методом ковалентной прививки триодбензилового спирта на поверхность хлорированного ДНА.

Содержание йода на поверхности ДНА, по данным метода РФЭС, составило 1,7 % ат.

### 3.6.3. Синтез ДНА-СООН

ДНА имеет собственную люминесценцию за счет дефектов алмазной решетки, но его люминесценцию можно усилить путем различных химических воздействий, например, окислением, аминированием и др. В работе использовали обработку ДНА смесью кислот-окислителей для получения ДНА с карбоксильными группами (Рис. 76). Синтезированный ДНА-СООН обладал люминесценцией, достаточной для его визуализации при взаимодействии с клетками [270].



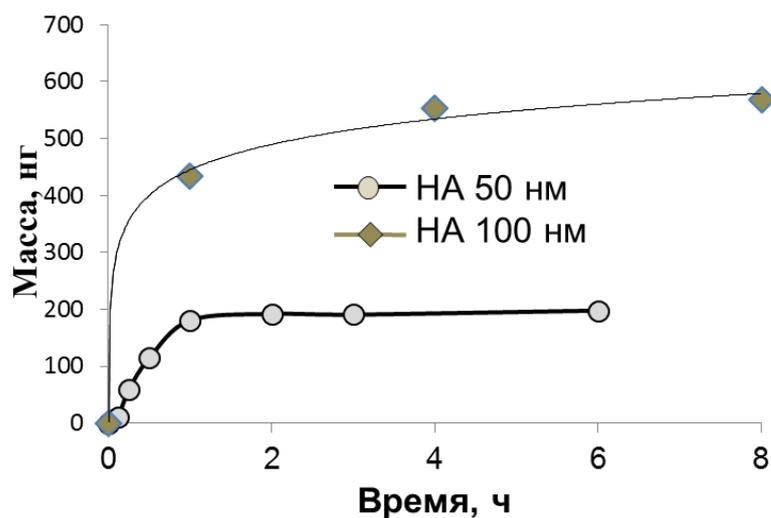
**Рисунок 76.** ИК-спектры ДНА: исходного (1) и модифицированного обработкой кипящей смесью кислот-окислителей (2). Вставка – спектр люминесценции окисленного ДНА ( $\lambda = 488$  нм).

После обработки ДНА интенсивность полосы, обусловленной колебаниями С–Н групп, уменьшается. Наблюдается рост интенсивности полосы поглощения при  $1766 \text{ см}^{-1}$ , обусловленной колебаниями карбонильной группы. Это свидетельствует об окислении алмазной поверхности.

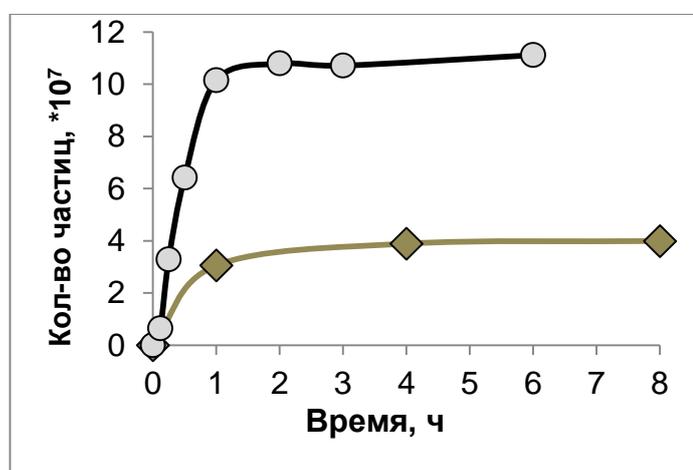
На вставке Рис. 76 вверху – приведен спектр люминесценции окисленного ДНА (аргоновый лазер, длина волны возбуждения 488 нм) [270]. Видно, что ДНА люминесцирует в области 450–650 нм с максимумом при 520 нм. Для люминесценции окисленного ДНА не наблюдалось снижения интенсивности (выцветания) в течение длительного времени без применения каких-либо специальных экспериментальных приемов.

### 3.7. Трансmemбранная проницаемость ДНА *in vitro*

Изучении диффузии частиц ДНА через модельную целлофановую мембрану с помощью пьезокварцевых микровесов показало различие скорости проникновения частиц ДНА разных размеров – 50 и 100 нм (Рис. 77, 78).

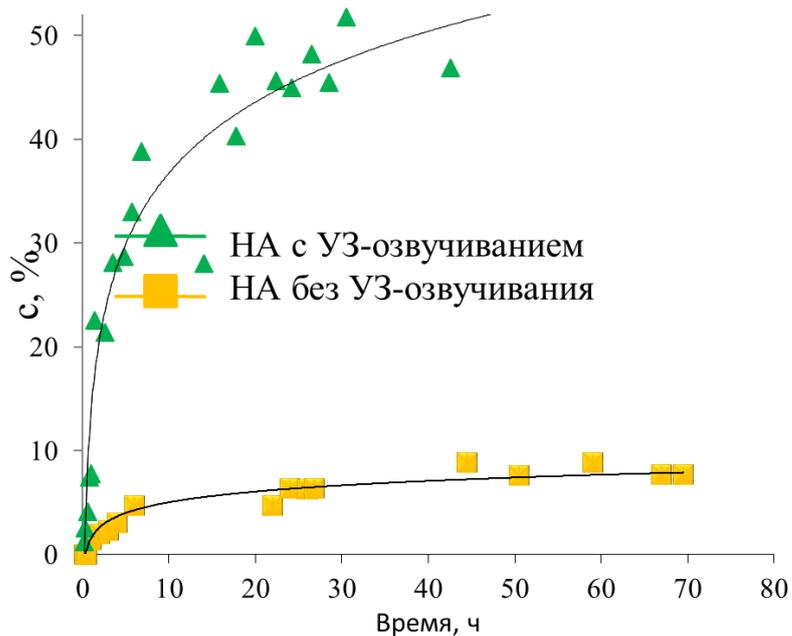


**Рисунок 77.** Зависимость массы прошедших через целлофан частиц ДНА от времени.



**Рисунок 78.** Зависимость количества частиц прошедших частиц ДНА от времени.

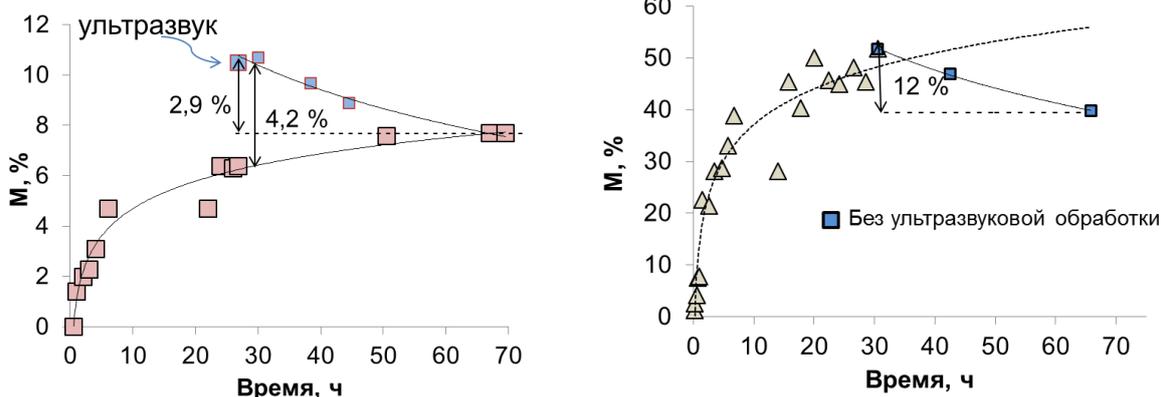
Изучение трансмембранной диффузии частиц ДНА с помощью тритиевой метки показала аналогичную картину (Рис. 79) [373]. Показано, что частицы наноалмаза начинают проникать через мембрану через 1 час. Через 24 ч через мембрану прошло 6,4% наночастиц, а через 48 ч переход наночастиц практически завершился, при этом общее количество проникших через мембрану частиц составило около 8% (Рис. 79). При воздействии ультразвука на внешний и внутренний сосуды количество частиц наноалмаза, проходящих через мембрану, составляет около 50%. Тот факт, что не все частицы наноалмаза способны проникать через модельную мембрану может быть связан как с образованием крупных агрегатов, не проникающих через целлофан, так и их адсорбцией на внутренних стенках каналов мембраны [374].



**Рисунок 79.** Проникновение частиц  $^3\text{H}$ -ДНА через модельную мембрану из целлофана без ультразвука (нижний график) и с ультразвуком (верхний график цвет).

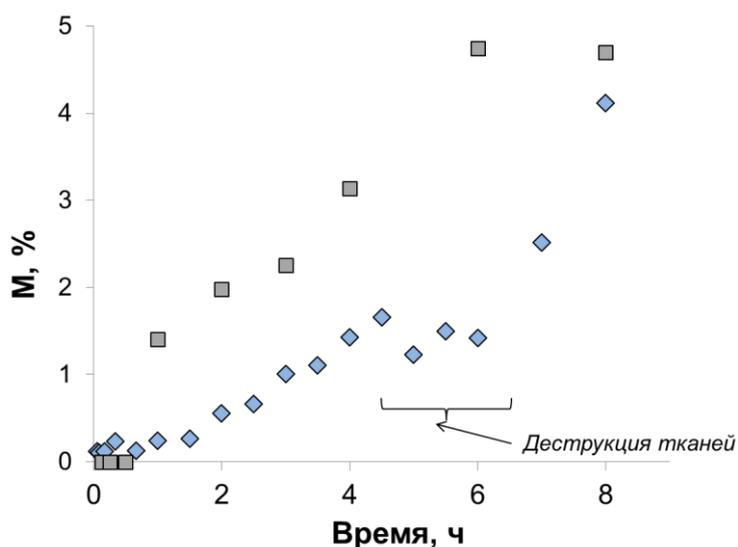
Дополнительно один опыт по исследованию трансмембранной проницаемости был проведен, используя ультразвуковую обработку в ходе всего эксперимента. Это было вызвано необходимостью выяснения ее влияния на процесс диффузии  $^3\text{H}$ -ДНА через целлофановую мембрану. Ультразвук в процессе диффузии использовался не постоянно, а перед каждым отбором пробы из внешнего раствора. При этом озвучивалась непосредственно внешняя ячейка в течение 1 мин на ультразвуковой ванне мощностью 50 Вт.

Аналогично методу пьезокварцевого взвешивания в ходе эксперимента было обнаружено во внешнем растворе уменьшение количества частиц  $^3\text{H}$ -ДНА. Для выяснения природы обнаруженного явления было решено на нескольких временных точках использовать дополнительную ультразвуковую обработку гидрозоля. В результате было обнаружено, что частицы ДНА осаждаются на стенках пластикового сосуда. Это необходимо учитывать при интерпретации результатов эксперимента (Рис. 80). В результате показано, что при диффузии ДНА сорбируется на стенках сосуда 2,9% частиц, а при диффузии с УЗО – 12% [374].



**Рисунок 80.** Сорбция частиц  $[^3\text{H}]$ -ДНА на стенках сосуда. Левый график сорбция без УЗО, правый график – с УЗО.

Изучение характера проникновения частиц ДНА через биомембрану (вывернутая кишка крысы) показало, что они в течение 4 ч медленно и постепенно проходят во внешний раствор до 1,5% от активности всех частиц наноалмаза (Рис. 81). При этом проникновение наночастиц аналогично диффузии в модельной целлофановой мембране. В промежутке 4-6 ч, по-видимому, начинается набухание мембраны, её деструкция и образование пор большего диаметра. Точка в 6 ч является критической для сохранения биофармацевтических характеристик мембраны. Далее частицы ДНА начинают проникать через нее экспоненциально (Рис. 81) [374]. Коэффициенты диффузии, рассчитанные по закону Фика для однородной среды ( $\Phi = D \cdot S \cdot dc/dx$ ), для приведенных кривых находятся в диапазоне  $(0,5-1) \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{с}$ .



**Рисунок 81.** Диффузия частиц  $[^3\text{H}]$ -ДНА через вывернутую кишку крысы (нижний график) по сравнению с целлофаном (верхний график).

### 3.8. Антиоксидантная активность ДНА

#### 3.8.1. Влияние ДНА на интенсивность перекисного окисления липидов

Изучение влияния ДНА и конъюгата ДНА-глицин в сравнении с глицином и препаратом сравнения антиоксидантным препаратом мексидолом на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) осуществлялось с использованием оценки уровней диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в суспензии модельных мембран липосом.

Результаты влияния изученных веществ на интенсивность ПОЛ (уровень ДК и МДА) представлены в Табл. 36 [375].

Таблица 36. Влияние ДНА, конъюгата ДНА-глицин, глицина и препарата сравнения мексидола на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по уровню диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в суспензии модельных мембран липосом.

Концентрация вещества, мкг/мл	Диеновые конъюгаты, мкмоль/л	Малоновый диальдегид, мкмоль/л
Контроль		
–	81,248±8,418	1,709±0,306
ДНА		
10	71,177±6,041	1,043±0,108
50	39,121±6,125*	0,701±0,092*
100	26,125±4,035*	0,289±0,035*
Конъюгат ДНА-глицин		
10	63,381±5,912	0,954±0,069*
50	20,143±4,812*	0,492±0,073*
100	8,174±1,247*	0,263±0,041*
Глицин		
10	63,431±6,469	0,794±0,092*
50	35,896±3,452*	0,423±0,098*
100	11,779±3,034*	0,303±0,029*
Мексидол		
10	68,877±8,543	0,945±0,098
50	42,326±5,714*	0,691±0,102*
100	23,345±3,017*	0,319±0,042*

\* достоверность различий при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Обнаружено, что ДНА оказывали влияние на интенсивность перекисного окисления липидов, достоверно уменьшая показатели уровня диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в суспензии модельных мембран липосом (Табл. 36). Однако этот эффект наблюдался лишь в дозах 50 и 100 мкг/мл и был выражен в значительно меньшей степени, чем действие глицина и конъюгата ДНА-глицин [375].

Установлено, что конъюгат ДНА-глицин в концентрации 10 мкг/мл вызывал незначительное, статистически недостоверное уменьшение по сравнению с контролем уровней ДК и достоверное (в 2 раза) уменьшение уровня МДА. В концентрации 50 мкг/мл конъюгат ДНА-глицин статистически достоверно в 2,4 раза уменьшал уровень ДК, а уровень МДА – в 2 раза (Табл. 36). В концентрации 100 мкг/мл эффект конъюгата ДНА-глицин усиливался: под его влиянием уровень ДК снижался в 5,8 раза, а уровень МДА – в 3,1 раза (Табл. 36) [375].

Глицин в концентрации 10 мкг/мл по сравнению с контролем незначительно снижал уровни ДК и МДА (Табл. 36). В концентрации 50 мкг/мл глицин статистически достоверно уменьшал уровень ДК в 4 раза, а уровень МДА - в 2,25 раза. В концентрации 100 мкг/мл глицин снижал уровень ДК в 6,86 раза, а уровень МДА – в 5,67 раза. Определенная в ходе эксперимента активность глицина соответствовала полученной ранее в работе [376].

Мексидол в концентрации 10 мкг/мл статистически недостоверно уменьшал по сравнению с контролем уровни ДК и МД. В концентрации 50 мкг/мл мексидол статистически достоверно уменьшал уровень ДК в 1,86 раза, а уровень МДА - в 1,81 раз (Табл. 36). В концентрации 100 мкг/мл мексидол снижал уровень ДК в 3,37 раза, а уровень МДА – в 3,91 раз (Табл. 36) [375].

**Вывод:** по выраженности ингибирования ПОЛ конъюгат ДНА-глицин имеет сходную активность с глицином, а по некоторым показателям превосходит известное ЛС ингибитор ПОЛ – мексидол. При этом сами ДНА незначительно влияют на ПОЛ.

### 3.8.2. Изучение антирадикальной активности

Для определения антирадикальной активности ДНА и конъюгата ДНА-глицин применяли метод хемилюминесценции. Антирадикальная эффективность соединений, определенная методом тушения хемилюминесценции, представлена в Табл. 37 [375].

Показано, что ДНА существенно и статистически достоверно уменьшал по сравнению с контролем тушение хемилюминесценции: в концентрации 50 мкг/мл – в 3,43 раз, в концентрации 75 мкг/мл – в 6,78 раза и в концентрации 100 мкг/мл – в 13,24 раза (Табл. 37).

Установлено, что конъюгат ДНА-глицин в концентрации 20 мкг/мл статистически достоверно уменьшал тушение хемилюминесценции (в % к контролю) - в 1,58 раза (Табл. 37). При дальнейшем увеличении концентрации конъюгата ДНА-глицин его эффект усиливался. В концентрации 50 мкг/мл конъюгат ДНА-глицин уменьшал тушение хемилюминесценции в 3,32

раза, в концентрации 75 мкг/мл – в 9,19 раза, в концентрации 100 мкг/мл – в 25,75 раза (Табл. 37). Полученные данные свидетельствуют о том, что конъюгат ДНА-глицин обладает выраженной антирадикальной активностью, его эффект имеет дозозависимый характер, увеличиваясь с повышением концентрации соединения [375]. Глицин в используемой хемилюминесцентной системе не проявил антирадикальной активности (Табл. 37).

*Таблица 37.* Тушение хемилюминесценции в системе из незамещенного 3-оксипиридина, пероксидазы и пероксида водорода под действием ДНА, конъюгата ДНА-глицин, глицина и мексидола.

с, мкг/мл	Тушение хемилюминесценции (% от контроля)/ Вещества			
	ДНА	Конъюгат ДНА-глицин	Глицин	Мексидол
10	93,14±8,72	91,82±9,14	95,89±9,01	93,81±5,34
20	71,23±6,12*	65,82±5,98*	91,13±8,18	78,46±9,37
50	29,84±3,16*	31,02±2,96*	89,15±7,16	38,18±5,29*
75	15,92±2,43*	11,72±2,75*	86,27±6,89	17,62±4,36*
100	7,78±0,55*	3,98±0,78*	83,85±9,03	9,18±0,75*
Контроль	103,04±8,12			

\* достоверность различий при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

**Вывод:** показано, что ДНА оказывает влияние на интенсивность ПОЛ, но его эффект выражен в значительно меньшей степени, чем действие конъюгата и глицина, при этом ДНА обладает отчетливой антирадикальной активностью. Конъюгат ДНА-глицин в диапазоне концентраций 20-100 мкг/мл обладает отчетливой антирадикальной активностью, достоверно ингибируя хемилюминесценцию в системе 3-оксипиридин-пероксидаза-пероксид водорода, и превосходит по этому показателю глицин и препарат мексидол (Табл. 37). Так, в концентрации 100 мкг/мл конъюгат ДНА-глицин уменьшал тушение хемилюминесценции в 25,75 раза.

### 3.9. Активность и стабильность систем ДНА-фермент

#### 3.9.1. Активность иммобилизованных ферментов

В работе впервые были получены препараты РРазы, ковалентно иммобилизованной на ДНА с помощью глутарового альдегида, удельная активность которой составила 141 МЕ/мг, что составляет 64% от исходной активности фермента [182].

Активность ДНА-химотрипсина составила  $0,0274 \pm 0,0005$  U/мг, или  $33 \pm 5\%$  от активности нативного химотрипсина. Активность ДНА-папаин составила  $0,0108 \pm 0,0005$  U/мг, или  $40 \pm 5\%$  от активности нативного папаина. Активность ДНА-трипсин составила  $50 \pm 5\%$  от активности нативного трипсина.

Таким образом, в работе впервые показана возможность иммобилизации на поверхности ДНА неорганической пирофосфатазы из *E. Coli*, папаина и химотрипсина, сохраняющих высокую активность.

### 3.9.2. Стабильность иммобилизованных ферментов

#### 3.9.2.1. Термостабильность трипсина и устойчивость при различных pH

Изучение стабильности иммобилизованного на ДНА трипсина при разных температурах представлено в Табл. 38.

Таблица 38. Стабильность трипсина, иммобилизованного на ДНА, при разных температурах.

T <sup>0</sup> C	Активность трипсина, мкмоль/мин/мг	Активность конъюгата ДНА-трипсин, мкмоль/мин/мг	Остаточная активность трипсина, %	Остаточная активность ДНА-трипсин, %
26	0,3	0,15	=100	=100
37	0,25	0,14	90	95
50	0,2	0,08	70	53
60	0,1	0,077	30	51
70	0,05	0,07	17	47

Из данных Табл. 38 можно сделать вывод, что иммобилизованный на ДНА трипсин более стабилен, чем трипсин при температурах выше 50 °C

Определение pH-стабильности нативного трипсина и иммобилизованного на ДНА представлено в Табл. 39 и 40, соответственно.

Таблица 39. Определение pH-стабильности нативного трипсина.

Инкубация с буфером (мин, час)	Инкубация с субстратом (мин)	pH4 A <sub>410</sub>	pH5 A <sub>410</sub>	pH6 A <sub>410</sub>	pH7 A <sub>410</sub>	pH8 A <sub>410</sub>	pH9 A <sub>410</sub>	pH10 A <sub>410</sub>	pH11 A <sub>410</sub>
5 мин	7 мин	0.370	0.360	0.340	0.330	0.360	0.360	0.360	0.360
	активность	0.11	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10
	%активности	100	91	91	82	91	91	91	91
3 ч 46 мин	10 мин	0.195	0.180	0.178	0.159	0.172	0.172	0.178	0.187
	активность	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04
	%активности	100	199	100	75	75	75	100	100
25 ч 20 мин	20 мин	0.175	0.175	0.170	0.130	0.067	0.039	0.039	0.039

	активность	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0	0	0
	%активности	100	100	100	50	50	0	0	0

Таблица 40. Определение *pH*-стабильности трипсина, иммобилизованного на ДНА.

Инкубация с буфером (мин, час)	Инкубация с субстратом (мин)	<i>pH</i> 4 A <sub>410</sub>	<i>pH</i> 5 A <sub>410</sub>	<i>pH</i> 6 A <sub>410</sub>	<i>pH</i> 7 A <sub>410</sub>	<i>pH</i> 8 A <sub>410</sub>	<i>pH</i> 9 A <sub>410</sub>	<i>pH</i> 10 A <sub>410</sub>	<i>pH</i> 11 A <sub>410</sub>
5 мин	10 мин	0.542	0.472	0.398	0.306	0.280	0.228	0.182	0.152
	активность	1.08	0.94	0.80	0.61	0.56	0.46	0.36	0.30
	%активности	100	87	74	57	52	43	33	28
3 ч 46 мин	12 мин	0.325	0.291	0.184	0.183	0.182	0.150	0.150	0.150
	активность	0.54	0.49	0.31	0.31	0.30	0.25	0.25	0.25
	%активности	100	91	57	57	56	46	46	46
25 ч 20 мин	66 мин	0.158	0.106	0.078	0.069	0.052	0.046	0.044	0.043
	активность	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01
	%активности	100	60	40	40	40	20	20	20

Активность нативного и иммобилизованного трипсина после инкубации при различных значениях *pH* выражали также в процентах от инкубации в течение 5 мин, принимая значения активности после инкубации с буферами в течение 5 мин за 100% (Табл. 41).

Таблица 41. Активность нативного и иммобилизованного на ДНА трипсина в %.

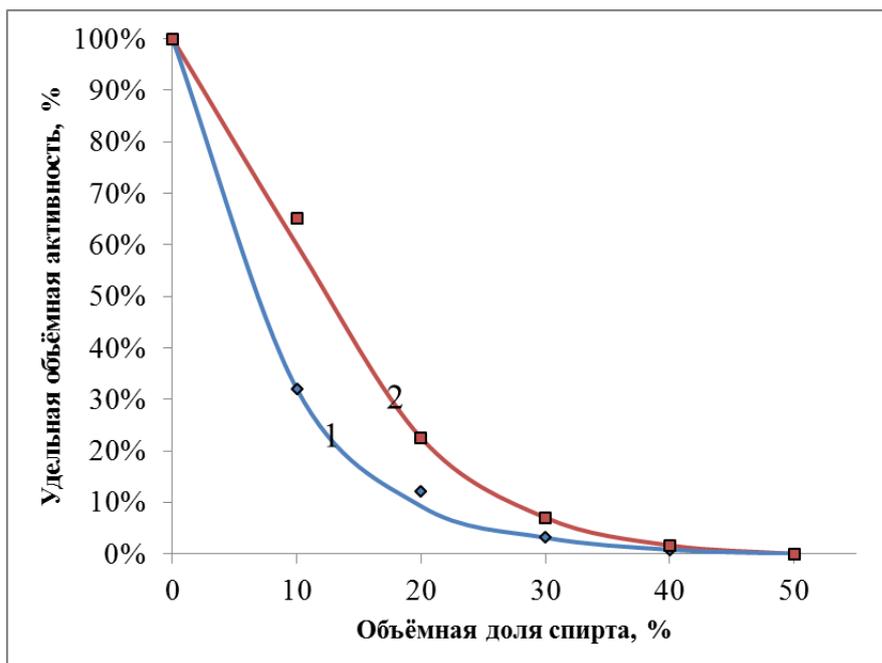
Остаточная активность в %	<i>pH</i> 4	<i>pH</i> 5	<i>pH</i> 6	<i>pH</i> 7	<i>pH</i> 8	<i>pH</i> 9	<i>pH</i> 10	<i>pH</i> 11
Трипсин, 4 ч	50	52	39	51	54	54	69	83
Иммоб. трипсин, 4 ч	36	40	40	33	30	30	40	40
Трипсин, 24 ч	5	3	3	3	4	2	3	3
Иммоб. трипсин 24 ч	18	20	20	11	10	0	0	0

Таким образом, установлено, что при *pH* 4-8 иммобилизованный на ДНА трипсин по сравнению с нативным ферментом в течение суток имеет большую стабильность (от 2 до 6 раз).

### 3.9.2.2. Стабильность папаина в водно-спиртовых средах

Кривые зависимостей изучения стабильности папаина в водно-спиртовых средах приведены на Рис. 82. Из Рис. 82 видно, что папаин, иммобилизованный на ДНА, при объёмной доле спирта 10% теряет 35% от своей начальной активности, а нативный папаин – 68%; при объёмной доле спирта 20% активности конъюгата и нативного папаина составили 22% и 12%,

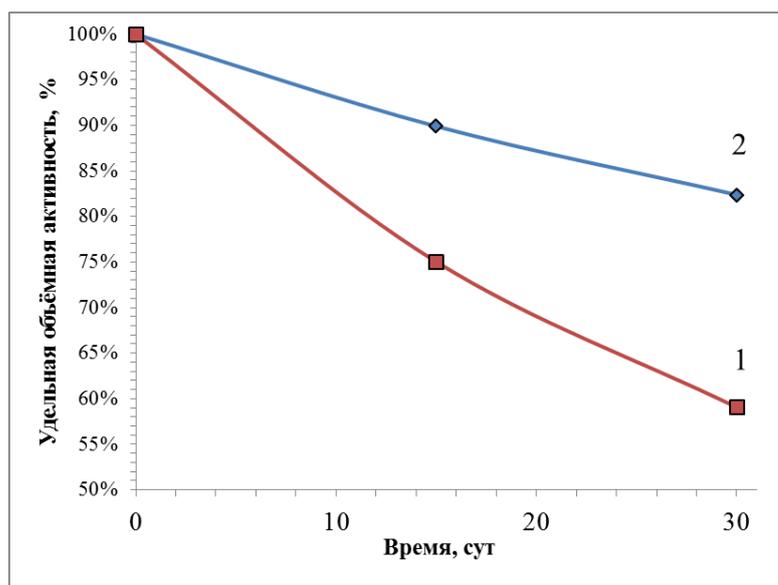
соответственно. Таким образом, иммобилизованный на наноалмазе папаин при объёмных долях спирта 0-30% стабильнее, чем нативный фермент.



**Рисунок 82.** Зависимость инактивации в водно-спиртовых средах папаина, иммобилизованного на ДНА, в сравнении с нативным папаином от объёмной доли спирта: 1 – нативный папаин; 2 – папаин, иммобилизованный на ДНА.

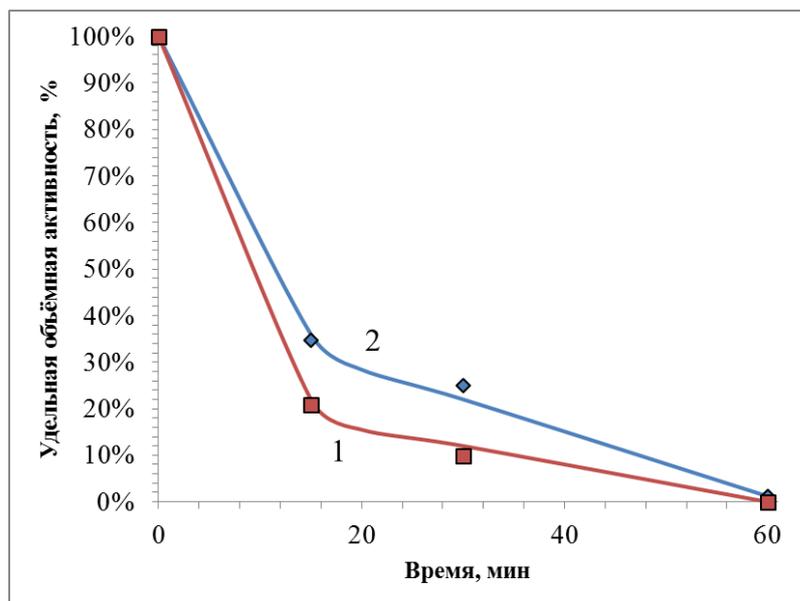
### 3.9.2.1. Термостабильность химотрипсина и стабильность при хранении

Стабильность химотрипсина при хранении в течение 30 сут представлена на Рис. 83. Видно, что через 30 дней выдерживания при температуре 4 °С наблюдалось снижение активности иммобилизованного химотрипсина до  $82 \pm 5\%$ , тогда как активность нативного химотрипсина понизилась до  $59 \pm 5\%$ . Таким образом, стабильность конъюгата ДНА-химотрипсин на 23% больше стабильности нативного химотрипсина.



**Рисунок 83.** Временная зависимость инактивации при хранении иммобилизованного на ДНА химотрипсина в сравнении с нативным химотрипсином: 1 – нативный химотрипсин; 2 – химотрипсин, иммобилизованный на ДНА.

На Рис. 84 представлена временная зависимость термостабильности иммобилизованного на ДНА химотрипсина в сравнении с нативным химотрипсином. Видно, что нативный химотрипсин при инкубации при температуре 50 °С в первые 30 минут теряет на 15% больше от своей первоначальной активности, чем конъюгат. Таким образом, иммобилизованный фермент более термостабилен, чем нативный химотрипсин.



**Рисунок 84.** Временная зависимость термоинактивации иммобилизованного на ДНА химотрипсина в сравнении с нативным химотрипсином: 1 – нативный химотрипсин; 2 – химотрипсин, иммобилизованный на ДНА.

**Вывод.** Показано, что протеолитические ферменты, иммобилизованные на ДНА, по сравнению с нативными ферментами имеют повышенную стабильность, которая проявляется в увеличении срока хранения, термостабильности и устойчивости в водно-спировых средах.

### **3.10. Биораспределение ДНА**

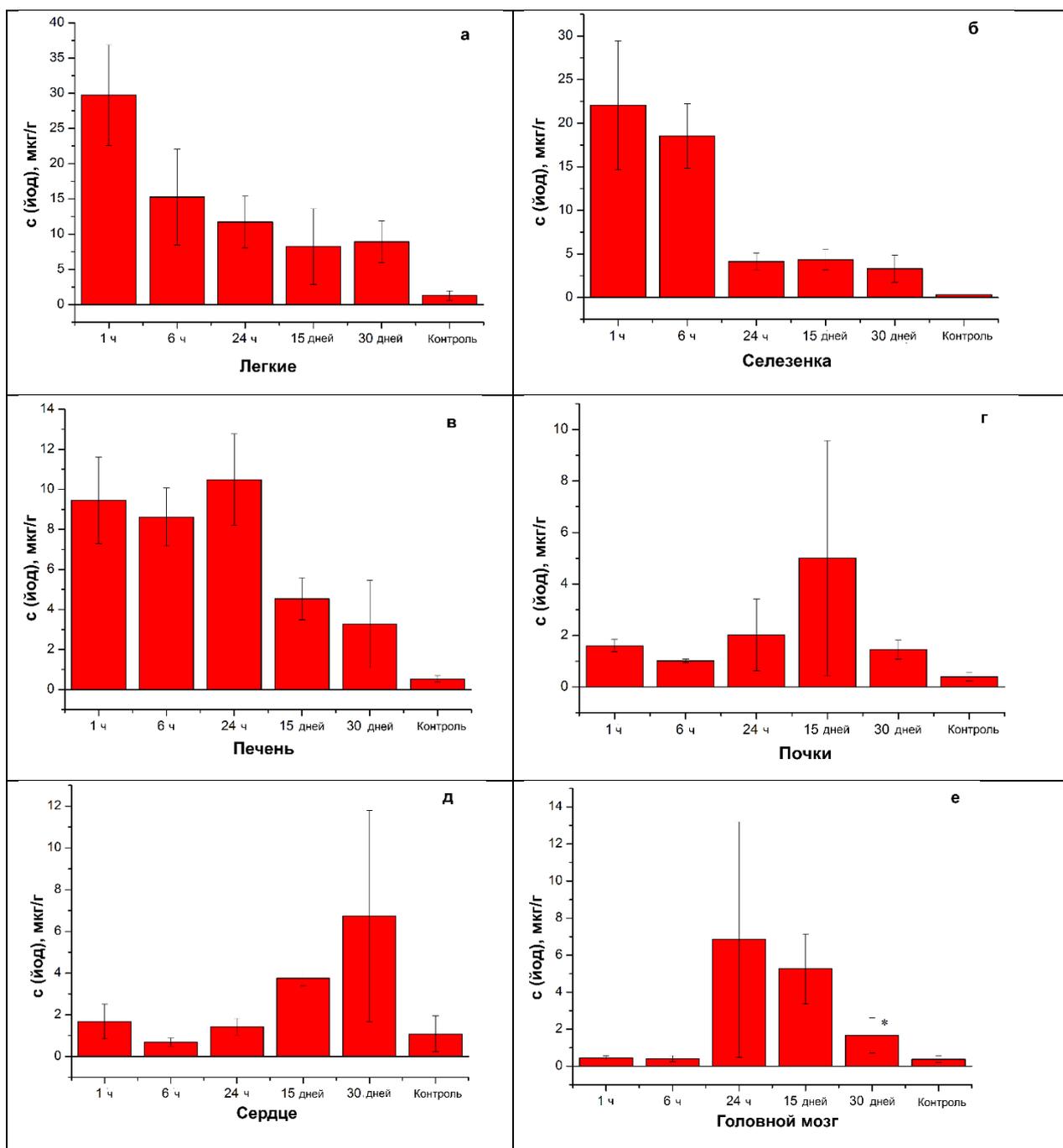
#### **3.10.1. ДНА с рентгеноконтрастной меткой *in vivo***

В работе показано (см. Приложение), что:

- конъюгат ДНА-Р циркулирует в кровотоке, что показано по изменению плотности крови на томограммах.
- плотности органов в различных плоскостях тела на компьютерных томограммах, полученных с помощью метода РКТ, во времени при введении суспензий ДНА-Р и Р не меняются. Это связано с тем, что концентрация ДНА в суспензии оказалось недостаточной для исследования методом РКТ в жизненно важных органах. Повышение же концентрации ДНА в суспензии для преодоления порога чувствительности метода РКТ не представляется фармакологически возможным.
- метод РКТ не применим для изучения биораспределения *in vivo* наноалмазных частиц в заданных диапазонах концентраций.

#### **3.10.2. ДНА с рентгеноконтрастной меткой *ex vivo***

Отсутствие количественных данных распределения ДНА с рентгеноконтрастной меткой по органам кролика потребовало поиска других методов исследования. Было решено провести измерение концентрации йода в органах экспериментальных животных до и после введения рентгеноконтрастного вещества, содержащего трийодфенильный радикал. Одним из наиболее чувствительных аналитических методов является метод ИСП-МС. Для этого полученный конъюгат ДНА-Р вводили внутривенно в бедренную вену в виде гидрозоля кроликам в дозе 5 мг/кг. Измерение количества накапливающегося экзогенного йода в отдельных органах осуществляли через 1, 6, 24 ч, 15 и 30 сут после введения конъюгата ДНА-Р (Рис. 85) [150].



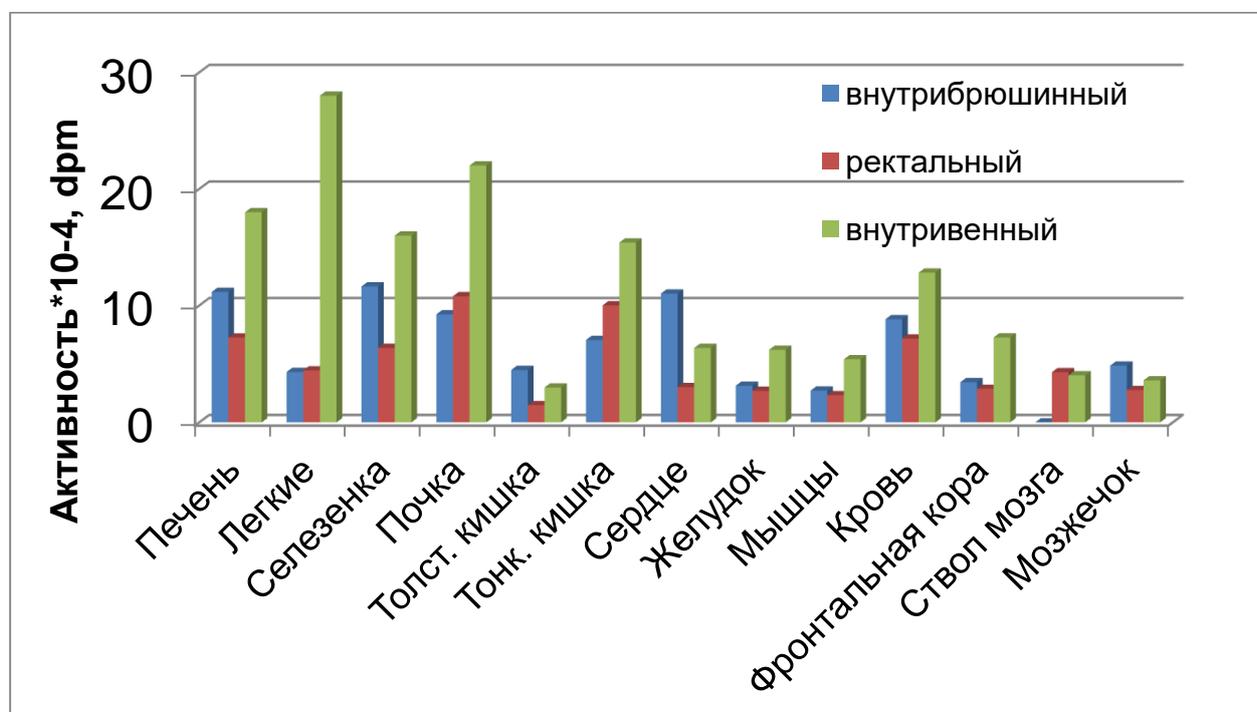
**Рисунок 85.** Динамика накопления и выведения ДНА по органам кролика (среднее по 5 животным).

Установлено (Рис. 85), что достаточно быстрое (уже через 1 ч после введения) и максимальное кумулирование ДНА происходит в легких (до 30 мкг/г), меньше – в селезенке (23 мкг/г) [377]. Максимальное содержание ДНА в других органах достигается медленнее: в печени и головном мозге через сутки, а в почках и в сердце - на 15-е сутки. При этом в сердце и головном мозге накапливается всего до 6,5 мкг/г. Выводится ДНА, как следует из Рис. 85, из всех органов постепенно из всех органов (за исключением сердца). Это открывает дополнительные возможности применения ДНА в клинической практике в качестве пролонгированной ЛФ.

### 3.10.3. ДНА с тритиевой меткой *ex vivo*

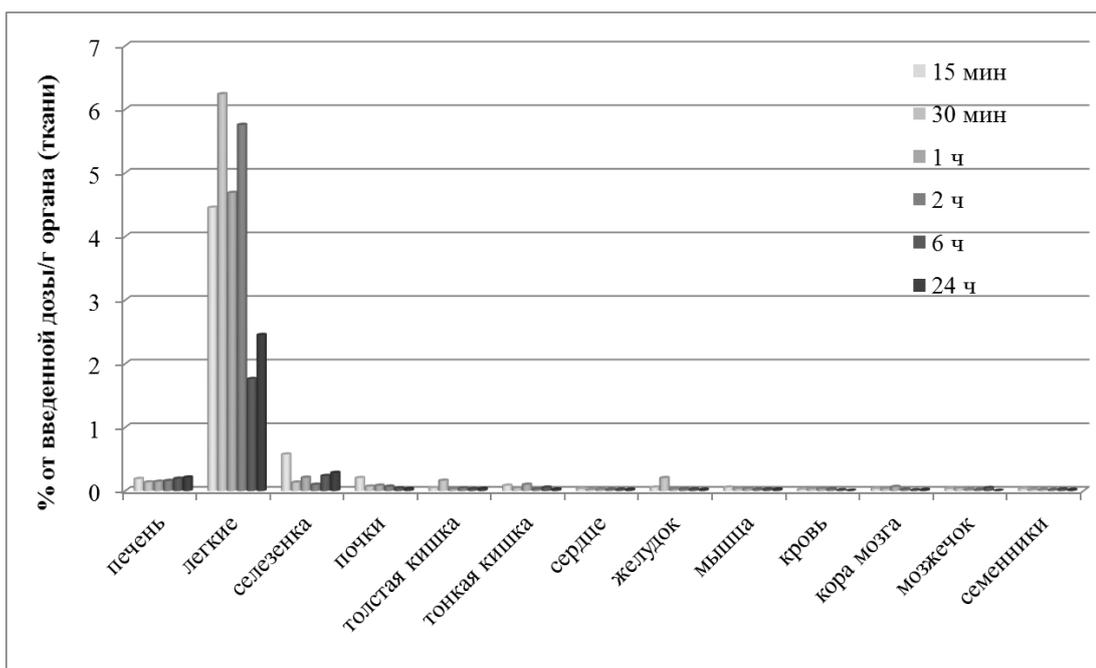
Предварительно было изучено влияние способа введения ДНА на его биораспределение в организме лабораторных животных (крысы). ДНА, меченный тритием, вводили тремя основными путями – внутривенно, внутрибрюшинно и ректально. Результаты представлены на Рис. 86.

Биораспределение меченного тритием ДНА в организме лабораторных животных (крысы) при различных путях введения (внутрибрюшинный, ректальный и внутривенный) [374]. Объем вводимого гидрозоля [<sup>3</sup>H]-ДНА - 100 мкл; удельная радиоактивность гидрозоля 0,61 мКи/мл; время инкубации 15 мин. Установлено, что максимальные накопления ДНА в основных органах крысы (печень, легкие, селезенка, почка и др.) достигается при внутривенном ведении гидрозоля (Рис. 86).

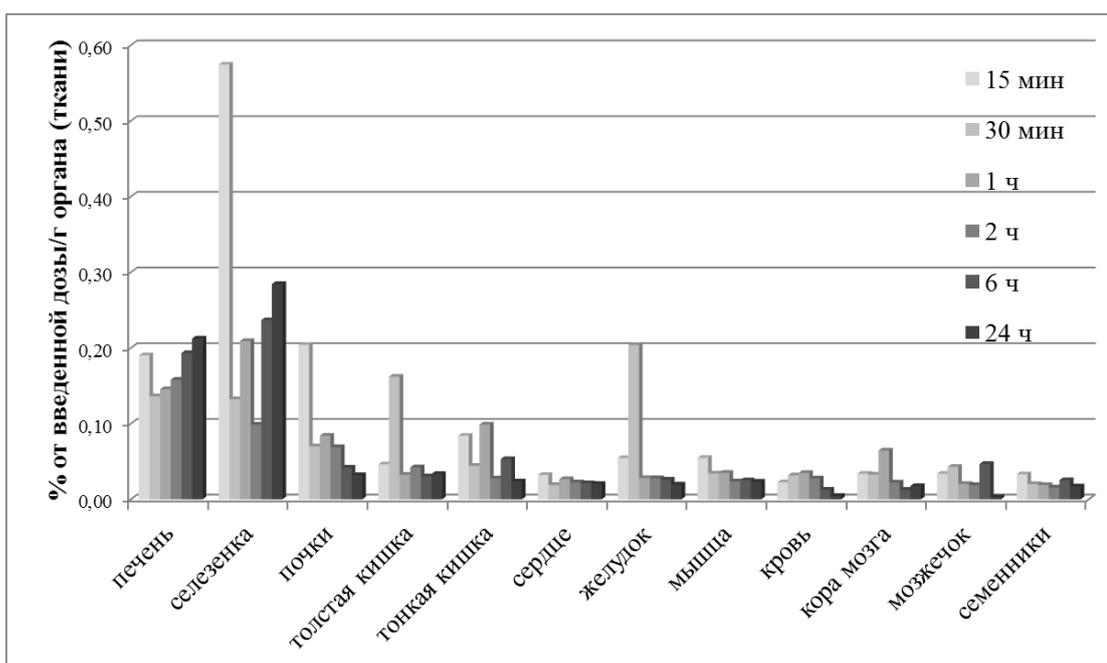


**Рисунок 86.** Распределение ДНА в органах крысы через 15 мин после введения.

На Рис. 87 и 88 представлены данные изучения биораспределения ДНА в организме крыс во времени – от 15 мин до 24 ч. Из Рис. 87 следует, что основным депо для накопления ДНА являются легкие, где количество наночастиц достигает 4,4 %/г органа в течение 15 мин и повышается до 6,2 % к 30 мин. Через 6 ч количество частиц в легких снижается до 1,8%, а к 24 ч накапливается до 2,3%. На основе этих данных можно сделать общее представление о накоплении и выведении ДНА из организма крыс.



**Рисунок 87.** Биораспределение [ $^3\text{H}$ ]-ДНА в организме крыс от 15 мин до 24 ч при внутривенном введении в бедренную вену.



**Рисунок 88.** Биораспределение [ $^3\text{H}$ ]-ДНА в организме крыс от 15 мин до 24 ч при внутривенном введении в бедренную вену.

Данные, представленные на Рис. 88, соответствуют Рис. 87 за исключением данных по накоплению ДНА в легких. Вторым органом по количеству накопленного ДНА в течение 15 мин является селезенка, в которой через данный промежуток времени обнаруживается 0,6%/г ДНА. ДНА проникает в почки уже через 15 мин после введения, после чего концентрация ДНА

постепенно снижается. Можно сделать вывод, что ДНА выводится через желудочно-кишечный тракт, в который он поступает через 30 мин после введения и его концентрация увеличивается за это время в 4 раза с 0,05 до 0,2 %/г. Также видно, что с течением времени концентрация ДНА в крови постепенно снижается. Таким образом были установлены основные органы накопления и выведения ДНА из организма крысы через 15 мин после введения в течение суток.

Изучение биораспределения на мышцах можно соотнести с полученными результатами на крысах только относительно, что связано с методикой проведения эксперимента и дальнейшей пробоподготовки. У крыс извлекали части органов, так как целые органы являются слишком большими образцами для дальнейшего растворения. У мышей исследовали цельные органы.

Изучение биораспределение на мышцах было выполнено статистически достоверно на 5-10 головах на каждую временную точку. Выбранные временные точки (от 15 мин до 6 месяцев) позволили не только изучить биораспределение ДНА по органам, тканям и биологическим жидкостям, но и его накопление и выведение из организма *in vivo* [378].

Было найдено, что появление ДНА в органах и тканях мышей наблюдается уже через 15 мин после его введения (рис. 89). Основные органы кумуляции ДНА – легкие (до 10% от введенной дозы), почки (до 7%) и печень (до 4,5%). При этом ДНА равномерно накапливаются в остальных органах и тканях в низких концентрациях (до 0,5%). Выводятся ДНА практически из всех органов в течение 7-30 дней, что совпадает с литературными данными [259]. Исключение составляет печень, в которой через 6 месяцев наблюдения остается половина от максимального накопленного в ней количества ДНА (2% от общего количества ДНА) и селезенка, в которой происходит спустя 6 мес. постепенное накопление ДНА от 0,25% через 15 мин после введения до 1%. При этом гистологический анализ, проведенный через 2 недели и 6 месяцев после введения ДНА, не выявил каких-либо морфологических изменений каждого органа по сравнению с контролем [378].

Следует отметить, что в месте введения ДНА (хвостовая вена) ДНА постепенно накапливаются к 1 ч и далее выводятся через 14-30 суток. Это доказывает, что весь препарат введен в кровоток и отсутствуют его значимые количества в месте введения, влияющие на экспериментальные результаты.

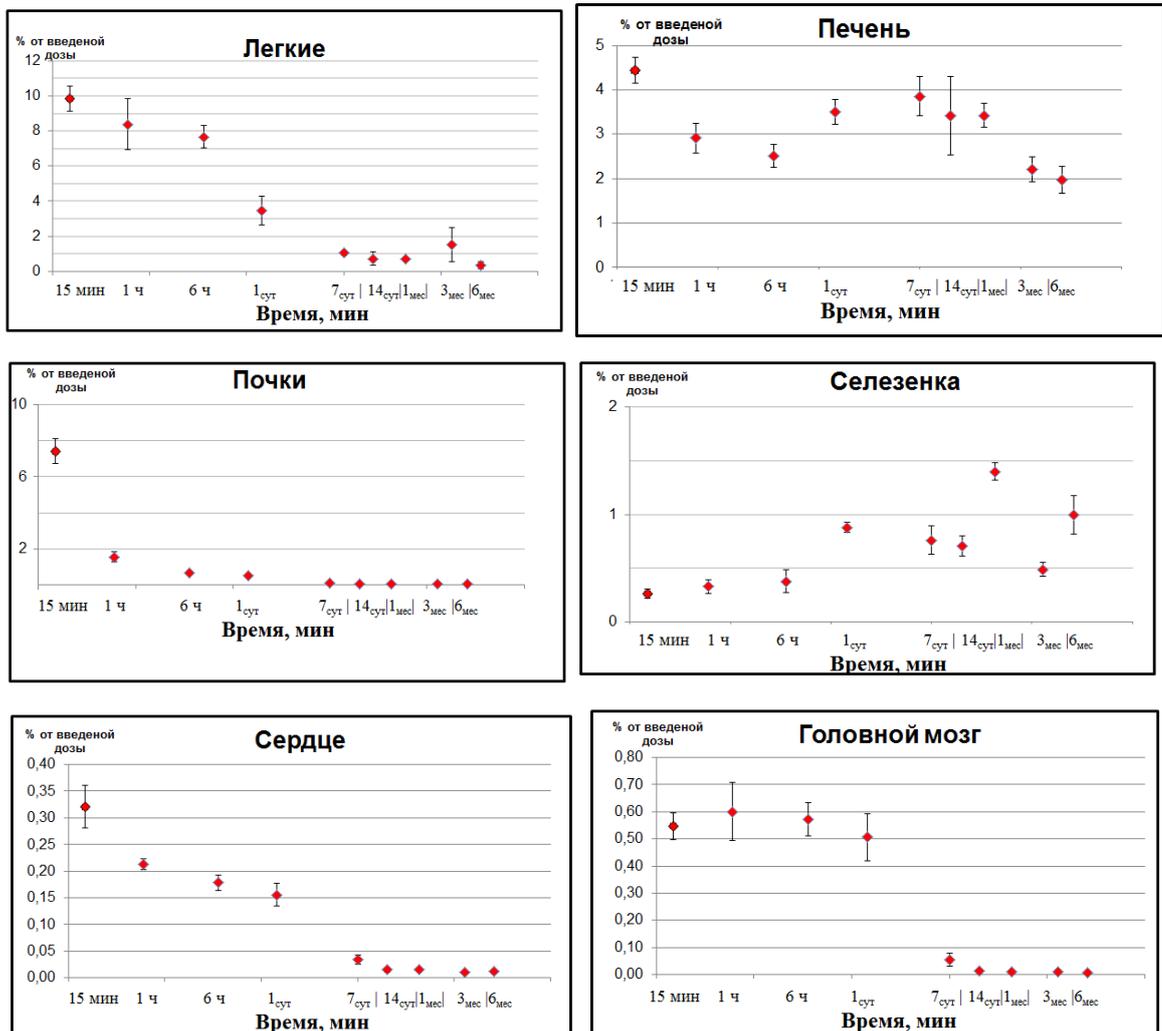
В кровотоке через 15 мин после введения ДНА циркулирует 0,6% ДНА. Через 1 ч количество ДНА в крови уменьшается до 0,25% и постепенно понижается до 0,2% через 24 ч и через 7 сут. падает до 0,02% .

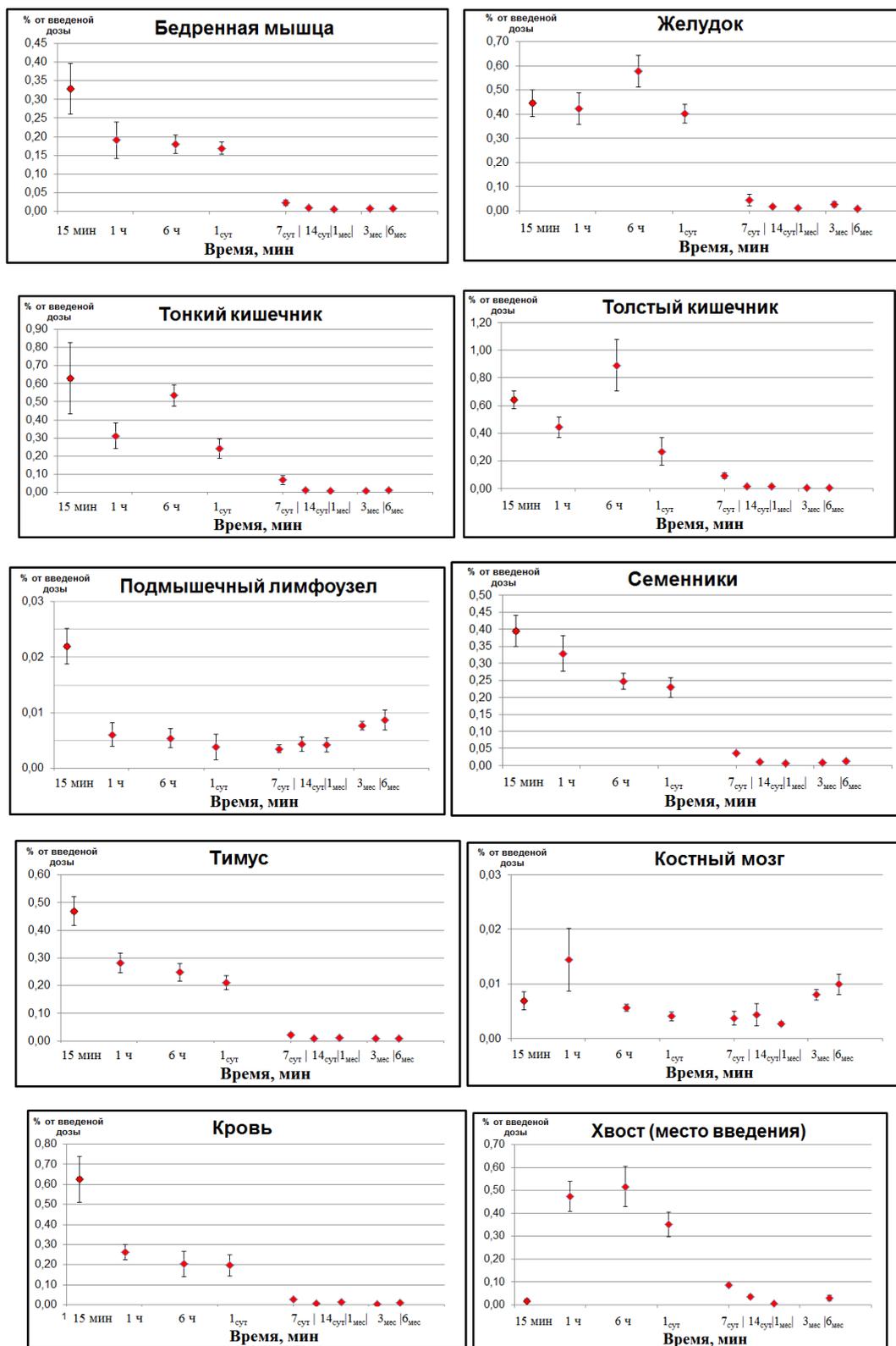
Из рассмотрения Рис. 89 видно, что в желудке и толстом кишечнике мыши ДНА постепенное накапливаются и через 6 ч их содержание достигает максимума. Затем в этих органах происходит постепенное снижение концентрации ДНА и за 14 суток он почти полностью выводится из них. Следовательно, частицы ДНА выводятся через систему желудочно-кишечного

тракта. При этом ДНА очень быстро выводится (например, в почках через 1 ч концентрация ДНА падает от 7 до менее чем 0,5% от введенной дозы) через мочевыделительную систему. Из Рис. 89 также следует, что ДНА, в основном, аккумулируется в органах и практически не накапливается в лимфатической системе и костном мозге.

В головной мозг частицы ДНА проникают в количестве 0,5% от введенной дозы уже через 15 мин после введения и содержание их не меняется в течение 24 ч, а затем через 7-14 суток ДНА полностью выводится.

Поэтому пролонгированные фармакологические эффекты конъюгата ДНА-глицин можно объяснить длительным нахождением частиц ДНА в головном мозге.





**Рисунок 89.** Биораспределение ДНА в органах, тканях и биологических жидкостях мыши в течение 6 месяцев.

На рис. 90 для удобства представлена общая картина биораспределения ДНА по органам мышей, данные которой полностью соответствуют Рис. 89.

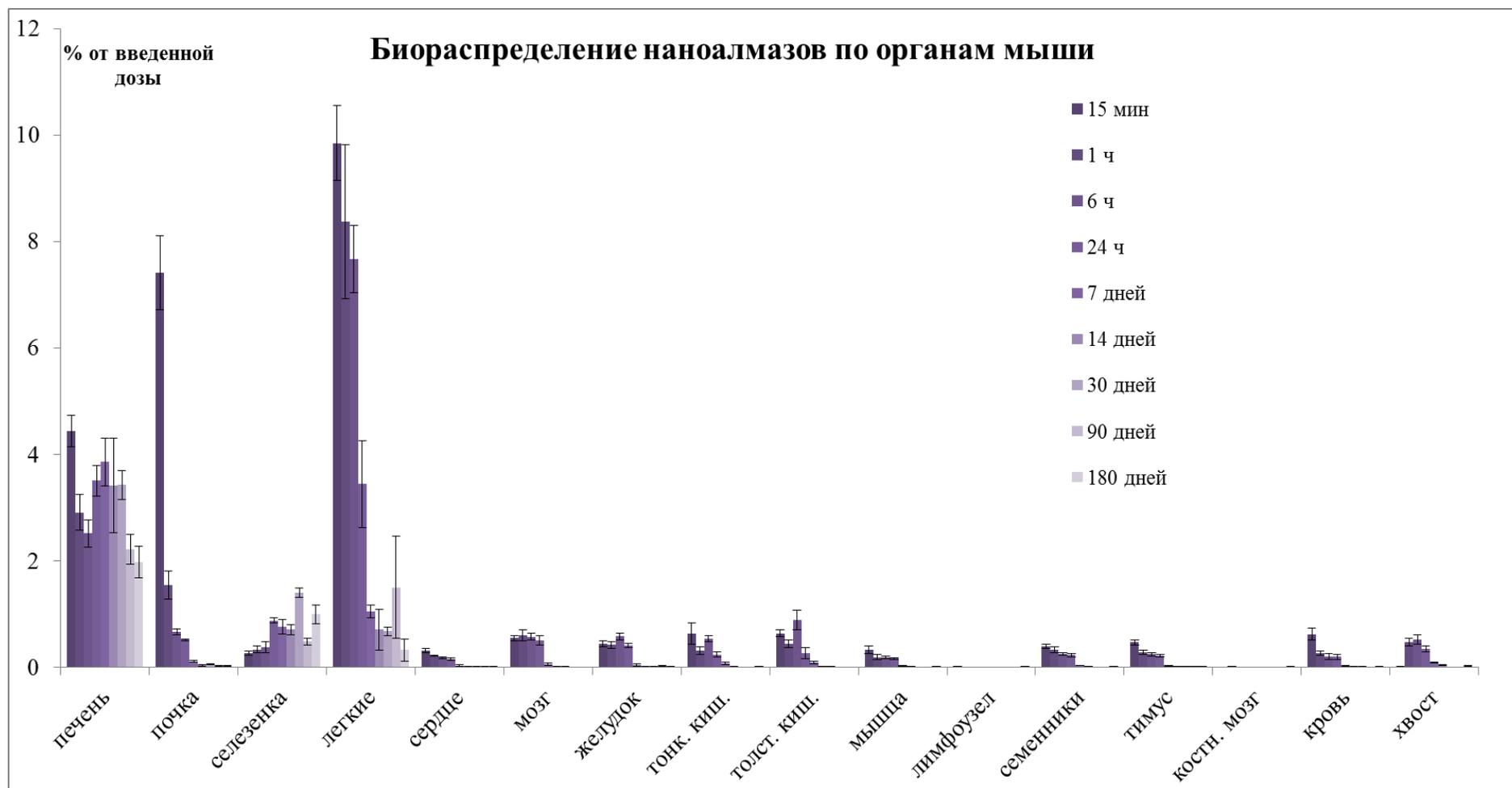


Рисунок 90. Биораспределение  $[^3\text{H}]$ -ДНА по органам мыши от 15 мин до 180 дней.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 4.1. Влияние химии поверхности ДНА на динамику проникновения в клетку<sup>17</sup>

Изучение динамики проникновения ДНА в клетки показало (см. Приложение), что [379]:

- ДНА проникают в клетки уже через 15 мин инкубации;
- скорость проникновения ДНА в клетки уменьшается в ряду ДНА<sub>стандартиз.</sub> > ДНА-амикацин > ДНА-глицин;
- ДНА внутри клеток не окружены мембраной и свободно лежат в цитоплазме;
- ковалентное связывание ДНА с глицином не препятствует связыванию с мембраной клетки частиц ДНА, но осложняет проникновение конъюгата внутрь клетки;
- ДНА не проникают в ядро или митохондрии при коротких временах инкубации. Однако, через 24 ч ДНА были обнаружены в ядре, что может быть связано с делением клетки.
- накопление через 24 ч в клетках конъюгата ДНА-амикацин оказывает цитотоксический эффект в отличие от исходного ДНА и конъюгата ДНА-глицин.

### 4.2. Определение острой токсичности ДНА (крысы)<sup>18</sup>

В работе было установлено (см. Приложение), что при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c показатели LD<sub>50</sub> составляют для ДНА – 3420±414 мг/кг, глицина – 4100±300,9 мг/кг и конъюгата ДНА-глицин – 2730±250 мг/кг. (см. Приложение). При этом конъюгат ДНА-глицин имеет несколько повышенное значение токсичности, чем токсичность отдельных ДНА и глицина. Эти вещества можно отнести к IV классу малотоксичных веществ.

### 4.3. Изучение побочных действий ДНА (мыши)<sup>19</sup>

В результате исследования побочного действия конъюгата ДНА-глицин при внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c в дозах 75, 150 и 225 мг/кг установлено, что он не вызывал

---

<sup>17</sup> Работа выполнена под руководством, при участии и консультативной помощи д.б.н., проф. Узбекова Р.Э. (Университет Франсуа Рабле, Тур, Франция) и в.н.с., д.б.н., Алиевой И.Б. (отдел электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова)

<sup>18</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи сотрудников Лаборатории лекарственной токсикологии НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «РКНПК» Минздрава России: д.м.н., проф. Е.В. Арзамасцева, н.с. Э.В. Кудрявцева.

<sup>19</sup> Работы по изучению побочного действия изучаемых веществ были выполнены при консультативной помощи З.д.н. РФ, лауреата Государственной премии СССР и премии Правительства РФ д.м.н., проф. Т.А.Ворониной.

признаков интоксикации и гибели животных на протяжении 14 сут. (см. Приложение). Конъюгат ДНА-глицин также не вызывало у мышей изменения шерстяного покрова, состояния слизистых оболочек. Также отсутствовали птоз верхнего века, повышенная уринация, дефекация, саливация, пилоэрекция, вокализация, боковое положение. В пределах нормы были ритм и глубина дыхательных движений, отсутствовали агрессивность, пугливость, тремор, судороги, каталепсия, стереотипия и груминг. Не наблюдалось изменения позы. У животных были сохранены пинеальный, роговичный и болевой рефлекс. На протяжении всего времени наблюдения экспериментальные животные удерживались на перевернутой сетчатой платформе в течение 5 с [380].

**Вывод:** ДНА и конъюгат ДНА-глицин обладают низкой токсичностью, их можно отнести к IV классу малотоксичных веществ. Кроме того, у конъюгата ДНА-глицин отсутствуют побочные эффекты на протяжении 14 сут. наблюдения за экспериментальными животными.

### 4.3. Митохондриальная активность ДНА<sup>20</sup>

Изучение действия функционализированного ДНА и конъюгатов ДНА с ЛВ на мембранный потенциал митохондрий показало (см. Приложение), что:

- функциональные группы ДНА –COOH, –OH, –H и ДНА с привитыми глицином или амикацином практически не оказывают негативного влияния на функции митохондрий (мембранный потенциал и скорость поглощения кислорода), тогда как группы –Cl на поверхности ДНА приводят к постепенному снижению этих функций [381].
- янтарная кислота, иммобилизованная на ДНА, окисляется митохондриями аналогично индивидуальной [358].
- используя величину эффекта образцов нативной янтарной кислоты и конъюгата на мембранный потенциал митохондрий, было найдено, что в образец ДНА-янтарная кислота содержит около 0,5% масс. янтарной кислоты.

---

<sup>20</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи сотрудников Лаборатории биоэнергетики ФГБУН ИТЭБ РАН: гл.н.с. З.д.н. РФ, д.б.н., проф. М.Н. Кондрашовой и в.н.с., к.б.н. Н.И. Федотчевой и при участии аспиранта РязГМУ А.С. Соломатина.

#### 4.4. Антибактериальная активность конъюгата ДНА-амикацин<sup>21,22</sup>

Результаты определения чувствительности микроорганизмов различных штаммов конъюгата ДНА-амикацин в сравнении с нативным амикацином представлены в Табл. 42 (см. Приложение).

Из данных Табл. 42 видно, что конъюгат ДНА-амикацин снизил эффективность своего действия в 2 раза на культурах *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. При этом МБК возросла в 2-4 раза для культур *Staphylococcus aureus* (в 2 раза), *Pseudomonas putida* (в 2 раза), *Proteus mirabilis* (в 4 раза), *Enterobacter aerogenes* (в 4 раза) и *Klebsiella pneumoniae* (в 2 раза). Следовательно можно сделать вывод о повышенной эффективности конъюгата ДНА-амикацин, по сравнению с нативным амикацином [382].

Таблица 42. МБК амикацина и конъюгата ДНА-амикацин, подавляющие рост различных культур бактерий; – отсутствие роста бактерий при данной концентрации, + наличие роста бактерий при данной концентрации.

Культура	Концентрация амикацина, мкг/мл; Конъюгат ДНА-амикацин/амикацин							
	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+	+	+

<sup>21</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи зав. лабораторией неспецифической микрофлоры ЦНИИТ РАМН к.м.н. Л.Г. Селиной.

<sup>22</sup> <sup>22</sup> Работа выполнена при участии и консультативной помощи зав. кафедры фармацевтической технологии РязГМУ им. акад.И.П.Павлова к.ф.н., доцента Н.Г. Селезенева.

## 4.5. Специфическая активность конъюгата ДНА-глицин *in vivo*<sup>23</sup>

### 4.5.1. Антигипоксическая активность

Исследование специфической противогипоксической активности конъюгата ДНА-глицин в сравнении с глицином и широко применяемым в медицинской практике препаратом мексидолом осуществлялось при использовании двух методик с различным генезом гипоксических состояний: нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и гемической гипоксии [319, 320]. Эти методики являются базисными моделями при поиске и изучении веществ с противогипоксической активностью.

В эксперименте было обнаружено, что конъюгат ДНА-глицин обладает выраженной противогипоксической активностью в условиях моделей нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и гемической гипоксии, что характеризуется статистически достоверным увеличением времени выживания животных в условиях гипоксий (см. Приложение). Противогипоксический эффект конъюгата ДНА-глицин имеет дозозависимый характер и усиливается с увеличением дозы от 10 до 20 мг/кг и выявляется как при однократном, так и при повторном введении. По противогипоксической активности в тесте нормобарической гипоксии конъюгат ДНА-глицин превосходит ДНА, не уступает глицину и препарату сравнения мексидолу, а в тесте гемической гипоксии существенно превосходит как ДНА и глицин, так и препарат сравнения мексидол [383].

### 4.5.2. Противоинсультная активность

Наличие у вещества противогипоксической и антиоксидантной активности является одним из факторов его потенциальной эффективности при лечении и профилактике инсульта. Это предположение было проверено экспериментально (см. Приложение). Было установлено что конъюгат ДНА-глицин в дозе 4 мг/кг и режиме введения в течение 7-ми дней после инсульта в противоположность нативному глицину не проявил эффективность при ишемическом инсульте, но на экспериментальной модели геморрагического инсульта продемонстрировал существенный позитивный эффект, выражающийся в уменьшении гибели животных, в ослаблении проявлений неврологического дефицита, улучшении нарушенных инсультом когнитивных функций и эмоционального статуса [384].

---

<sup>23</sup> Работы по изучению специфической активности изучаемых веществ были выполнены при консультативной помощи З.д.н. РФ, лауреата Государственной премии СССР и премии Правительства РФ д.м.н. проф. Т.А.Ворошиной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка систем доставки лекарственных веществ – одна из центральных проблем современной нанохимии и наномедицины. Поэтому в настоящее время получение и применение наночастиц в большей степени рассматривается в аспекте их использования для направленного транспорта известных сильнодействующих лекарственных веществ: антибиотиков, антималярийных, противовирусных, противоопухолевых и противотуберкулезных соединений, психотропных, гормональных и холиномиметических веществ. Наночастицы должны доставлять эти вещества в нужные орган или ткань-мишень, защищая препарат от инактивации и пролонгируя его действие. Наиболее часто для этих целей применяют липосомы, мицеллы, биodeградирующие полимеры и сополимеры, сывороточный альбумин, полисахариды, диоксид кремния. Все они обладают не только достоинствами, но и существенными недостатками, что приводит к необходимости поиска носителей с улучшенными физико-химическими и биофармацевтическими характеристиками. В последние годы для создания систем доставки лекарственных веществ активно изучаются наночастицы различных модификаций углерода: фуллерены, нанотрубки и детонационные наноалмазы (ДНА), причем последние наиболее перспективны.

Частица ДНА имеет алмазное ядро и нарушенную углеродную оболочку. На поверхности частицы ДНА находятся функциональные группы, локализуя некомпенсированные валентности. Первичная частица наноалмаза имеет размер всего 5 нм, что дает ей потенциальную возможность прохождения через любые биологические мембраны, включая гематоэнцефалический барьер. Однако, эти частицы обладают высокой адсорбционной и агрегативной активностью, что приводит к нестабильности суспензий ДНА. Повысить время жизни изолированных частиц ДНА можно модифицированием их поверхности. Химическое модифицирование поверхности ДНА позволяет целенаправленно влиять на физико-химические свойства ДНА, в том числе на его дезагрегацию и увеличение суспензионной устойчивости.

Применение ДНА в качестве носителя представляется перспективным вследствие возможности прививки практически любых групп лекарственных веществ с различным химическим строением. Прививая тем или иным способом лекарственную молекулу на поверхность ДНА, можно направленно варьировать субстрат-рецепторное взаимодействие и, тем самым, фармакодинамику лекарственного средства. В результате возможно целенаправленное влияние на строение, энергетическое состояние и реакционную способность фармакофоров лекарственных молекул. При этом дисперсность наночастицы должна существенно влиять на фармакокинетику препарата.

Таким образом, дисперсность, целенаправленное химическое модифицирование поверхности и иммобилизация лекарственного вещества могут позволить качественно повысить эффективность лекарственного средства. Наряду с этим возможно существенно уменьшить дозировку препарата, снизить или даже исключить токсичность и побочные эффекты, что особенно актуально в случае сильнодействующих социально значимых лекарственных веществ.

Выполненная работа заключается в исследовании влияния химического состава и модифицирования поверхности детонационного наноалмаза на его физико-химические и биологические свойства, а также в разработке высокоэффективных систем доставки социально значимых лекарственных веществ на основе модифицированных наноалмазов с привлечением широкого спектра современных методов анализа. В данной работе было выполнено:

1) Стандартизация промышленно выпускаемых ДНА для их использования как компонента лекарственного средства.

Разработан способ унификации поверхности ДНА путем его высокотемпературного гидрирования, способ дезагрегации ДНА (ультразвуковая обработка, центрифугирование), выявлена физико-химическая и биологическая неэквивалентность промышленных образцов ДНА, разработаны способы очистки наноалмаза от примесей железа, серы, нитрат-анионов, охарактеризованы основные примесные элементы в наноалмазе методами гамма-активационного анализа (ГАА) и индуктивно связанной плазмы с масс-спектрометрией (ИСП-МС).

Окисление ДНА газофазным способом было проведено в токе воздуха при 400 °С в течение 4 ч. Жидкофазное окисление частиц ДНА осуществлено в смеси кислот  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  в соотношении 1:3 при 100 °С в течение 24 ч. Измерение величины  $S_{\text{уд}}$  частиц ДНА методом тепловой десорбции показало, что в случае применения газофазного способа окисления значение  $S_{\text{уд}}$  увеличивается в 1,5 раза (от 223 м<sup>2</sup>/г до 330 м<sup>2</sup>/г). При жидкофазном окислении ДНА величина  $S_{\text{уд}}$  не меняется. Увеличение  $S_{\text{уд}}$  в процессе газофазного окисления ДНА связано с одновременно протекающими процессами удаления адсорбированных молекул с поверхности ДНА и дезагрегации его частиц, которая связана с разрывом межчастичных контактов. В случае использования жидкофазного окисления ДНА применение метода ПЭМ ультравысокого разрешения показало наличие у частиц ДНА структурных изменений их приповерхностного слоя. Эти изменения связаны с формированием вокруг частиц ДНА оболочки с размером до 1 нм, которая может состоять из образовавшегося при окислении ДНА луковичного и/или фуллереноподобного углерода.

Методом ИКС выявлено изменение природы кислородсодержащих групп на поверхности ДНА при его окислении. В ИК-спектрах исходных и окисленных образцов ДНА присутствуют полосы, соответствующие связанным водородными связями поверхностных –ОН групп и адсорбированной воды, а также валентным колебаниям С–Н связей. В случае газофазного

окисления, в основном, образуются ангидридоподобные и сложноэфирные группы, тогда как при жидкофазном окислении они отсутствуют, а происходит появление полос от эфирных связей. На некоторых образцах ДНА методом ИКС обнаружено наличие нитрат-ионов, которые остаются после выделения и очистки образцов. Окисление этих частиц обоими способами приводит к исчезновению характеристической полосы нитрат-иона. Это позволило нам предложить процесс окислительного модифицирования ДНА в качестве способа их дополнительной очистки.

Проведенное исследование показало, что газо- и жидкофазное окисление ДНА может приводить к отличающимся по своим свойствам окисленным ДНА, что открывает разнообразные пути их дальнейшего химического модифицирования и практического применения.

Применение ДНА в биомедицинских приложениях обуславливает их использование в качестве гидрозолей, что, в свою очередь, создает проблемы его стандартизации, диспергирования и определения концентрации частиц независимыми и простыми методами. Для измерения концентрации частиц наноалмаза использовали образцы разных торговых марок, в том числе, после химического модифицирования поверхности. Далее с применением ультразвуковой обработки готовили устойчивые гидрозоли с размерами частиц 20-50 нм и  $\zeta$ -потенциалом  $|30-40|$  мВ. Регистрировали их спектры поглощения в диапазоне 190–700 нм. Спектры поглощения ДНА не имеют характеристических полос поглощения и представляют собой гладкую, экспоненциально возрастающую при движении в УФ-область кривую, что характерно для слабопоглощающих и сильно рассеивающих образцов. Для построения градуировочной функции отсутствовали максимумы поглощения, связи чем для нее выбирали значения оптической плотности при длинах волн от 190 до 700 с определенным шагом. При построении калибровочной зависимости выбор длины волны будет определять предельные измеряемые концентрации гидрозолей. Зависимость оптической плотности от концентрации линейна во всем диапазоне концентраций и длин волн. Коэффициенты экстинкции возрастают с уменьшением длины волны излучения. Предположено, что коэффициент экстинкции может быть связан с размером частиц ДНА. Найдено, что для метод спектрофотометрии применим для определения концентрации частиц ДНА в гидрозоле в диапазоне 4-1000 мкг/мл.

Методом флуориметрии показано, что спектр люминесценции ДНА представляет собой широкую полосу в диапазоне 390-650 нм с плохо выраженной структурой и имеет максимум интенсивности фотолюминесценции при длине волны 488 нм. Из-за эффекта тушения люминесценции, был проведен поиск градуировочной зависимости с наилучшими показателями линейности ( $R^2 > 0,95$ ). В результате исследований для каждого типа ДНА, используя собственные люминесцентные свойства, выявлен диапазон измеряемых концентраций, который можно надежно измерить методом люминесцентного анализа, который составил 0.5 – 240 мкг/мл.

2) Созданы оригинальные методы визуализации ДНА *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Разработан способ визуализации модифицированных ДНА с применением рентгеновской компьютерной томографии (РКТ) на кроликах. Впервые синтезирован и применен наноалмаз с тритиевой меткой для визуализации частиц в организме экспериментальных животных (на примере мышей и крыс). Применен ИСП-МС анализ для визуализации наноалмаза с йодной меткой (трийодбензиловый спирт).

Люминесцентные свойства химически модифицированных ДНА позволяют использовать их в качестве оптических маркеров для визуализации процессов в клетках, тканях и органах. Для количественного определения ДНА в суспензиях и биологических жидкостях перспективно использовать введение меток на поверхность ДНА как ковалентно связанных, так и физически адсорбированных. Максимальную чувствительность можно получить при введении различных радиоизотопов на поверхность ДНА. Безусловно, наиболее подходящим радионуклидом для метки ДНА является  $^{14}\text{C}$ , но ввести его можно только на стадии синтеза ДНА. Однако, в качестве радиоактивной метки ДНА можно использовать и тритий ( $^3\text{H}$ ), а для его введения можно применить обработку ДНА атомами трития (метод термической активации трития - МТАТ). В данной работе в ДНА с помощью МТАТ была введена  $^3\text{H}$  - метка. После обработки ДНА атомами трития препараты выдерживали несколько суток в воде, осаждали ДНА центрифугированием, отделяли супернатант и добавляли новую порцию растворителя. Многократное повторение этой процедуры позволило удалить весь тритий из лабильных положений ДНА ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$  и др.), а также возможные радиоактивные примеси. В результате был получен препарат ДНА с удельной радиоактивностью 34 ГБк/г. В случае, когда метку вводили в восстановленный ДНА ( $\text{H}_2$ , 800 °С, 5 ч), его удельная радиоактивность оказалась равной 90 ГБк/г, хотя начальные радиоактивности препаратов были близки. Использование стабильного гидрозоля ДНА с частицами наноразмеров для нанесения монослоя на стенки реактора позволило с помощью МТАТ получить активность ДНА, равную 2600 ГБк/г. Это соответствует 50% от максимальной расчетной величины. Полученные значения удельной радиоактивности позволяют использовать  $^3\text{H}$ -ДНА для исследования их различных биофармацевтических свойств, в частности, трансмембранной проницаемости как *in vitro* так и *in vivo*.

3) Выполнена оптимизация методов химического модифицирования поверхности ДНА для повышения эффективности иммобилизации лекарственных веществ (оптимизированы методики гидрирования, хлорирования, окисления ДНА), осуществлена прививка на поверхность наноалмаза линкерных молекул - диаминов с разной длиной углеродной цепи, изучено влияние длины линкера на физико-химические свойства привитых ДНА);

4) Изучена трансмембранная проницаемость частиц НА и их конъюгатов через синтетическую и природную мембраны, а также проникновение в клетки (на примере HeLa) в зависимости от вида иммобилизованного лекарственного вещества во времени;

Изучение трансмембранной диффузии *in vitro* выполнялось на модельной мембране из целлофана в суспензии восстановленного ДНА с размером агрегатов 50 и 100 нм. Показано, что ДНА начинают проникать через мембрану через 1 час. Через 24 ч через мембрану прошло 6,4% наночастиц, а через 48 ч переход ДНА практически завершился, при этом общее количество проникших через мембрану частиц составило около 8%. То, что не все ДНА способны проникать через модельную мембрану может быть связано как с образованием крупных агрегатов, не проникающих через целлофан, так и их адсорбцией на внутренних стенках каналов мембраны. Дальнейшие исследования с ДНА различной степени дисперсности, с применением различных типов мембран и с использованием ультразвуковой обработки в процессе диализа помогут выяснить влияние различных факторов на диффузное проникновение ДНА через мембраны.

Поэтому актуальной задачей является изучение путей химического модифицирования наноалмаза и изучение влияния его химии поверхности на биологические характеристики *in vitro* и *in vivo*, включая клетки и субклеточные органеллы, ткани, органы и организм животного в целом, особенно, в аспекте применения наноалмаза в качестве носителя в системах доставки лекарственных веществ.

Изучено влияние модифицированных и коммерческих наноалмазов отечественных и зарубежных производителей на биоэнергетические свойства клетки, используя модель изолированных митохондрий (печень крысы). Проведено исследование динамики проникновения конъюгатов наноалмазов в клетки HeLa. Показано, что в течение 24 ч большая часть клеток содержит в цитоплазме свободно находящиеся (без эндоплазматической мембраны) агрегаты частиц наноалмаза, имеющие цепочечную морфологию..

5) Изучено биораспределение ДНА с использованием нескольких методов визуализации на 3 видах животных (мыши, крысы, кролики) при разных путях введения в течение от 15 мин до 6 месяцев. Установлено, что ДНА способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, имеют максимальное накопление в легких, обладают пролонгированным действием, выводятся с помощью выделительных систем организма и проявляют гепатопротекторное действие на печень (вероятно, за счет антиоксидантной активности).

б) Синтезированы конъюгаты ДНА с лекарственными и биологически активными веществами: центральным нейромедиатором аминокислотой глицином, аминокислотой цистеином, противотуберкулезным антибиотиком амикацином, интермедиатом цикла Кребса янтарной кислотой, а также с рядом ферментов (пирофосфатаза, трипсин, химотрипсин, папаин) с измененными спектрами их фармакологической активности.

Принципиальная сложность создания систем доставки ЛВ и/или БАВ состоит в необходимости нахождения доступных и экологически безопасных методов направленной иммобилизации биологически активных или лекарственных веществ на поверхность

наносителя. Основным методом модифицирования поверхности углеродных наночастиц до сих пор является использование процесса газофазного фторирования, который чрезвычайно сложен, опасен и дорогостоящ. В работе создан комплекс методов функционализации поверхности наноалмаза, один из которых использует дешевый и безопасный процесс жидкофазного хлорирования, а другой – эффект замещения атомов поверхностных функциональных групп на лекарственное вещество. Применяв эти методы, используя в качестве носителя наноалмаз детонационного синтеза, в работе впервые получены не содержащие атомов фтора системы доставки вышеперечисленных ЛВ.

При создании таких систем применяются два основных подхода: ковалентная прививка и адсорбция лекарственного вещества на поверхности ДНА. В работе проведено исследование адсорбции аминогликозидного антибиотика амикацина на химически модифицированных ДНА. Для этого использовали меченный тритием амикацин с радиоактивностью 15,3 ГБк/г и ДНА с гидрированной и окисленной поверхностями, содержащие по данным ИКС –Н (ДНА–Н) и –СООН (ДНА–СООН) группы, соответственно. Показано, что адсорбция амикацина на поверхности ДНА существенно зависит от химии этой поверхности. Так, для ДНА–СООН и ДНА–Н значение равновесной адсорбции амикацина составило до 130 и 50 мг/г ДНА, а после промывки количество амикацина уменьшилось до 48 и 22 мг/г, соответственно. Исследование стабильности водных растворов полученных систем в течение 1 месяца показало, что на поверхности гидрированного и окисленного ДНА остается до 71 и 80% амикацина, соответственно. Использование эффекта изменения сорбции лекарственных веществ при варьировании химического состава поверхности ДНА позволяет повысить эффективность создаваемых систем доставки на основе ДНА.

7) Определены значения  $LD_{50}$  (а также  $LD_{10}$  и  $LD_{90}$ ) ДНА и его конъюгата с глицином (крысы, внутрибрюшинное введение), составляющие 3,4 и 2,7 г/кг, соответственно. Это позволяет отнести данные вещества к IV классу малотоксичных веществ.

9) Изучена антибактериальная активность конъюгата ДНА с амикацином на 8 бактериальных штаммах (от 64 мкг/мл до 0,25 мкг/мл). Показано изменение спектра фармакологического действия амикацина (снижение минимальной ингибирующей концентрации в 2-4 раза).

10) Изучены антигипоксическая, антиоксидантная и противоинсультная активности синтезированного конъюгата ДНА с глицином в сравнении с нативной аминокислотой и препаратами сравнения. В результате исследований было обнаружено новое фундаментальное явление – способность лекарственного вещества при иммобилизации на поверхности ДНА изменять спектр фармакологической активности вследствие супрамолекулярного взаимодействия молекул лекарственного вещества с поверхностью ДНА. На основании этого

эффекта объяснено не только усиление фармакологического эффекта глицина (а также амикацина), но и появление новых свойств, которые ЛВ ранее не проявляло. Фармакологический эффект полученного в работе конъюгата ДНА с глицином в ряде случаев превосходит действие высокоэффективного отечественного препарата мексидола. Использование обнаруженного эффекта позволяет разработать новый класс оригинальных лекарственных средств, превосходящих по своей эффективности существующие ЛС для лечения не только инфекционных социально-значимых болезней, но также болезней нервной системы, включая, психические и неврологические заболевания [380, 375, 384, 382, 385, 386, 387, 388, 389, 390].

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Методами ПЭМ, ДРС, ДСК, ИКС, РФЭС выявлена физико-химическая, методами ИСП-МС и ГАА примесная (химическая) и методом измерения бактериальной люминесценции биологическая неэквивалентности промышленных образцов ДНА разных марок. Разработан способ унификации и стандартизации поверхности ДНА путем его высокотемпературного гидрирования. Разработаны способы кислотно-щелочной очистки ДНА от примесей железа, серы, нитрат-анионов.

2. Разработан способ дезагрегации (до 10-15 нм) и получения стабильных (свыше 1 года) гидрозолей ДНА с помощью комплексного подхода, включающего химическое модифицирование, ультразвуковую обработку и центрифугирование. Разработан способ определения концентрации ДНА в гидрозолях с помощью спектрофотометрии и флуориметрии в диапазонах 4-1000 и 0,5-117 мкг/мл, соответственно.

3. Оптимизированы методы химического модифицирования поверхности ДНА для повышения эффективности иммобилизации лекарственных и/или биологически активных веществ (оптимизированы методики гидрирования, хлорирования, окисления ДНА) и синтезированы конъюгаты ДНА с лекарственными и биологически активными веществами: аминокислотами глицином и цистеином, противотуберкулезным антибиотиком амикацином, интермедиатом цикла Кребса янтарной кислотой, а также с ферментами (трипсин, химотрипсин, папаин, неорганическая пирофосфатаза). В определенных диапазонах *pH* и температуры обнаружено повышение стабильности ферментов при их иммобилизации на ДНА.

4. Разработан способ визуализации *ex vivo* модифицированных ДНА с йодной меткой (трийодбензиловый спирт) на основе метода ИСП-МС анализа. Впервые синтезирован ДНА с тритиевой меткой и применен для визуализации частиц *ex vivo* с помощью метода жидкостной сцинтилляционной спектрометрии (ЖСС).

5. Впервые изучена трансмембранная проницаемость частиц ДНА через модельную (целлофан) и биомембрану (вывернутую кишку крысы), коэффициенты диффузии находятся в диапазоне  $(0,5-1) \cdot 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/с. Показано, что через мембрану ДНА с размером агрегатов 50 нм проходит в 2 раза меньше по массе (пьезокварцевое микровзвешивание) по сравнению с агрегатами размером 100 нм. Показано увеличение количества прошедших частиц ДНА через модельную мембрану с 9% до 50% при приложении ультразвуковой обработки. Показан симбатный характер прохождения частиц ДНА через модельную и биомембрану.

6. Впервые показано, что динамика проникновения ДНА в клетки зависит от вида иммобилизованного на нем ЛВ и/или БАВ. Показано, что ДНА проникают в клетки уже через 15

мин инкубации, накапливаются в клетках в виде цепочечных агрегатов, находятся в цитозоле без мембраны и не оказывают токсического действия на структурные элементы клетки.

7. Впервые изучено биораспределение ДНА с использованием нескольких методов визуализации на 3 видах экспериментальных животных (мыши, крысы, кролики) при разных путях введения в течение от 15 мин до 6 месяцев. Установлено, что ДНА способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, имеют максимальное накопление в легких и постепенно выводятся из организма. Определены значения  $LD_{50}$  ДНА и конъюгата ДНА-глицин (крысы, внутрибрюшинное введение), составляющие 3,4 и 2,7 г/кг, соответственно, что позволяет отнести данные вещества к IV классу (малотоксичные вещества).

8. На штаммах *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* показано снижение минимальной бактерицидной концентрации конъюгата ДНА с амикацином в 2-4 раза по сравнению с нативным амикацином. Показано, что ДНА в дозе 20-100 мг/мл обладает дозозависимой антирадикальной активностью. Конъюгат ДНА-глицин в диапазоне концентраций 20-100 мкг/мл обладает отчетливой антирадикальной активностью, ингибируя хемилюминесценцию в системе 3-оксипиридин-пероксидаза-пероксид водород (до 25,75 раза) и превосходит по этому показателю глицин и препарат сравнения мексидол.

9. Впервые выявлены и изучены антиоксидантная, антигипоксическая и противоинсультная активность синтезированного конъюгата ДНА-глицин в сравнении с нативным глицином, ДНА и лекарственными препаратами сравнения. Показано, что конъюгат ДНА-глицин в каждом случае при меньшей дозировке превосходит действие глицина, а, в ряде случаев, демонстрирует новый вид фармакологической активности, не проявляемой нативным глицином. Обнаружено явление изменения интенсивности и спектра специфической активности лекарственного вещества при его мобилизации на поверхности наночастицы (ДНА) – рабочее название «эффект амплификации модифицирующей активности БАВ». Предложена гипотеза о механизме этого явления за счет образования супрамолекулярного комплекса при межмолекулярном взаимодействии иммобилизуемого ЛВ с поверхностью ДНА.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Detonation Nanodiamonds: Science and Applications / eds.: A. Vul', O. Shenderova. – Boca Raton: Pan Stanford Publishing, 2013. – 346 p.
2. Nanodiamond / ed.: O.A. Williams. – London: The Royal Society of Chemistry, 2014. – 521 p.
3. Nanodiamonds: Applications in Biology and Nanoscale Medicine / ed.: D. Ho. – N.Y.: Springer Science + Business Media, 2010. – 286 p.
4. Наноалмазы детонационного синтеза: получение и применение / П.А. Витязь [и др.]; под общ. ред. П.А. Витязя. – Минск: Беларус. навука, 2013. – 381 с.
5. Ultrananocrystalline diamond, synthesis, properties, and application / eds.: O. Shenderova, D. Gruen. – Kidlington: William Andrew Pub., 2006. – 611 p.
6. Ho D. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development and personalized medicine / D. Ho, C.H.K. Wang, E.K.H. Chow // Sci. Adv. – 2015. – Vol. 1, № 7. – P. e1500439.
7. Fellman M. Nanodiamond-drug combo significantly improves treatment of chemotherapy-resistant cancers [Electronic resource]. – 2011. – URL: <http://www.northwestern.edu/newscenter/stories/2011/03/nanodiamonds-chemotherapy-drug-resistance.html>.
8. Feynman R.P. There's plenty of room at the bottom / R.P. Feynman // Engineering and Science. – 1960. – Vol. 23, № 5. – P. 22-36.
9. Taniguchi N. On the basic concept of nano-technology / N. Taniguchi // In: Proc. Int. Conf. Prod. Eng / Japan Society of Precision Engineering. – Tokyo, 1974. – Part II. – P. 72-94.
10. Drexler K.E. Engine of Creation: The Coming Era of Nanotechnology / K.E. Drexler. – N.Y.: Ancor Press/Doubleday, 1986. – 298 p.
11. Жоаким К. Нанонауки. Невидимая революция : пер. с фр. / К. Жоаким, Л. Плевер. – М.: КоЛибри, 2009. – 240 с.
12. Фахльман Б.Д. Химия новых материалов и нанотехнологии: учебное пособие : пер. с англ. / Б. Фахльман; Д.О. Чаркин, В.В. Уточникова; под ред. Ю.Д. Третьяков, Е.А. Гудилин. – Долгопрудный : Изд. Дом «Интеллект», 2011. – 464 с.
13. Nanomedicine in drug delivery / Eds. A. Kumar [et al.]. – Boca Raton: CRC Press, 2013. – 469 p.
14. Нанотехнологии в фармакологии / А. М. Дыгай [и др.]. – М.: Изд-во РАМН, 2011. – 135 с.
15. Демина Н.Б. Стратегии развития и биофармацевтические аспекты систем доставки лекарств / Н.Б. Демина, С.А. Скاتков // Рос. хим. журн. – 2012. – Т. 56, № 3-4. – С. 5-10.

16. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и системы доставки лекарств: особенности фармакокинетики и клиническая эффективность / Ю.Б. Белоусов [и др.]. – М.: Литтера, 2011. – 656 с.
17. Наноструктуры в биомедицине : пер. с англ. / под ред. К. Гонсалвес [и др.]. – 2-е изд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 519 с.
18. Ranade V.V. Drug delivery systems / V.V. Ranade, J. B. Cannon. – 3th ed. – Boca Raton: CRC press, 2011. – 608 p.
19. Vrignaud S. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles / S. Vrignaud, J.P. Benoit, P. Saulnier // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, № 33. – P. 8593-8604.
20. Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms / R.G. Mendes [et al.] // *J. Mater. Chem. B*. – 2013. – Vol. 1, № 4. – P. 401-428.
21. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon / S. Iijima // *Nature*. – 1991. – Vol. 354, № 6348. – P. 56-58.
22. Роснано. Лауреат Г.В. Сакович [Электронный ресурс]. – 2011. – URL : <http://www.rusnanoprize.ru/ru/laureate/6/>.
23. Bianco A. Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable / A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato // *Chem. Commun.* – 2011. – Vol. 47, № 37. – P. 10182-10188.
24. Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds / A.M. Schrand [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2007. – Vol. 16, № 12. – P. 2118-2123.
25. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond / X. Zhang [et al.] // *Toxicol. Res.* – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 62-68.
26. Kirpatovsky V.I. Medical applications of carbynoid materials / V.I. Kirpatovsky // *Carbyne and Carbynoid Structures*. – 1999. – Springer Netherlands. – P. 427-435.
27. Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: targeting doxorubicin to tumors / L. Meng [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33, №. 6. – P. 1689-1698.
28. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery / Z. Liu [et al.] // *ACS Nano*. – 2007. – Vol. 1. № 1. – P. 50-56.
29. Covalently combining carbon nanotubes with anticancer agent: preparation and antitumor activity / W. Wu [et al.] // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 3, № 9. – P. 2740-2750.

30. Increased paclitaxel cytotoxicity against cancer cell lines using a novel functionalized carbon nanotube/ Z. Sobhani [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2011. – Vol. 6. – P. 705-719.
31. Augmented anticancer activity of a targeted, intracellularly activatable, theranostic nanomedicine based on fluorescent and radiolabeled, methotrexate-folic acid-multiwalled carbon nanotube conjugate/ M. Das [et al.] // *Molecular pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 10, № 7. – P. 2543-2557.
32. Carbon nanotube bottles for incorporation, release and enhanced cytotoxic effect of cisplatin / J. Li [et al.] // *Carbon*. – 2012. – Vol. 50, № 4. – P. 1625-1634.
33. Kesharwani P. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA / P. Kesharwani, V. Gajbhiye, N.K. Jain // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33, № 29. – P. 7138-7150.
34. Targeted killing of *Leishmania donovani* in vivo and in vitro with amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes / V.K. Prajapati [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – P. dkr002.
35. The response of peritoneal macrophages to dapson covalently attached on the surface of carbon nanotubes / G.D. Vuković [et al.] // *Carbon*. – 2010. – Vol. 48, № 11. – P. 3066-3078.
36. Chemistry of carbon nanotubes / D. Tasis [et al.] // *Chem. Rev.* – 2006. – Vol. 106, № 3. – P. 1105-1136.
37. Critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics / H.J. Johnston [et al.] // *Nanotoxicology*. – 2010. – Vol. 4, № 2. – P. 207-246.
38. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents / L.L. Dugan [et al.] // *PNAS*. – 1997. – Vol. 94, № 17. – P. 9434-9439.
39. Fullerenolates: metallated polyhydroxylated fullerenes with potent anti-amyloid activity / A.G. Bobylev [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. – Vol. 9. – P. 5714-5719.
40. Fullerol antagonizes dexamethasone-induced oxidative stress and adipogenesis while enhancing osteogenesis in a cloned bone marrow mesenchymal stem cell / H.J. Liu [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2012. – Vol. 30, № 7. – P. 1051–1057.
41. Application of fullerenes in nanomedicine: an update / A. Dellinger [et al.] // *Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8, № 7. – P. 1191-1208.
42. Application of C60 Fullerene-Doxorubicin Complex for Tumor Cell Treatment In Vitro and In Vivo / R.R. Panchuk [et al.] // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2015. – Vol. 11. – P. 1139-1152.

43. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture / T.Y. Zakharian [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127, № 36. – P. 12508-12509.
44. Genotoxicity evaluation of fullerene C 60 nanoparticles in a comet assay using lung cells of intratracheally instilled rats / M. Ema [et al.] // *Regul. Toxicol. Pharm.* – 2012. – Vol. 62, № 3. – P. 419-424.
45. Geim A.K. The rise of graphene / A.K. Geim, K.S. Novoselov // *Nat. Mater.* – 2007. – Vol. 6, № 3. – P. 183-191.
46. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems / K. Yang [et al.] // *Small.* – 2013. – Vol. 9, № 9-10. – P. 1492-1503.
47. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide / W. Zhang [et al.] // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, № 33. – P. 8555-8561.
48. Zhou T. Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier / T. Zhou, X. Zhou, D. Xing // *Biomaterials.* – 2014. – Vol. 35, № 13. – P. 4185-4194.
49. A small-sized graphene oxide supramolecular assembly for targeted delivery of camptothecin / Y.M. Zhang [et al.] // *Chem. Comm.* – 2014. – Vol. 50, № 86. – P. 13066-13069.
50. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs / Z. Liu [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130, № 33. – P. 10876-10877.
51. Functionalized nanoscale graphene oxide for high efficient drug delivery of cisplatin / L. Tian [et al.] // *J. Nanopart. Res.* – 2014. – Vol. 16, № 11. – P. 1-14.
52. Graphene oxide–polyethylenimine nanoconstruct as a gene delivery vector and bioimaging tool / H. Kim [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 2011. – Vol. 22, № 12. – P. 2558-2567.
53. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide / X. Yang [et al.] // *J. Phys. Chem. C.* – 2008. – Vol. 112, № 45. – P. 17554-17558.
54. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice / K. Yang [et al.] // *ACS Nano.* – 2011. – Vol. 5, № 1. – P. 516-522.
55. Supramolecular chemistry of fullerenes and carbon nanotubes / eds.: N. Martin, J.F. Nierengarten. – Singapore: John Wiley & Sons, 2012. – 418 p.
56. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress / A.A. Shvedova [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 261, № 2. – P. 121-133.

57. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond / X. Zhang [et al.] // *Toxicol. Res.* – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 62-68.
58. Man H.B. Nanodiamonds as platforms for biology and medicine / H.B. Man, D. Ho // *J. Lab. Autom.* – 2013. – Vol. 18, № 1. – P. 12-18.
59. Levinson A.A. Diamond sources and their discovery / A.A. Levinson // *The nature of diamonds* / ed.: G.E. Harlow. – Cambridge: Cambridge University Press, 1998. – Chapter 4. – P. 72-104.
60. Erohin S.V. Elastic properties of nanopolycrystalline diamond: The nature of ultrahigh stiffness / S.V. Erohin, P.B. Sorokin // *Appl. Phys. Lett.* – 2015. – V. 107, № 12. – P. 121904.
61. Физические свойства алмаза : справочник / под ред. Н.В. Новикова. – Киев: Наукова думка, 1987. – 188 с.
62. Орлов Ю.Л. Минералогия алмаза / Ю.Л. Орлов; под ред. Г.П. Барсанова. – 2-е изд. – М.: Наука, 1984. – 170 с.
63. Wilks J. Properties and applications of diamond / J. Wilks, E. Wilks. – Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. – 525 p.
64. Schwander M. A review of diamond synthesis by CVD processes / M. Schwander, K. Partes // *Diamond Relat. Mater.* – 2011. – Vol. 20, № 9. – P. 1287-1301.
65. DeCarli P.S. Formation of diamond by explosive shock / P.S. DeCarli, J.C. Jamieson // *Science.* – 1961. – Vol. 133, № 3467. – P. 1821-1822.
66. Получение алмазных кластеров взрывом и их практическое использование / Г.Е. Сакович [и др.] // *Рос. хим. журн.* – 1990. – Т. 35, № 5. – С. 600-608.
67. А.с. 339134 СССР, МКИ2, С 01 В 31/06. Способ наращивания граней алмаза / Б.В. Спицын, Б.В. Дерягин (СССР). – № 964957/23-26; заявл. 10.07.1956; опубл. 12.05.1980, Бюл. № 17. – 2 с.
68. Руденко А.П. Химический синтез алмаза / А.П. Руденко, И.И. Кулакова, В.Л. Скворцова // *Усп. химии.* – 1993. – Т. 62, № 2. – С. 99-117.
69. Долматов В.Ю. Детонационные наноалмазы: синтез, строение, свойства и применение / В.Ю. Долматов // *Усп. химии.* – 2007. – Т. 76, № 4, – С. 375-397.
70. High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds / J.P. Boudou [et al.] // *Nanotechnology.* – 2009. – Vol. 20, № 23. – P. 235602.
71. Induced nucleation of diamond powder / M. Frenklach [et al.] // *Appl. Phys. Lett.* – 1991. – Vol. 59, № 5. – P. 546-548.

72. Yang G.W. Preparation of nano-crystalline diamonds using pulsed laser induced reactive quenching / G.W. Yang, J.B. Wang, O.X. Liu // *Journal of Physics: Condensed Matter*. – 1998. – Vol. 10, № 35. – P. 7923.
73. Structure of carbon produced by hydrothermal treatment of  $\beta$ -SiC powder / Y.G. Gogotsi [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 1996. – Vol. 6, № 4. – P. 595-604.
74. Welz S. Nucleation, growth, and graphitization of diamond nanocrystals during chlorination of carbides / S. Welz, Y. Gogotsi, M.J. McNallan // *J. Appl. Phys.* – 2003. – Vol. 93, № 7. – P. 4207-4214.
75. Production of nanodiamonds by high-energy ion irradiation of graphite at room temperature / T.L. Daulton [et al.] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. Section B: Beam Interactions with Mater. and Atoms.* – 2001. – Vol. 175. – P. 12-20.
76. Экспериментальное подтверждение синтеза алмаза в процессе кавитации / Э.М. Галимов [и др.] // *ДАН.* – 2004. – Т. 395, № 2. – С. 187-191.
77. Волков К.В. Синтез алмаза из углерода продуктов детонации ВВ / К.В. Волков, В.В. Даниленко, В.И. Елин // *Физика горения и взрыва.* – 1990. – Т. 26, № 3. – С. 123-125.
78. Кулакова И.И. Химия поверхности наноалмаза / И.И. Кулакова // *ФТТ.* – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 621-628.
79. Строение частиц химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза / И.И. Кулакова [и др.] // *Росс. нанотехнологии.* – 2010. – Т. 5, № 7-8 – С. 32-39.
80. Alexensky A.E. Modification of surface and the physicochemical properties of nanodiamonds / A.E. Alexensky, M.A. Yagovkina, A.Ya. Vul' // *Phys. Solid State.* – 2004. – Vol. 46, № 4. – P. 685-686.
81. Особенности строения детонационных наноалмазов по результатам электронно-микроскопических исследований / Е.М. Байтингер [и др.] // *ФТТ.* – 2012. – Т. 54, № 8, – С. 1606-1613.
82. The structure of diamond nanoclusters / A.E. Aleksenskii [et al.] // *Physics of the solid state.* – 1999. – V. 41, № 4. – P. 668-671.
83. Shenderova O.A. Science and engineering of nanodiamond particle surfaces for biological applications (Review) / O.A. Shenderova, G.E. McGuire // *Biointerphases.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 030802.
84. Barnard A.S. Crystallinity and surface electrostatics of diamond nanocrystals / A.S. Barnard, M. Sternberg // *J. Mater. Chem.* – 2007. – Vol. 17, № 45. – P. 4811-4819.

85. Lai L. Anisotropic adsorption and distribution of immobilized carboxyl on nanodiamonds / L. Lai, A.S. Barnard // *Nanoscale*. – 2011. – Vol. 3. – P. 958–962.
86. Долматов В.Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза: свойства и применение / В.Ю. Долматов // *Успехи химии*. – 2001. – Т. 70, № 7. – С. 687-708.
87. Долматов В.Ю. Детонационные наноалмазы. Получение, свойства, применение / В.Ю. Долматов. – СПб.: Изд. НПО «Профессионал», 2011. – 536 с.
88. Surface peculiarities of detonation nanodiamonds in dependence of fabrication and purification methods / D. Mitev [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2007. – Vol. 16, № 4. – P. 776-780.
89. Долматов В.Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза. Получение, свойства, применение / В.Ю. Долматов. – СПб.: Изд. СПбГПУ, 2003. – 344 с.
90. Губаревич Т.М. Химическая очистка ультрадисперсных алмазов / Т.М. Губаревич, Р.Р. Сатаев, В.Ю. Долматов // *Сб. докл. V Всесоюз. совещ. по детонации*. – Красноярск, 1991. – Т. 1. – С. 135-139.
91. Верещагин А.Л. Очистка алмазов / А.Л. Верещагин, И.С. Ларионова // *Ползуновский альманах*. – 1999. – № 3 – С. 74-82.
92. Пат. РФ 2019502. Способ удаления примеси неалмазного углерода и устройство для его осуществления / Е.В. Павлов [и др.]. Опубл. 15.09.1994.
93. Screening of elemental impurities in commercial detonation nanodiamond using sector field inductively coupled plasma-mass spectrometry / D.P. Mitev [et al.] // *J. Mater. Sci.* – 2014. – Vol. 49. – P. 3573-3591.
94. Determination of impurities in detonation nanodiamonds by gamma activation analysis method / R.Y. Yakovlev [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2015. – Vol. 55. – P. 77-86.
95. Волков Д.С. Комплексные подходы к характеристике наноалмазов детонационного синтеза и их коллоидных растворов: дис. ... канд. хим. наук : 02.00.02, 02.00.04/ Д.С. Волков ; МГУ им. М.В. Ломоносова. – М., 2015. – 238 с.
96. Direct sector field ICP-MS determination of metal impurities in detonation nanodiamond / D.P. Mitev [et al.] // *Carbon*. – 2013. – Vol. 60. – P. 326-334.
97. Volkov D.S. Elemental analysis of nanodiamonds by inductively-coupled plasma atomic emission spectroscopy / D.S. Volkov, M.A. Proskurnin, M.V. Korobov // *Carbon*. – 2014. – V. 74. – P. 1-13.

98. Volkov D.S. Survey study of mercury determination in detonation nanodiamonds by pyrolysis flameless atomic absorption spectroscopy / D.S. Volkov, M.A. Proskurnin, M.V. Korobov // *Diamond Relat. Mater.* – 2014. – Vol. 50. – P. 60–65.
99. Rapid sol–gel synthesis of nanodiamond aerogel / S. Manandhar [et al.] // *J. Mater. Res.* – 2014. – Vol. 29, №. 24. – P. 2905-2911.
100. Frontasyeva M.V. Neutron activation analysis for the Life Sciences / M.V. Frontasyeva // *Phys. Particles and Nuclei.* – 2011. – Vol. 42. – P. 332-378.
101. Химия привитых поверхностных соединений / под ред. Г.В. Лисичкина. – М.: Физматлит, 2003. – 592 с.
102. Алесковский В.Б. Химия надмолекулярных соединений / В.Б. Алесковский. – СПб.: Изд-во ЛГУ, 1996. – 256 с.
103. Корольков В. В. Химическое модифицирование поверхности наноалмазов детонационного синтеза : дис.. канд. хим. наук : 02.00.04 / В.В. Корольков ; МГУ им. М.В. Ломоносова. – М., 2008. – 118 с.
104. Влияние жидкофазного окисления на поверхностные свойства синтетических алмазов / С.К. Гордеев [и др.] // *Сверхтвёрдые материалы.* – 1979. – № 3. – С. 27-29.
105. Формирование и стабилизация суспензий наноалмазов в жидких средах / А.П. Возняковский [и др.] // *Сверхтвердые материалы.* – 2002. – № 6. – С. 22.
106. Krueger A. Functionality is key: recent progress in the surface modification of nanodiamond / A. Krueger, D. Lang // *Adv. Funct. Mater.* – 2012. – Vol. 22. – P. 890-906.
107. Luminescent nanodiamonds for biomedical applications / M.S. Jana [et al.] // *Biophys. Rev.* – 2011. – Vol. 3. – P. 171–184.
108. Chao J.I. Nanometer-sized diamond particle as a probe for biolabeling / J.I. Chao, E. Perevedentseva, P.H. Chung // *Biophys J.* – 2007. – Vol. 93 – P. 2199–2208.
109. Fundamentals of chemical purification of detonation nanodiamond soot using nitric acid / V.G. Sushchev [et al.] // *J. Superhard Mater.* 2008. – Vol. 30, № 5. – P. 297–304.
110. Surface-modified diamond nanoparticles as antigen delivery vehicles / N. Kossovsky [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 1995. – Vol. 6, № 5. – P. 507–511.
111. Effect of sodium oleate adsorption on the colloidal stability and zeta potential of detonation synthesized diamond particles in aqueous solutions / X. Xu [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2005. – Vol. 14. – P. 206–212.

112. Detonation nanodiamonds simultaneously purified and modified by gas treatment / I. Petrov [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2007. – Vol. 16. – P. 2098-2103.
113. Modification of detonation nanodiamonds by heat treatment in air / O. Shenderova [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2006. – Vol. 15. – P. 1799-1803.
114. DNA-modified diamond surfaces / T. Knickerbocker [et al.] // *Langmuir.* – 2003. – Vol. 19. – P. 1938–1942.
115. Saini G. Amino-modified diamond as a durable stationary phase for solid-phase extraction / G. Saini, L. Yang, M.L. Lee // *Anal. Chem.* – 2008. – Vol. 80. – P. 6253-6259.
116. Chemical modification of diamond surfaces using a chlorinated surface as an intermediate state / T. Ando [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 1996. – Vol. 5. – P. 1136-1142.
117. Liang Y.J. A general procedure to functionalize agglomerating nanoparticles demonstrated on nanodiamond. / Y.J. Liang, M. Ozawa, A. Krueger // *ACS Nano.* – 2009 – Vol. 3. – P. 2288-2296.
118. Organic functionalization of ultradispersed nanodiamond: synthesis and applications / W.W. Zheng [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2009. – Vol. 19, № 44. – P. 8432–8441.
119. General strategy for high-density covalent functionalization of diamond nanoparticles using fenton chemistry / R. Martin [et al.] // *Chem. Mater.* – 2009. – V. 21, – № 19. – P. 4505-4514.
120. Functionalization of Nanoscale Diamond Powder: Fluoro-, Alkyl-, Amino-, and Amino Acid-Nanodiamond Derivatives / Y. Liu [et al.] // *Chem. Mater.* – 2004. – Vol. 16, № 20. – P. 3924-3930.
121. Khabashesku V.N. Functionalized carbon nanotubes and nanodiamonds for engineering and biomedical applications / V.N. Khabashesku, J.L. Margrave, E.V. Barrera // *Diamond Relat. Mater.* – 2005. – Vol. 14, № 3-7. – P. 859-866.
122. Polymer-functionalized nanodiamond platforms as vehicles for gene delivery / X.Q. Zhang [et al.] // *ACS Nano.* – 2009. – Vol. 3, № 9. – P. 2609-2016.
123. Facile surface functionalization of nanodiamonds / I.P. Chang [et al.] // *Langmuir.* – 2010. – Vol. 26, № 5. – P. 3685-3689.
124. Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications / A. Krüger [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2006. – Vol. 16, № 24. – P. 2322-2328.
125. Christiaens P. EDC-mediated DNA attachment to nanocrystalline CVD diamond films / P. Christiaens, V. Vermeeren, S. Wenmackers // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – Vol. 22. – P. 170-177.

126. Yeap W.S. Detonation nanodiamond: an organic platform for the suzuki coupling of organic molecules / W.S. Yeap, S. Chen, K.P. Loh // *Langmuir*. – 2009. – Vol. 25. – P. 185–191.
127. Functionalization of diamond nanoparticles using “click” chemistry / A. Barras [et al.] // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26, № 16. – P. 13168-13172.
128. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances / K.V. Purtov [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – Vol. 5. – P. 631-636.
129. Covalent immobilization of DNA on diamond and its verification by diffuse reflectance infrared spectroscopy / K. Ushizawa [et al.] // *Chem. Phys. Lett.* – 2002. – Vol. 351. – P. 105-108.
130. Direct interaction of elemental fluorine with diamond surfaces / T. Ando [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 1996. – Vol. 5. – P. 1021-1025.
131. Chemical modification of diamond powder using photolysis of perfluoroazooctane / T. Nakamura [et al.] // *Chem Commun.* – 2003. – № 7. – P. 900–901.
132. Miller J.B. Photochemical Modification of Diamond Surfaces / J.B. Miller, D.W. Brown // *Langmuir*. – 1996. – Vol. 12, № 24. – P. 5809-5817.
133. Reactivity of the hydrogen atoms on diamond surface with various radical initiators in mild condition / T. Tsubota [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2002. – Vol. 11. – P. 1360-1365.
134. Dual reaction capacity of hydrogenated nanodiamond. / V.V. Korolkov [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2007. – Vol. 16, № 12. – P. 2129–2132.
135. Arnault J.C. Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma / J.C. Arnault // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2011. – Vol. 13. – P. 11481-11487.
136. Electrical conductivity of thermally hydrogenated nanodiamond powders / T. Kondo [et al.] // *J. Appl. Phys.* – 2013. – Vol. 113, № 21. – P. 214307.
137. Xu N.S. Effect of heat treatment on the properties of nano-diamond under oxygen and argon ambient / N.S. Xu, J. Chen, S.Z. Deng // *Diamond Relat. Mater.* – 2002. – Vol. 11, № 2. – P. 249-256.
138. High temperature functionalization and surface modification of nanodiamond powders / V.N. Mochalin [et al.] // *MRS Proceedings*. – Cambridge: Cambridge University Press, 2007. – Vol. 1039. – P11.
139. Inroad to modification of detonation nanodiamond / B.V. Spysyn [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2006. – Vol. 15, № 2. – P. 296-299.

140. Сакович Г.В. Синтез, свойства, применение и производство наноразмерных синтетических алмазов / Г.В. Сакович, В.Ф. Комаров, Е.А. Петров // *Сверхтвёрдые материалы*. – 2002. – № 3. – С. 3-18; №4. – С. 8-23.
141. Determination of size, morphology, and nitrogen impurity location in treated detonation nanodiamond by transmission electron microscopy / S. Turner [et al.] // *Adv. funct. mat.* – 2009. – Vol. 19. – P. 2116-2124.
142. Xie H. Thermal performance enhancement in nanofluids containing diamond nanoparticles / H. Xie, W. Yu, Y. Li // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2009. – Vol. 42, №. 9. – P. 095413.
143. Surface-induced charge state conversion of nitrogen-vacancy defects in nanodiamonds / L. Rondin [et al.] // *Physic. Rev. B.* – 2010. – Vol. 82, № 11. – P. 115449.
144. Facile approach to functionalize nanodiamond particles with V-shaped polymer brushes / J. Cheng [et al.] // *Chem. Mater.* – 2008. – Vol. 20, № 13. – P. 4224-4230.
145. Size-dependent surface CO stretching frequency investigations on nanodiamond particles / J.S. Tu [et al.] // *J. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 125, № 17. – P. 174713.
146. Sappok R. Chemie der oberflashe des diamanten-II. Bildung, eigenschaften und structur der oberflachenoxide / R. Sappok, H.P. Boehm // *Carbon*. – 1968. – Vol. 6, № 5. – P. 573-588.
147. Долматов В.Ю. Модифицированный способ получения детонационных наноалмазов и их реальный элементный состав / В.Ю. Долматов // *Журн. прикл. химии*. – 2008. – Т. 81, вып. 10. – С. 1620-1627.
148. Атякшева Л.Ф. Изменение структурных характеристик углеродных материалов под воздействием озона / Л.Ф. Атякшева, Г.И. Емельянова // *Ж. физ. химии*. – 1982. – Т. 56, № 12. – С. 2657-2629.
149. Touhara H. Property control of carbon materials by fluorination / H. Touhara, F. Okino // *Carbon*. – 2000. – Vol. 38. – P. 241–267.
150. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ / Р.Ю. Яковлев [и др.] // *Росс. хим. журн.* – 2012. – Т. 56, № 56. – С. 114–125.
151. Pat. US9254340. Nanodiamond and glycine conjugate and method for the preparation thereof / R.Y. Yakovlev. Public. 09.02.2016.
152. Pat. EP2662080. Nano-diamond conjugate with glycine and method for producing said conjugate / R.Y. Yakovlev. Public 2.12.2015.

153. Пат. РФ 2560700. Конъюгат наноалмаза с глицином и способ его получения / Р.Ю.Яковлев. Оpubл. 20.04.2015.
154. The effect of diamond surface termination species upon field emission properties / P.W. May [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 1998. – Vol. 7, № 2-5. – P. 671-676.
155. Halogenation and butylation of diamond surfaces by reactions in organic solvents / Y. Ikeda [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 1998. – Vol. 7, № 6. – P. 830-834.
156. Surface modification of detonation nanodiamond with ethylenediamine and hexamethylenediamine / R.Y. Yakovlev [et al.] // *Mendeleev Commun.* – 2012. – Vol. 22, № 4. – P. 213-214.
157. Денисов С.А. Газофазное модифицирование и электрофизические свойства детонационного наноалмаза : автореф. дис. ... канд. хим. наук. : 02.00.04 / С.А. Денисов ; ИФХЭ РАН. – М., 2013. – 25 с.
158. Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications / T.L. Wee [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2009. – V. 18, № 2. – P. 567-573.
159. Bondar' V.S. Nanodiamonds for biological investigations / V.S. Bondar', A.P. Puzyr' // *Phys. Solid State.* – 2004. – Vol. 46. – P. 716-719.
160. Puzyr' A.P, Design of a luminescent biochip with nanodiamonds and bacterial luciferase / A.P. Puzyr', I.O. Pozdnyakova, V.S. Bondar' // *Phys. Solid State.* – 2004. – Vol. 46, № 4. – P. 761-763.
161. Strong binding of bioactive BMP-2 to nanocrystalline diamond by physisorption / D. Steinmüller-Nethl [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27, № 26. – P. 4547-4556.
162. Адсорбция афлатоксина В1 наноалмазами детонационного синтеза / А.П. Пузырь [и др.] // *ДАН.* – 2007. – Т. 417, № 1. – С. 117-120.
163. Nguyen T.T.B. Adsorption and hydrolytic activity of lysozyme on diamond nanocrystallites / T.T.B. Nguyen, H.C. Chang, V.W.K. Wu // *Diamond Relat. Mater.* – 2007. – Vol. 16, № 4. – P. 872-876.
164. Liu Y.L. Protein functionalized nanodiamond arrays / Y.L. Liu, K.W. Sun // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – Vol. 5, № 6. – P. 1045-1050.
165. Пуртов К.В. Создание надмолекулярной структуры из частиц наноалмаза и обелина на двумерной подложке / К.В. Пуртов, В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // *ДАН.* – 2001. – Т. 380, № 3. – С. 411-414.
166. Huang L.C.L. Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds / L.C.L. Huang, H.C. Chang // *Langmuir.* – 2004. – Vol. 20, № 14. – P. 5879-5884.

167. High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis / X.L. Kong [et al.] // *Analyt. Chem.* – 2005. – Vol. 77, № 1. – P. 259-265.
168. Yeap W.S. Using Detonation Nanodiamond for the Specific Capture of Glycoproteins / W.S. Yeap, Y.Y. Tan, K.P. Loh // *Analyt. Chem.* – 2008. – Vol. 80, № 12. – P. 4659-4665.
169. Nanodiamonds-mediated doxorubicin nuclear delivery to inhibit lung metastasis of breast cancer / J. Xiao [et al.] // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34, № 37. – P. 9648-9656.
170. Nanodiamonds enhance therapeutic efficacy of doxorubicin in treating metastatic hormone-refractory prostate cancer / A.D. Salaam [et al.] // *Nanotechnology.* – 2014. – Vol. 25, № 42. – P. 425103.
171. Burlison T. Surface modification of nanodiamonds for biomedical application and analysis by infrared spectroscopy / T. Burlison, N. Yusuf, A. Stanishevsky // *J. Ach. Mat. Manufac. Eng.* – 2009. – Vol. 37, № 2. – P. 258-263.
172. Epirubicin-adsorbed nanodiamonds kill chemoresistant hepatic cancer stem cells / X. Wang [et al.] // *ACS Nano.* – 2014. – Vol. 8, № 12. – P. 12151-12166.
173. Nanodiamond-mediated delivery of water-insoluble therapeutics / M. Chen [et al.] // *ACS Nano.* – 2009. – Vol. 3, № 7. – P. 2016-2022.
174. Nanodiamond–insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R.A. Shimkunas [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30. – P. 5720-5728.
175. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers / C.C. Fu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, № 3. – P. 727-732.
176. An easy method for attaching nanodiamond particles to amine active glass-like carbon / B. Guan [et al.] // *Carbon.* – 2006. – Vol. 44, № 13. – P. 2858-2860.
177. Large-scale self-assembly of dispersed nanodiamonds / H. Huang [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2008. – Vol. 18, № 12. – P. 1347-1352.
178. Polylysine-coated diamond nanocrystals for MALDI-TOF mass analysis of DNA oligonucleotides / X. Kong [et al.] // *Analyt. Chem.* – 2005. – Vol. 77, № 13. – P. 4273-4277.
179. Dynamics of diamond nanoparticles in solution and cells / F. Neugart [et al.] // *Nano Lett.* – 2007. – Vol. 7, № 12. – P. 3588-3591.
180. Взаимодействие вирусов гриппа А и В с сорбентами на основе наноалмазов / В.Т. Иванова [и др.] // *Вопросы вирусологии.* – 2012. Т. 57, № 2. – С. 9-13.
181. Alpha-bungarotoxin binding to target cell in a developing visual system by carboxylated nanodiamond / K.K. Liu [et al.] // *Nanotechnology.* – 2008. – Vol. 19, № 20. – P. 205102.

182. Immobilization of inorganic pyrophosphatase on nanodiamond particles retaining its high enzymatic activity / E.V. Rodina [et al.] // *Biointerphases*. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 041005.
183. The interaction of linear and ring forms of DNA molecules with nanodiamonds synthesized by detonation / K.V. Purtov [et al.] // *Nanotechnology*. – 2008. – Vol. 19, № 32. – P. 325101.
184. Grichko V. Nanodiamond Bullets and Their Biological Targets / V. Grichko, V. Grishko, O. Shenderova // *NanoBiotechnology*. – 2006. – Vol. 2, № 1-2. – P. 37-42.
185. Fenton-treated functionalized diamond nanoparticles as gene delivery system / R. Martin [et al.] // *ACS Nano*. – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 65-74.
186. Пузырь А. П. Создание люминесцентного биочипа с использованием наноалмазов и бактериальной люциферазы / А.П. Пузырь, И.О. Позднякова, В.С. Бондарь // *ФТТ*. – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 740-742.
187. Characterizing protein activities on the lysozyme and nanodiamond complex prepared for bio applications / E. Perevedentseva [et al.] // *Langmuir*. – 2011. – Vol. 27, № 3. – P. 1085-1091.
188. Nanodiamond-embedded microfilm devices for localized chemotherapeutic elution / R. Lam [et al.] // *ACS Nano*. – 2008. – Vol. 2, № 10. – P. 2095-2102.
189. Atomistic simulation and measurement of pH dependent cancer therapeutic interactions with nanodiamond carrier / A. Adnan [et al.] // *Molecul. Pharm.* – 2011. – Vol. 8, № 2. – P. 368-374..
190. Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment / E.K. Chow [et al.] // *Sci. Trans. Med.* – 2011. – Vol. 3. – P. 73ra21.
191. Cellular Uptake Behavior of Doxorubicin-Conjugated Nanodiamond Clusters for Efficient Cancer Therapy / T.K. Ryu [et al.] // *Macromolec. Biosci.* – 2015. – Vol. 15, № 10. – P. 1469-1475.
192. Active Nanodiamond Hydrogels for Chemotherapeutic Delivery / H. Huang [et al.] // *Nano Lett.* – 2007. – Vol. 7, № 11. – P. 3305-3314.
193. Pat. appl. WO2015002569. Method for immobilizing therapeutic drugs on the surface of detonation nanodiamonds / V.N. Hudoley [et al.]. Public. 08.01.2015.
194. Nanodiamond-conjugated transferrin as chemotherapeutic drug delivery / Z. Wang [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2015. – Vol. 58. – P. 84-93.
195. Development of a Growth-Hormone-Conjugated Nanodiamond Complex for Cancer Therapy / H.L. Chu [et al.] // *ChemMedChem*. – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. 1023-1029.
196. Superresolution Imaging of Albumin-Conjugated Fluorescent Nanodiamonds in Cells by Stimulated Emission Depletion / Y.K. Tzeng [et al.] // *Angewandte Chemie Int. Ed.* – 2011. – Vol. 50, № 10. – P. 2262-2265.

197. Immobilization of enzyme on detonation nanodiamond for highly efficient proteolysis / L. Wei [et al.] // *Talanta*. – 2010. – Vol. 80, № 3. – P. 1298-1304.
198. Mochalin V.N. Wet chemistry route to hydrophobic blue fluorescent nanodiamond / V.N. Mochalin, Y. Gogotsi // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131. – P. 4594-4595.
199. Pushing the functionality of diamond nanoparticles to new horizons: orthogonally functionalized nanodiamond using click chemistry / T. Meinhardt [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2011. – Vol. 21, № 3. – P. 494-500.
200. Measuring Förster resonance energy transfer between fluorescent nanodiamonds and near-infrared dyes by acceptor photobleaching / Y.Y. Chen [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2011. – Vol. 20, № 5. – P. 803-807.
201. Selective targeting of green fluorescent nanodiamond conjugates to mitochondria in HeLa cells / M. Mkandawire [et al.] // *J. Biophotonics*. – 2009. – Vol. 2, № 10. – P. 596–606.
202. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy / K.K. Liu [et al.] // *Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 21, № 31. – P. 315106.
203. Geometric properties of covalently bonded DNA on single-crystalline diamond / B. Rezek [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128, № 12. – P. 3884-3885.
204. Lysine-functionalized nanodiamonds: synthesis, physicochemical characterization, and nucleic acid binding studies / R. Kaur [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2012. – Vol. 7. – P. 3851-3866.
205. Receptor-Mediated Cellular Uptake of Folate-Conjugated Fluorescent Nanodiamonds: A Combined Ensemble and Single-Particle Study / B. Zhang [et al.] // *Small*. – 2009. – Vol. 5, № 23. – P. 2716-2721.
206. Deagglomeration and functionalisation of detonation diamond / A. Krueger [et al.] // *Phys. Status Solidi (A)*. – 2007. – Vol. 204, № 9. – P. 2881-2887.
207. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans* / N. Mohan [et al.] // *Nano Lett.* – 2010. – Vol. 10, № 9. – P. 3692-3699.
208. Protein-functionalized hairy diamond nanoparticles / S.A. Dahoumane [et al.] // *Langmuir*. – 2009. – Vol. 25, № 17. – P. 9633-9638.
209. Peptide-Grafted Nanodiamonds: Preparation, Cytotoxicity and Uptake in Cells / S. Vial [et al.] // *ChemBioChem*. – 2008. – Vol. 9, № 13. – P. 2113-2119.
210. Biotinylated nanodiamond: simple and efficient functionalization of detonation diamond / A. Krueger [et al.] // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24, № 8. – P. 4200-4204.

211. Glycine C60 adduct and its rare earth complexes / D.J. Zhou [et al.] // *Fullerene Sci. Technol.* – 1995. – Vol. 3, № 2. – P. 127-131.
212. Molecular structure, electronic property and vibrational spectroscopy of C 24–glycine and Gd@C 24–glycine complexes / L. Xu [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2012. – Vol. 98. – P. 183-189.
213. Dual role of glycine as a chemical functionalizer and a reducing agent in the preparation of graphene: an environmentally friendly method / S. Bose [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2012. – Vol. 22, № 19. – P. 9696--9703.
214. Synthesis of nitrogen-doped and amino acid-functionalized graphene quantum dots from glycine, and their application to the fluorometric determination of ferric ion / Li L. [et al.] // *Microchim. Acta.* – 2015. – Vol. 182, № 3-4. – P. 763-770.
215. Pulikkathara M.X. Covalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes by amino acids / M.X. Pulikkathara, V.N. Khabashesku // *Russ. Chem. Bull.* – 2008. – Vol. 57, № 5. – P. 1054-1062.
216. Pat. US8092774. Nanotube-amino acids and methods for preparing same / V.N. Khabashesku, H. Peng, J.L. Margrave. Public. 10.01.2012.
217. Meggy A.B. 293. Glycine peptides. Part II. The heat and entropy of formation of the peptide bond in polyglycine / A.B. Meggy // *J. Chem. Soc. (Resumed).* – 1956. – P. 1444-1454.
218. Карпухин А.В. Наноалмаз детонационного синтеза: химическое модифицирование, свойства и возможные применения: дис.. канд. хим. наук : 02.00.04 / А.В. Карпухин ; МГУ им. М.В. Ломоносова. – М., 2012. – 112 с.
219. FT-IR spectra of glycine oligomers / K. Taga [et al.] // *Vib. spectrosc.* – 1997. – Vol. 14, № 1. – P. 143-146.
220. Osawa E. Disintegration and purification of crude aggregates of detonation nanodiamond / E. Osawa // *Synthesis, properties and applications of ultrananocrystalline diamond* / Eds. O. Shenderova, D. Gruen, A.Ya. Vul'. – Dordrecht: Springer, 2005. – P. 231-240.
221. Unusually tight aggregation in detonation nanodiamond: identification and disintegration / A. Krüger [et al.] // *Carbon.* – 2005. – V. 43, № 8. – P. 1722-1730.
222. Improving the dispersity of detonation nanodiamond: differential scanning calorimetry as a new method of controlling the aggregation state of nanodiamond powders / M.V. Korobov [et al.] // *Nanoscale.* – 2013. – V. 5, № 4. – P. 1529-1536.
223. Barnard A.S. Self-assembly in nanodiamond agglutinates / A.S. Barnard // *J. Mater. Chem.* – 2008. – Vol. 18, № 34. – P. 4038-4041.

224. Krueger A. The structure and reactivity of nanoscale diamond / A. Krueger // *J. Mater. Chem.* – 2008. – Vol. 18, № 13. – P. 1485-1492.
225. Influence of surface modification adopting thermal treatments on dispersion of detonation nanodiamond / X. Xu [et al.] // *J. Solid State Chem.* – 2005. – Vol. 178, № 3. – P. 688-693.
226. Неверовская А.Ю. Структура дисперсионной среды и седиментационная устойчивость суспензий наноалмазов детонационного синтеза / А.Ю. Неверовская, А.П. Возняковский, В.Ю. Долматов // *ФТТ.* – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 646-648.
227. Xu K. A new method for deaggregation of nanodiamond from explosive detonation: graphitization-oxidation method / K. Xu, Q. Xue // *Phys. Solid State.* – 2004. – Vol. 46, № 4. – P. 649-650.
228. Size-dependent reactivity of diamond nanoparticles / O.A. Williams [et al.] // *ACS Nano.* – 2010. – Vol. 4, № 8. – P. 4824-4830.
229. Чухаева С.И. Получение, свойства и применение фракционированных наноалмазов / С.И. Чухаева // *ФТТ.* – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 610-613.
230. Оптические свойства гидрозолей детонационных наноалмазов / А.Е. Алексенский [и др.] // *ФТТ.* – 2012. – Т. 54, вып. 3. – С. 541-548.
231. Mironov E. Chemical aspect of ultradispersed diamond formation / E. Mironov, E. Petrov, A. Koretz // *Diamond Relat. Mater.* – 2003. – Vol. 12, № 9. – P. 1472-1476.
232. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy of carbon onions / S. Tomita [et al.] // *Phys. Solid State.* – 2002. – Т. 44, № 3. – P. 450-453.
233. Detonation nanodiamonds as UV radiation filter / O. Shenderova [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2007. – Vol. 16, № 12. – P. 2003-2008.
234. Нелинейное рассеяние света в гидрозоле наноалмазов / Г.М. Михеев [и др.] // *Письма в ЖТФ.* – 2010. – Т. 36, № 8. – С. 23-31.
235. Определение наноалмазов в водных растворах методами спектрофотометрии и термолинзовой спектрометрии / Д.С. Волков [и др.] // *Ж. анал. химии.* – 2012. – Т. 67, № 10. – С. 938-947.
236. Zaitsev A.M. Optical properties of diamonds. A Data Handbook / A.M. Zaitsev. – Berlin: Springer-Verlag, 2001. – 502 p.
237. Scanning confocal optical microscopy and magnetic resonance on single defect centers / A. Gruber [et al.] // *Science.* – 1997. – Vol. 276, № 5321. – P. 2012-2014.

238. Flexible design of ultrahigh-Q microcavities in diamond-based photonic crystal slabs / S. Tomljenovic-Hanic [et al.] // *Optics express*. – 2009. – Vol. 17, № 8. – P. 6465-6475.
239. Single-photon emission in the near infrared from diamond colour centre / E. Wu [et al.] // *J. Luminesc.* – 2006. – Vol. 119. – P. 19-23.
240. Chromium single-photon emitters in diamond fabricated by ion implantation / I. Aharonovich [et al.] // *Phys. Rev. B*. – 2010. – Vol. 81, № 12. – P. 121201.
241. Praver S. Diamond for quantum computing / S. Praver, A. Greentree // *Science*. – 2008. – Vol. 320. – P. 1601-1602.
242. Hui Y.Y. Nanodiamonds for optical bioimaging / Y.Y. Hui, C.L. Cheng, H.C. Chang // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2010. – Vol. 43, № 37. – P. 374021.
243. Optical determination and magnetic manipulation of a single nitrogen-vacancy color center in diamond nanocrystal / N.D. Lai [et al.] // *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 015014.
244. Photoluminescence of single colour defects in 50 nm diamond nanocrystals / F. Treussart [et al.] // *Physica B: Condensed Matter*. – 2006. – Vol. 376-377, № 1. – P. 926-929.
245. Nitrogen doping of diamond by ion implantation / R. Kalish [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 1997. – Vol. 6, № 2. – P. 516-520.
246. Dyer H.B. Irradiation damage in type I diamond / H.B. Dyer, L. Du Preez // *J. Chem. Phys.* – 1965. – Vol. 42, № 6. – P. 1898-1906.
247. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds / Y.R. Chang [et al.] // *Nat. nanotechnol.* – 2008. – Vol. 3, № 5. – P. 284-288.
248. Lidke D.S. Imaging takes a quantum leap / D.S. Lidke, D.J. Arndt-Jovin // *Physiology*. – 2004. – Vol. 19, № 6. – P. 322-325.
249. Lee S.F. Photodynamics of a single quantum dot: fluorescence activation, enhancement, intermittency, and decay / S.F. Lee, M.A. Osborne // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129, № 29. – P. 8936-8937.
250. Billinton N. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence / N. Billinton, A.W. Knight // *Analyt. Biochem.* – 2001. – Vol. 291, № 2. – P. 175-197.
251. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway / O. Faklaris [et al.] // *Small*. – 2008. – Vol. 4, № 12. – P. 2236-2239.

252. Li Y. Transferrin-coupled fluorescence nanodiamonds as targeting intracellular transporters: An investigation of the uptake mechanism / Y. Li, X. Zhou // *Diamond Relat. Mater.* – 2010. – Vol. 19, № 10. – P. 1163-1167.
253. Ly6c+ “inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis / D.R. Getts [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205, № 10. – P. 2319-2337.
254. Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier 1 / R. Weissleder // *Radiology.* – 1999. – Vol. 212, № 3. – P. 609-614.
255. Weissleder R. Target-specific superparamagnetic MR contrast agents / R. Weissleder // *Magnetic Resonance Med.* – 1991. – Vol. 22, № 2. – P. 209-212.
256. Gd (III)-nanodiamond conjugates for MRI contrast enhancement / L.M. Manus [et al.] // *Nano Lett.* – 2010. – Vol. 10, № 2. – P. 484-489.
257. Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications / P. Caravan [et al.] // *Chem. Rev.* – 1999. – Vol. 99, № 9. – P. 2293-2352.
258. Reynhardt E.C. <sup>13</sup>C Relaxation in Natural Diamond / E.C. Reynhardt, C.J. Terblanche // *Bull. Magnetic Resonance.* – 1996. – Vol. 18. – P. 145-146.
259. Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation / X. Zhang [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2010. – Vol. 198, № 2. – P. 237-243.
260. Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo / Y. Yuan [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2009. – Vol. 18, № 1. – P. 95-100.
261. Biodistribution of amino-functionalized diamond nanoparticles. In vivo studies based on <sup>18</sup>F radionuclide emission / S. Rojas [et al.] // *ACS Nano.* – 2011. – Vol. 5, № 7. – P. 5552-5559.
262. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and nanodiamonds in mice / Q. Wei [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 473.
263. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / Y. Yuan [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2010. – Vol. 19, № 4. – P. 291-299.
264. Schrand A. M. Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications / A.M. Schrand, S.A.C. Hens, O.A. Shenderova // *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* – 2009. – Vol. 34, № 1-2. – P. 18-74.
265. Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell / K.K. Liu [et al.] // *Nanotechnology.* – 2007. – Vol. 18, № 32. – P. 325102.

266. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells / K.K. Liu [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30, № 26. – P. 4249-4259.
267. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake / V. Vaijayanthimala [et al.] // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20, № 42. – P. 425103.
268. Are diamond nanoparticles cytotoxic? / A.M. Schrand [et al.] // *J. Phys. Chem B*. – 2007. – Vol. 111, № 1. – P. 2-7.
269. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity / S.J. Yu [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127, № 50. – P. 17604-17605.
270. Effect of detonation nanodiamonds on phagocyte activity / A.V. Karpukhin [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2011. – Vol. 35, № 7. – P. 727-733.
271. Human monocytes stimulation by particles of hydroxyapatite, silicon carbide and diamond: in vitro studies of new prosthesis coatings / L. Nordsletten [et al.] // *Biomaterials*. – 1996. – Vol. 17, № 15. – P. 1521-1527.
272. Chang I.P. Preparation of fluorescent magnetic nanodiamonds and cellular imaging / I.P. Chang, K.C. Hwang, C.S. Chiang // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130, № 46. – P. 15476-15481.
273. Fluorescent nanodiamonds for specifically targeted bioimaging: Application to the interaction of transferrin with transferrin receptor / M.F. Weng [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2009. – Vol. 18, № 2. – P. 587-591.
274. Direct and in vitro observation of growth hormone receptor molecules in A549 human lung epithelial cells by nanodiamond labeling / C.Y. Cheng [et al.] // *Appl. Phys. Lett.* – 2007. – Vol. 90, № 16. – P. 163903.
275. Исследование влияния наноалмазов на прорегенераторный потенциал макрофагов in vitro / Д.В. Нецадим [и др.] // *Фунд. исследования*. – 2015. – № 2-6. – P. 1222-1226.
276. Surface functionality of nanoparticles determines cellular uptake mechanisms in mammalian cells / K. Saha [et al.] // *Small*. – 2013. – Vol. 9, № 2. – P. 300-305.
277. DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds / Y. Xing [et al.] // *ACS Nano*. – 2011. – Vol. 5, № 3. – P. 2376-2384.
278. Bactericidal activity of partially oxidized nanodiamonds / J. Wehling [et al.] // *ACS Nano*. – 2014. – Vol. 8, № 6. – P. 6475-6483.
279. Detonation nanodiamond toxicity in human airway epithelial cells is modulated by air oxidation / R. Silbajoris [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2015. – Vol. 58. – P. 16-23.

280. Nanodiamond particles induce H-8 expression through a transcript stabilization mechanism in human airway epithelial cells / R. Silbajoris [et al.] // *Nanotoxicology*. – 2009. – Vol. 3, № 2. – P. 152-160.
281. Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines / V. Paget [et al.] // *Nanotoxicology*. – 2014. – Vol. 8. (Suppl. 1). – P. 46-56.
282. Paget V. Nano-silicon dioxide toxicological characterization on two human kidney cell lines / V. Paget, J.A. Sergent, S. Chevillard // *J. Phys.: Conf. Series*. – SPb.: IOP Publishing, 2011. – Vol. 304, № 1. – P. 012080.
283. Bakowicz K. Biocompatibility of NCD / K. Bakowicz, S. Mitura // *J. Wide Bandgap Mater.* – 2002. – Vol. 9, № 4. – P. 261-272.
284. Дерябин Д.Г. Острая токсичность углеродных наноматериалов в отношении *Escherichia coli* частично определяется присутствием технологических примесей / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, А.С. Тлягулова // *Рос. нанотехнологии*, – 2011. – Т. 6, № 7-8. – С. 136-141.
285. Тянь А.Г. Морфологическая характеристика органов экспериментальных животных при пероральном введении детонационных наноалмазов (экспериментальное исследование): дис.. канд. мед. наук : 14.00.02 / А.Г. Тянь ; Краснояр. ГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого. – 121 с.
286. Лазаренко Л. И. Клинико-морфологическая характеристика тканей пародонта под действием гидрозолей наноалмазов : экспериментальное исследование : дис.. канд. мед. наук : 14.00.21 / Л.И. Лазаренко ; Краснояр. ГМА. им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого]. – Красноярск, 2009. – 102 с.
287. Наноалмазы в фармации и медицине / Р. Ю.Яковлев [и др.] / Учебно-методическое пособие для студентов фармацевтического факультета. Рязань: РИО УМУ, 2016. 115 с.
288. Пат. РФ 2203068. Биологически активные ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза / В.Ю. Долматов. Оpubл. 27.04.2003.
289. Долматов В.Ю. Наноалмазы детонационного синтеза и возможность создания нового поколения лекарственных средств / В.Ю. Долматов, Л.Н. Кострова // *Сверхтвёрдые материалы*. – 2000. – № 3. – С. 82-85.
290. Synthesis of nanodiamond–daunorubicin conjugates to overcome multidrug chemoresistance in leukemia / H.B. Man [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnol, Biol. and Med.* – 2014. – Vol. 10, № 2. – С. 359-369.

291. Преч Э. Определение строения органических соединений: Таблицы спектральных данных : пер. с англ. / Э. Преч, Ф. Бюльманн, К. Аффольтер. – М.: Мир; БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 440 с.
292. Bellamy L.J. The infrared spectra of complex molecules / L.J. Bellamy. – 2nd ed. – London: Methuen, 1958. – 425 p.
293. Ципенюк Ю.М. Фундаментальные и прикладные исследования на микротроне / Ю.М. Ципенюк. – М.: Физматлит, 2009. – 424 с.
294. National Nuclear Data Center. – URL : <http://www.nndc.bnl.gov>
295. Řanda Z. Tables of nuclear constants for gamma activation analysis / Z. Řanda, F. Kreisinger // J. Radioanalyt. Chem. – 1983. – Vol. 77, № 2. – P. 279-495.
296. Белявская Т.А. Практическое руководство по гравиметрии и титриметрии / Т.А. Белявская. – М.: Изд. "Ньюдиамед", 1996. – 164 с.
297. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии. Практическое руководство / Ю.А. Золотов. – М: Высшая школа, 2001. – С. 231-232; 304-307.
298. Diamond for bio-sensor applications / С.Е. Nebel [et al.] // J. Phys. D: Appl. Phys. – 2007. – Vol. 40, № 20. – P. 6443.
299. Pat. EP2687207. System for the delivery of biologically active compounds into an organism and method for the preparation of said system / R.Y. Yakovlev. Public 23.12.2015.
300. Pat. appl. US20140328920. System for the delivery of biologically active compounds into an organism and method for the preparation of said system / R.Y. Yakovlev. Public 06.11.2014.
301. Пат. РФ 2560697. Система доставки биологически активных веществ в организм и способ ее получения / Р.Ю. Яковлев. Оpubл. 20.08.2015.
302. Halogenation of detonation-synthesis nanodiamond surface / G.V/ Lisichkin [et al.] // Mendeleev Comm. – 2009. – №19. – P. 309-310.
303. Photochemical chlorination of nanodiamond and interaction of its modified surface with C-nucleophiles / G.V. Lisichkin [et al.] // Russ. Chem. Bull. – 2006. – Vol. 55, № 12. – P. 2212-2219.
304. Практикум по органической химии. В. И. Теренин [и др.]; под ред. академика РАН Н.С. Зефинова. – 2-е изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 568 с.
305. Получение меченных тритием биологически активных соединений / А.В. Шишков [и др.] // ДАН СССР. – 1976. – Т. 228. – С. 1237-1241.

306. Surface modification of nanodiamond: photoluminescence and Raman studies / J. Mona [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2012. – Vol. 24. – P. 134-138.
307. Li. J.B. Automated Dissolution Testing of Topical Drug Formulations Using Franz Cells and HPLC Analysis / J.B. Li, P.C. Rahn // *Pharm. Technol.* – 1993. – Vol. 17, № 7. – P. 44-52.
308. Sorokina E. Effect of iron Fe (II) and Fe (III) in a binary system evaluated bioluminescent method / E. Sorokina, T. Yudina, V. Danilov // *Europ. Research.* – 2013. – Vol. 45, № 4-1. – P. 756-760.
309. New approach for specific determination of antibiotics by use of luminescent *Escherichia coli* and immune serum / I.I. Vlasova [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, № 2. – P. 1245-1248.
310. Антиоксидантные свойства ликопина / Г.И. Клебанов [и др.] // *Биол. Мембраны.* – 1998. – Т.15, № 2. – С. 227-237.
311. Folch J. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, S.M. Lee, G.A. Sloane-Stanley // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497-509.
312. Bangham A.D. Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids / A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins // *J. Mol. Biol.* – 1965. – Vol. 13. – P.238-252.
313. Люблинская Л.А. Синтез пептидных субстратов субтилизина и их аналогов / Л.А. Люблинская, Л.Д. Якушева, В.М. Степанов // *Биоорган. химия.* – 1977. – Т. 3, № 2. – С. 790-795.
314. Erlanger B.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / B.F. Erlanger, N. Kokowski, W. Cohen // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1961. – Vol. 95, – P. 271-278.
315. Voyushina L.T. The synthesis of chromogenic peptide substrates containing p-nitroanilides of arginine and lysine, catalyzed by proteinases adsorbed on support material / L.T. Voyushina, E.Y. Terent'eva, V.M. Stepanov // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1991. – Vol. 50, № 10-11. – P. 209-212.
316. Baykov A.A. A simple and sensitive apparatus for continuous monitoring of orthophosphate in the presence of acid-labile compounds / A.A. Baykov, S.M. Avaeva // *Analyt. Biochem.* – 1981. – Vol. 116, № 1. – P. 1-4.
317. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / Л.Д. Лукьянова [и др.] / Государственный фармакологический комитет МЗ СССР. – М., 1990. – 18 с.
318. Воронина Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия / Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова /

- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. –ФГБУ «НЦЭМСП». – М.: Изд-во Гриф и К, 2012. – С. 276-296.
319. Воронина Т.А. Гипоксия и память. Особенности эффектов и применения ноотропных препаратов / Т.А. Воронина // Вестник РАМН. – 2000. – Т.9. – С.27-34.
320. Зарубина И.В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И.В. Зарубина, П.Д. Шабанов / Серия «Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии», – СПб.: ООО Издательство Н-Л, 2004. – С. 308-320.
321. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat / A. Jackowski [et al.] // J. Cerebral Blood Flow and Metabolism. –1990. – Vol. 10. – P. 835-849.
322. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Издание ФГБУ «НЦЭМСП» Минздравсоцразвития России, – М.: Изд-во Гриф и К., 2012. – С. 276-296.
323. Леонидов Н.Б. Перспективность применения наноалмазов в качестве носителей для систем доставки лекарственных веществ / Н.Б. Леонидов, Н.Г. Селезнев, Р.Ю. Яковлев // Медицина в Кузбассе. – Спецвыпуск №7. – 2009, – С. 56-57.
324. Кулакова И.И. Наноалмаз детонационного синтеза – особый тип алмазного материала / И.И. Кулакова // Новые углеродные материалы: получение, исследование, перспективы применения. – М.: Наука, 2013. – С. 44-62.
325. Строение частицы химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза / И.И. Кулакова [и др.] // Породоразрушающий и металлообрабатывающий инструмент – техника и технология его изготовления и применения. Сб. науч. тр., Вып. 12. – Киев, 2009. – С. 299-305.
326. Подход к унифицированию физико-химических свойств детонационных наноалмазов промышленного производства / Р.Ю. Яковлев [и др.] // Рос. хим. журн. – 2013. – Т. 57, № 5. – С. 86–96.
327. Nanophase of water in nano-diamond gel / M.V. Korobov [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2007. – Vol. 111, № 20. – P. 7330-7334.
328. Aggregate structure of “single-nano buckydiamond” in gel and dried powder by differential scanning calorimetry and nitrogen adsorption / M.V. Korobov [et al.] // Diamond Relat. Mater. – 2010. – Vol. 19, № 5. – P. 665-671.
329. The properties and applications of nanodiamonds / V.N. Mochalin [et al.] // Nat. nanotechnol. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 11-23.

330. Non-aggregated Detonation Nanodiamonds / Y. Fedutik [et al.] // Proc. of 3rd Int. Symposium, Detonation Nanodiamonds: Technology, Properties and Applications. – St. Petersburg, 2008. – P. 65-72.
331. Полиморфные модификации углерода и нитрида бора : справочник / А.В. Курдюмов [и др.]. – М.: Металлургия, 1994. – 200 с.
332. Колотов В.П. Теоретические и экспериментальные подходы к решению задач активационного анализа, гамма-спектрометрии и создания малоактивируемых материалов : автореф. дис. д-ра хим. наук : 02.00.14, 02.00.02 / В.П. Колотов ; ГЕОХИ РАН. – М., 2007. – 45 с.
333. Кузнецов Р. Активационный анализ / Р. Кузнецов. 2-е изд. перераб.и дополн. – М.: Атомиздат, 1974. – 344 с.
334. Simonits A. Single-comparator methods in reactor neutron activation analysis / A. Simonits, F. De Corte, J. Hoste // J. Radioanalyt. Chem. – 1975. – Vol. 24, № 1. – P. 31-46.
335. De Corte F. Exit reactor Thetis/Ghent (1967–2003): A recollection of its significant contribution to NAA and its leading role in the development of the k0-standardization / F. De Corte // J. Radioanalyt. Nucl. Chem. – 2007. – Vol. 271, № 1. – С. 37-41.
336. Levinger J.S. Nuclear Photo-Disintegration / J.S. Levinger. – N.Y.: Oxford University Press, 1960. – 144 p.
337. Atlas of Giant Dipole Resonances. Parameters and Graphs of Photonuclear Reaction Cross Sections / A.V. Varlamov [et al.]. – Vienna: INDC (NDS)-394, IAEA NDS, 1999. – 311 p.
338. Urbanski T. Chemistry and technology of explosives / T. Urbanski. – Oxford: Pergamon Press, 1964. – 647 p.
339. Пат. РФ 2506095. Способ селективной доочистки наноалмаза / Соломатин [и др.]. Оpubл. 10.02.2014.
340. Влияние детонационного наноалмаза на скорость окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий / А.С. Соломатин [и др.] // В сб. Наноструктуры в конденсированных средах (Сборник научных статей по материалам IV Международной научной конференции "Наноструктурные материалы-2014. (НАНО-2014 ) Беларусь-Россия-Украина. Минск. 2014. С. 99-103.
341. Development and investigation of drug delivery system based on the detonation nanodiamonds / Yakovlev [et al.] / In Book Abstr. Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures. St Petersburg, 2011. P. 205.

342. Детонационный наноалмаз как перспективный носитель в системах доставки лекарственных веществ / Р.Ю.Яковлев [и др.] / Междун. научн.конф. Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы нового поколения. Тез. докл. – Иваново. 2012, – С. 228.
343. Соломатин А.С. Изучение влияния условий восстановления наноалмаза методом ИКС / А.С. Соломатин, Р.Ю. Яковлев / XVIII Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2011". Тез. докл. – Москва, 2011.
344. Синтез алмазов из углеводородов / Е.Н. Яковлев // Ж. физ. хим. – 1985. – Т. 59, № 6. – С. 517-518.
345. Sorption of actinides onto nanodiamonds / Y. Buchtatskaya [et al.] // *Radiochimica Acta*. – 2015. – Vol. 103, № 3. – P. 205-211.
346. Строение частиц химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза / Кулакова И.И. [и др.] // *Российские нанотехнологии*. – 2010 – Т. 5, № 7-8, – С. 66-73.
347. Effect of sintering on structure of nanodiamond / G.N. Yushin [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2005. – Vol. 14, № 10. – P. 1721-1729.
348. Graphitization of diamond powders of different sizes at high pressure–high temperature / J. Qian [et al.] // *Carbon*. – 2004. – Vol. 42, № 12. – P. 2691-2697.
349. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules / D. Lin-Vien [et al.]. – San Diego: Academic Press, 1991. – 520 p.
350. Tan P.H. Raman scattering of non–planar graphite: arched edges, polyhedral crystals, whiskers and cones / P.H. Tan, S. Dimovski, Y. Gogotsi // *Philosoph. Trans. Royal Soc. London A: Mathem., Phys. Eng. Sci.* – 2004. – Vol. 362, № 1824. – P. 2289-2310.
351. Мельник Н.Н. «Сладковские чтения» / Н.Н. Мельник (Устное сообщение). – октябрь. – 2008.
352. Fields R. The measurement of aminogroups in proteins and peptides / R. Fields // *Biochem. J.* – 1971. – Vol. 124, № 3. – P. 581-590.
353. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method / G.A. Vadun [et al.] // *Radiochimica Acta*. – 2014. – Vol. 102, № 10. – P. 941-946.
354. Яковлев Р.Ю. Синтез и применение химически модифицированных детонационных [3H]-наноалмазов / Р.Ю.Яковлев / Матер. Всерос. конф. молодых ученых и специалистов, аспирантов и студентов «Инновации в химии: достижения и перспективы». – М., 2010, – С. 184.

355. Пат. РФ 2538862. Меченные тритием наноалмазы и способ их получения / Г.А. Бадун [и др.]. Оpubл. 10.01.2015.
356. Determination of detonation nanodiamonds concentration in hydrosols by optical methods / R.Y.Yakovlev [et al.] / Book of Abst. Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). St Petersburg, 2015. – P. 119.
357. Яковлев Р.Ю. Особенности химического модифицирования поверхности детонационных наноалмазов аминокислотными соединениями / Р.Ю.Яковлев // Рос. медико-биол. вестник им. акад. И.П. Павлова. - 2011. – №3. – С. 130-135.
358. Влияние функционального состава поверхности наноалмаза на функции митохондрий / Соломатин [и др.] / В сб. Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». Пушкино, 2013. – С. 31-32.
359. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins / A. Barth // Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics. – 2007. – Vol. 1767, № 9. – P. 1073-1101.
360. Пат. РФ 2542411. Конъюгат наноалмаза с пирофосфатазой и способ его получения / Р.Ю. Яковлев [и др.]. Оpubл. 20.02.2015.
361. Иммобилизация фермента пирофосфатазы на наноалмазе детонационного синтеза / А.В. Валуева // В сб. Наноструктуры в конденсированных средах (Сборник научных статей по материалам IV Международной научной конференции "Наноструктурные материалы-2014. (НАНО-2014) Беларусь-Россия-Украина. Минск. 2014. С. 146-151.
362. National Institute of Standards and Technology [Электронный ресурс]. – URL : <http://www.nist.gov>.
363. Исследование влияния температуры на ИК спектры кристаллических аминокислот, дипептидов и полиаминокислот. I. Глицин / Г.Б. Чернобай [ и др.] // Ж. структур. химии. – 2007. – Т. 48, № 2. – С. 339-347.
364. Пат. РФ 2447890. Препарат, снижающий время каталептических реакций, тревожность и усиливающий исследовательскую мотивацию / В.В. Болдырев [и др.]. Оpubл. 20.04.2012.
365. Лен Ж.-М. Супрамолекулярная химия: Концепции и перспективы : пер. с англ. / Ж.-М. Лен. – Новосибирск: Наука, 1998. – 334 с.
366. Spectral Database for Organic Compounds SDBS. Compounds and Spectral Search [Электронный ресурс]. – URL : [http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi).
367. Никитченко Е. А. Фармакологическая активность адамантилзамещенных аминокислот : дис.. канд. фарм. наук : 14.00.25 / Е.А. Никитченко; Пятигор. ГФА. – Пятигорск, 2009. – 110 с.

368. Низкомолекулярные пептиды пищи как факторы изменения устойчивости крыс к эмоциональному стрессу / Н.В. Дмитриева [и др.] // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1990. – № 4. – С. 11-13.
369. Бобков Ю.Г. Методологические подходы к поиску фармакологических средств, эффективных при гипоксии и ишемии мозга / Ю.Г. Бобков, И.А. Иванова // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1987. – № 6. – С. 13-19.
370. Burgen A.S.V. The assay of anticholinesterase drugs by the chromodacryorrhoea response in rats / A.S.V. Burgen // Brit. J. Pharm. Chemother. – 1949. – Vol. 4, № 2. – P. 185-189.
371. Яковлев Р.Ю. Создание нового класса высокоэффективных лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе детонационного наноалмаза / Р.Ю. Яковлев // В сб. Международной выставки химической промышленности и науки «Химия+». VIII конкурс проектов молодых ученых. Москва. 2014. С. 50-51.
372. Пат. РФ 2528096. Способ количественного определения углеродных наноструктур в биологических образцах и их распределения в организме / Р.Ю. Яковлев [и др.]. Оpubл. 10.09.2014.
373. Studying in vitro transmembrane penetration of tritium labeled detonation nanodiamond / R.Y. Yakovlev [et al.] / Book of abstr. International Symposium «Modern problems of surface chemistry and physics». – Kyiv, 2010. – P. 439-440.
374. Tritium labeling nanodiamond and its applications in transmembrane diffusion and biodistribution studies / R.Y. Yakovlev [et al.] / Book of Abst. Int. Conf. Diamond and Carbon Materials. Riva del Garda, 2013. – P1.096.
375. Пат. РФ 2519760. Антиоксидант и способ его получения / Леонидов [и др.]. Оpubл. 20.06.2014.
376. Фишер М. Обзор подходов к терапии острого инсульта: прошлое, настоящее и будущее / М. Фишер, В. Шибитц // Журн. неврологии и психиатрии. Инсульт (Прилож). – 2001. – Вып. 1. – С. 2133.
377. Ex vivo study of nanodiamond particles biodistribution using ICP-MS / R.Y. Yakovlev [et al.] / Book of Abstr. Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). – St Petersburg, 2013. – P. 65.
378. Yakovlev R.Y. Biodistribution Peculiarities of Detonation Nanodiamond / R.Y. Yakovlev, N.B. Leonidov, G.V. Lisichkin / Abstr. XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014). – Moscow, 2014, – P. 08.064.

379. Interaction dynamics of the nanodiamond with living cells in culture / R.Y. Yakovlev [et al.] / Book of Abstr. Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures. – Saint Petersburg, 2011. – P. 206.
380. Пат. РФ 2506075. Седативное средство и способ его получения / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев. Оpubл. 10.02.2014.
381. Пат. РФ 2538611. Способ определения биологической неэквивалентности наноалмазов / А.С. Соломатин [и др.]. Оpubл. 10.01.2015.
382. Пат. РФ 2476215. Антибактериальное средство и способ его получения / Р.Ю. Яковлев, Н.Б.Леонидов, А.И.Губанок. Оpubл. 27.02.2013.
383. Пат. РФ 2506074. Антигипоксанта и способ его получения / Н.Б. Леонидов [и др.]. Оpubл. 10.02.2014.
384. Пат. РФ 2521404. Средство, обладающее противоинсульным действием и способ его получения / Н.Б. Леонидов [и др.]. Оpubл. 27.06.2014.
385. Пат РФ 2519755. Анксиолитик и способ его получения / Н.Б. Леонидов [и др.]. Оpubл. 20.06.2014.
386. Пат. РФ 2508098. Противосудорожное средство и способ его получения / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев, Г.В. Лисичкин. Оpubл. 27.02.2014.
387. Пат. РФ 2519759. Антидепрессанта и способ его получения / Н.Б. Леонидов [и др.]. Оpubл. 20.06.2014.
388. Пат. РФ 2519761. Антипсихотическое средство и способ его получения / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев, Г.В. Лисичкин. Оpubл. 20.06.2014.
389. Пат. РФ 2566713. Средство для лечения и профилактики нарушений сна / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев. Оpubл. 27.10.2015.
390. Пат. РФ 2574001. Средство для лечения и профилактики алкоголизма / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев. Оpubл. 27.01.2016.

# Приложение

## МЕТОДИКИ И РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ (дополнение)

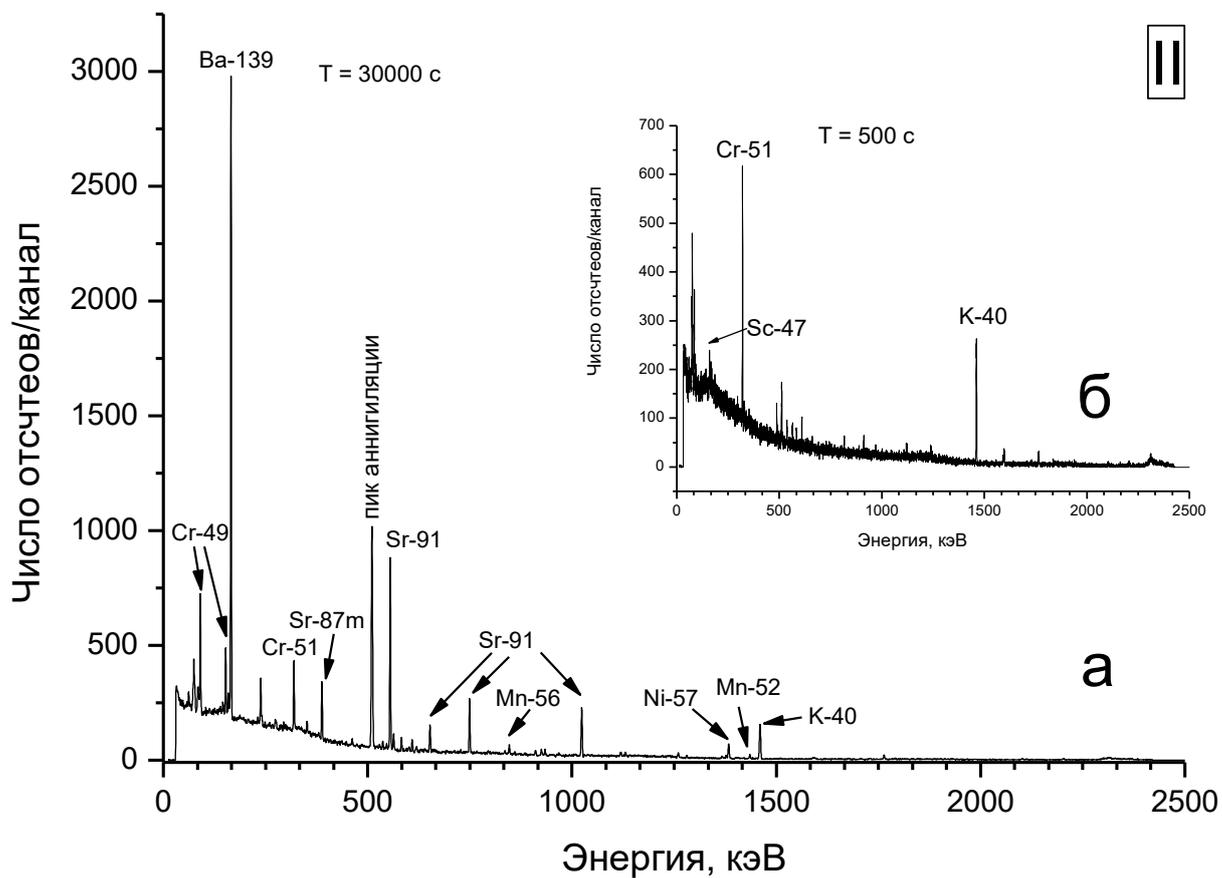
### Оглавление

РАЗДЕЛ 1. ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....	229
1.1. Гамма-активационный анализ ДНА.....	229
РАЗДЕЛ 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ .....	235
2.1. Работа с экспериментальными животными .....	235
2.2. Влияние химии поверхности ДНА на динамику проникновения в клетку.....	236
2.3. Митохондриальная активность модифицированных ДНА .....	241
2.4. Антибактериальная активность конъюгата ДНА-амикацин .....	243
2.5. Изучение побочных действий ДНА на мышах .....	244
2.6. Определение острой токсичности конъюгата ДНА-глицин и его компонентов .....	248
2.6.1. ДНА .....	248
2.6.2. Глицин.....	249
2.6.3. Конъюгат ДНА-глицин.....	250
2.7. Расшифровка томограмм кролика после введения ДНА .....	252
2.8. Специфическая активность конъюгата ДНА-глицин.....	256
2.8.1. Антигипоксическая активность .....	257
2.8.2. Противоинсультная активность.....	259

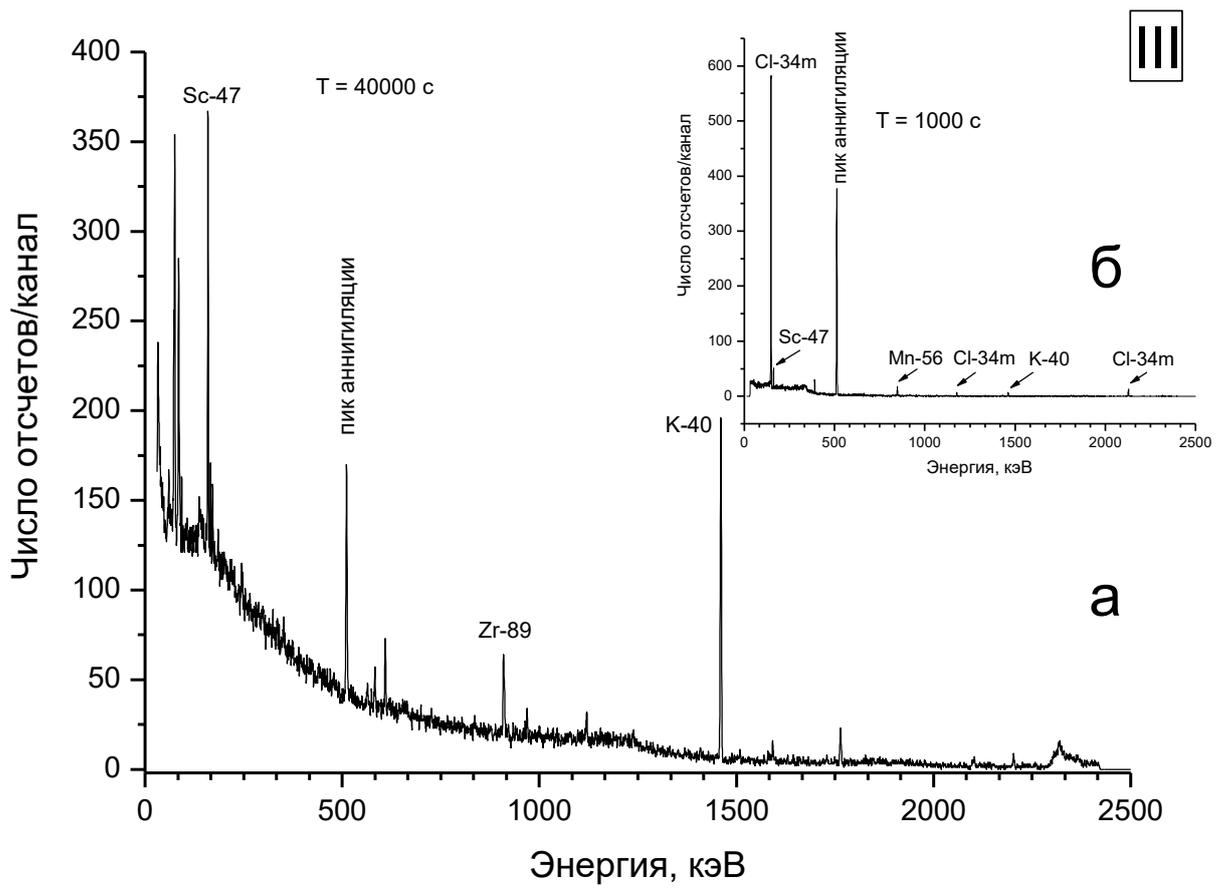
## РАЗДЕЛ 1. ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

## 1.1. Гамма-активационный анализ ДНА

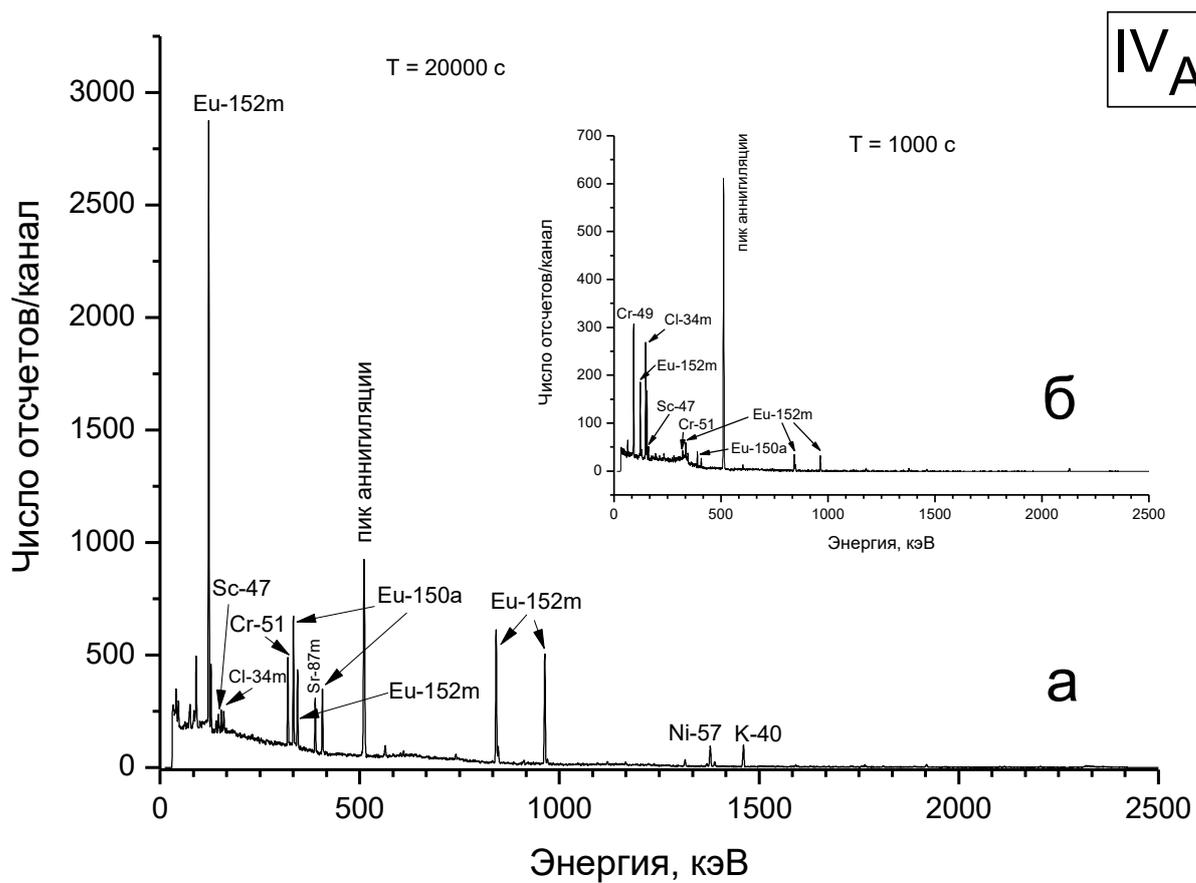
На Рис.1-7 представлены гамма-спектры образцов ДНА, исследованные в работе.



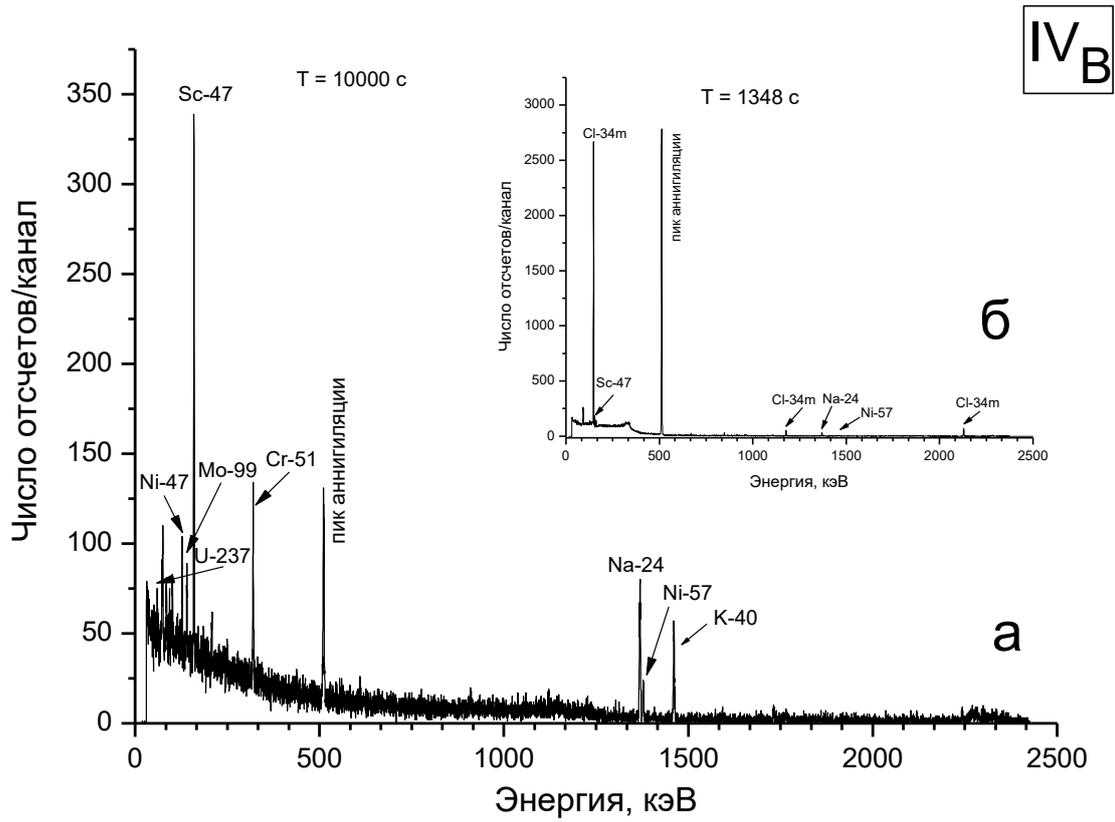
**Рис. 1.** Гамма-спектры образца ДНА II. а – получены спустя несколько дней после облучения; б – получены непосредственно после облучения.



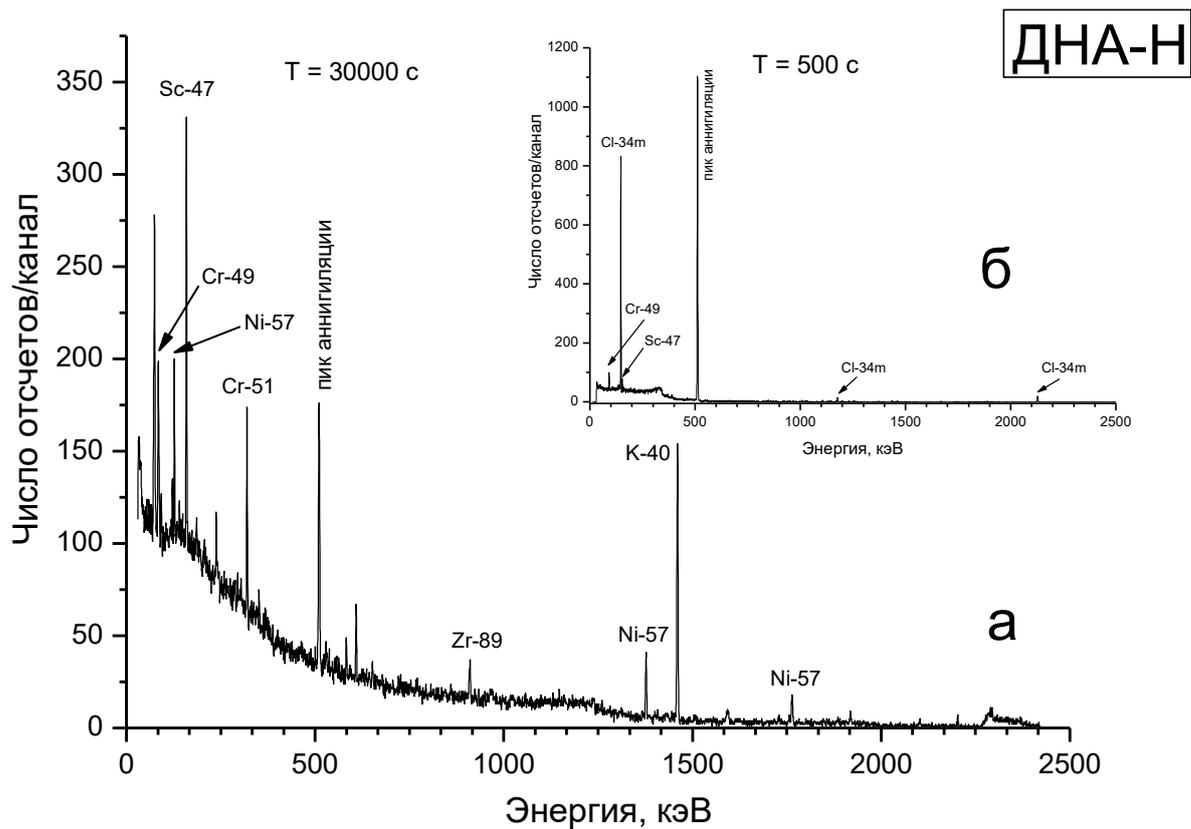
**Рис. 2.** Гамма-спектры образца ДНА III. а – получены спустя несколько дней после облучения; б – получены непосредственно после облучения.



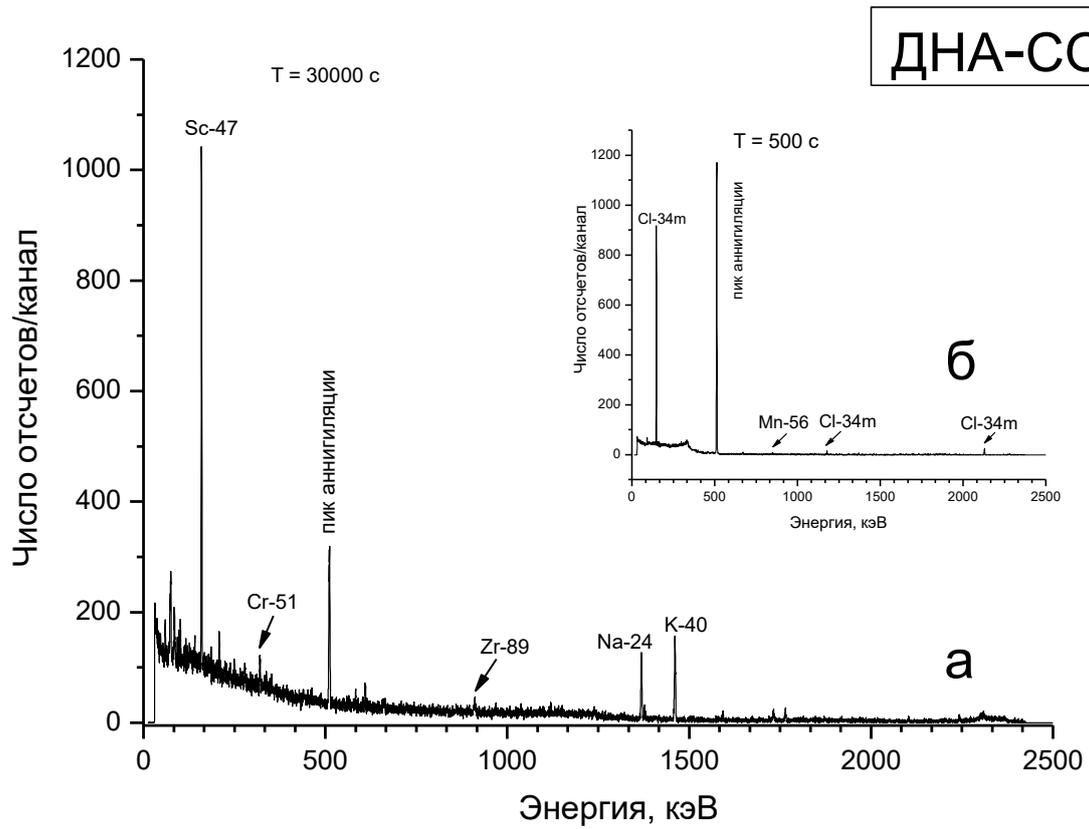
**Рис. 3.** Гамма-спектры образца ДНА IV<sub>A</sub>: а – получены спустя несколько дней после облучения; б – получены непосредственно после облучения.



**Рис. 4.** Гамма-спектры образца ДНА IV<sub>B</sub>: а – получены спустя несколько дней после облучения; б – получены непосредственно после облучения.



**Рис. 5.** Гамма-спектры гидрированного образца ДНА IVb: а – получены спустя несколько дней после облучения; б – получены непосредственно после облучения.



**РИС. 6.** Гамма-спектры окисленного образца ДНА IVb: а – получены спустя несколько дней после облучения; б – получены

## РАЗДЕЛ 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ

### 2.1. Работа с экспериментальными животными

Для изучения фармакологической активности использовали животных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая», Московская область. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96), нормативному документу «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утвержденных Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. №1045-73, и Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.). Животные содержались в виварии при температурном режиме 20-22 °С, при световом цикле - 12 часов светлый и 12 часов темный периоды, в пластмассовых клетках Т/4А размером 580x375x200 мм с верхней крышкой из нержавеющей стали и подстилкой обеспыленной из деревянной стружки. Животные содержались при постоянном доступе к корму и воде с использованием полного рациона экструдированного брикетированного корма (ГОСТ на корм Р 50258-92) и питьевой воды. При проведении экспериментов учитывались требования Комиссии по проблеме этики отношения к животным Российского национального Комитета по биоэтике при Российской академии наук и этические нормы, изложенные в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.). Опыты проводили в первую половину дня.

Для изучения острой токсичности животных получали из питомника лабораторных животных ГУ Научный центр биомедицинских исследований РАМН. Они были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Животных содержали в клетках Т-3 по 7-8 особей в условиях искусственного освещения (12 часов светлого и темного времени) с принудительной 16-кратной в час вентиляцией, при температуре 18-20°С и относительной влажности 50-65% на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к питьевой водопроводной воде и брикетированному корму. Животные получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1, изготавливаемый ООО «Лабораторснаб» состав, пищевая ценность, содержание витаминов и микроэлементов которого указаны в Табл. 1.

Таблица 1. Комбикорм ПК-120-1 для лабораторных крыс и мышей (экструдированный). (Сертификат соответствия № РОСС RU.ПО81.В00113). ГОСТ Р50258-92.

В состав корма входят:	%	Показатели качества	
1. Ячмень или овес	31,78	1. Сырой протеин	21,9%
2. Пшеница	24,09	2. Обменная энергия	280,2 ккал
3. Шрот подсолнечниковый	9,00	3. Сырая клетчатка	4,7 %

4. Рыбная мука	2,00	4. Сырой жир	3,2 %
5. Дрожжи кормовые	5,00	5. Кормовые единицы/100 кг	123,2
6. Соль поваренная	0,10	6. Фосфор	0,69 %
7. Премикс минерально-витаминный	0,02	7. Натрий хлористый	0,26 %
8. Отруби пшеничные	13,00	8. Лизин	1,09%
9. Сухое молоко	1,00	9. Мет.+Цист.	0,83 %
10. Эндокс	0,01	10. Са	0,93 %
11. Шрот соевый	11,90		
12. Известняковая мука	2,00		
13. Минеральная смесь	0,10		

Содержание витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма: А-10 тыс.МЕ, В<sub>1</sub>-1 мг, В<sub>2</sub>-0,02 мг, В<sub>2</sub>-6 мг, В<sub>3</sub>-10 мг, В<sub>5</sub>-20 мг, В<sub>6</sub>-4 мг, D<sub>3</sub>-2 тыс.МЕ, Е-20 мг, Н-0,1 мг, К<sub>3</sub>-2 мг, эндокс-100 мг, Со-0,3 мг, Си-10 мг, Fe-80 мг, I-0,6мг, Мп-40 мг, Se-0,2 мг, Zn-60 мг.

Животные в других экспериментах, содержались на базе сертифицированных вивариев РязГМУ им. И.П. Павлова, ИТЭБ РАН и 1-го МГМУ им. И.М. Сеченова в соответствии со всеми требованиями к уходу и содержанию за животными, описанными выше.

## 2.2. Влияние химии поверхности ДНА на динамику проникновения в клетку<sup>1</sup>

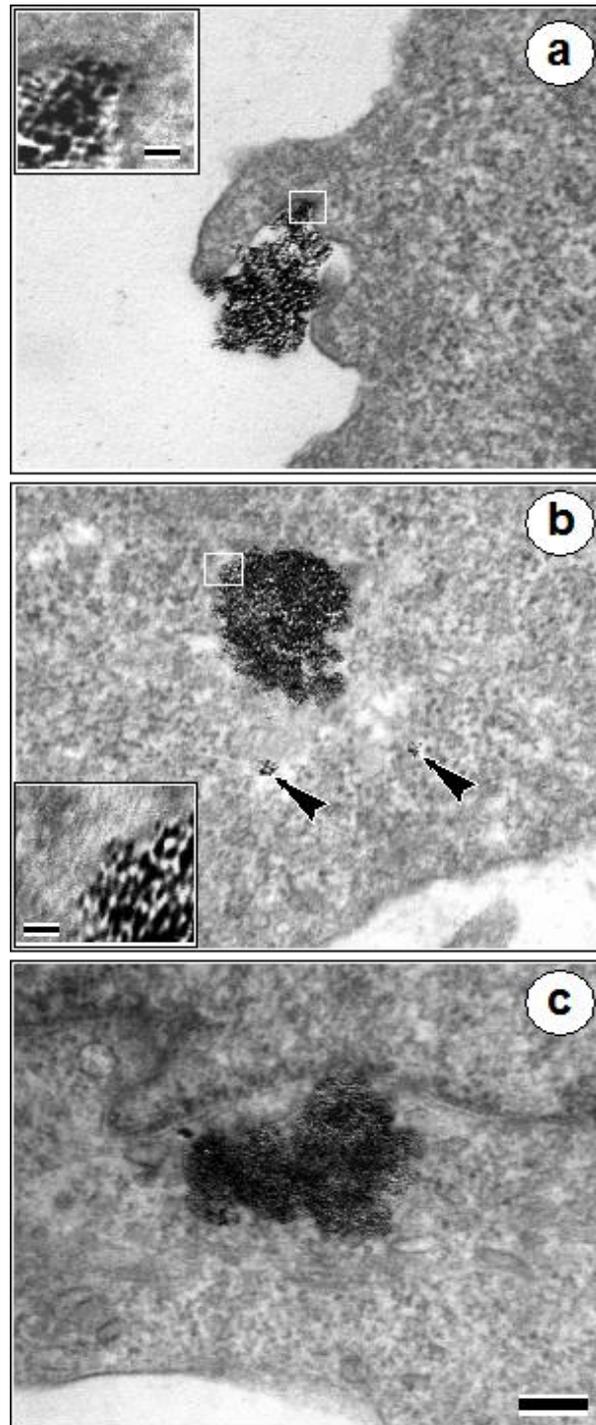
Динамику проникновения ДНА в клетки HeLa изучали на трех образцах: исходный ДНА, конъюгаты ДНА-глицин и ДНА-амикацин. Клетки культивировали в среде, содержащей гидрозоли наноалмазов, в течение времени от 15 мин до 24 ч. По истечении времени инкубации для каждого образца были проанализированы от 53 до 68 клеток. Для этого клетки фиксировали смолой Epon, выбирали участок смолы, содержащий наибольшее количество клеток, вытачивали из него пирамидку и резали ее поперек плоскости роста клеток на микротоме. Полученные микроскопические срезы исследовали на ПЭМ. Для каждого образца с разным временем инкубации подсчитывали долю клеток не связанных с ДНА, долю клеток, имеющих частицы ДНА только своей на поверхности, долю клеток, имеющих ДНА на поверхности и внутри клеток, долю клеток, имеющих ДНА только внутри и долю мертвых клеток. В Табл. 2 данные представлены для двух времен инкубации – 15 мин и 24 ч. Следует отметить, что анализ проводился по индивидуальным срезам, а не по всему объему каждой клетки. Следовательно, выбранный метод анализа несколько занижает абсолютные значения для всех исследованных клеток. Тем не менее, поскольку анализ проводился идентичным образом для всех временных точек, полученные значения позволяют достоверно описать динамику взаимодействия образцов ДНА с клетками.

<sup>1</sup> Работа выполнена под руководством, при участии и консультативной помощи д.б.н., проф. Узбекова Р.Э., Университет Франсуа Рабле, Тур, Франция. Этап резки и просмотра образцов методом ПЭМ закончил Узбеков Р.Э. после окончания стажировки Яковлева Р.Ю. в Университете Франсуа Рабле.

Таблица 2. Взаимодействие ДНА с клетками HeLa после инкубации.

Образец (указана статистическая выборка)	Без ДНА %	Только на поверхности %	На поверхности + внутри %	Только внутри %	Погибшие клетки %
15 мин					
ДНА (54)	13.0	48.1	35.2	3.7	0
ДНА-глицин (68)	66.2	30.9	2.9	0	0
ДНА-амикацин (53)	77.4	18.9	3.8	0	0
24 ч					
ДНА (62)	1.6	9.7	87.1	1.6	0
ДНА-глицин (58)	0	27.6	70.7	0	1.7
ДНА-амикацин (55)	0	9.1	80.0	7.3	3.6

Ультраструктурные исследования показали, что уже через 15 мин инкубации обнаруживаются ДНА, связанные с поверхностью культивируемых клеток. В электронный микроскоп частицы ДНА размером от 4 до 13 нм хорошо видны на фоне клеточных структур без дополнительного окрашивания (Рис. 7,а). При взаимодействии клетки с ДНА на клеточной мембране образуются инвагинации, которые, постепенно углубляясь, приводят к поглощению ДНА клетками (явление фагоцитоза).



**Рис. 7.** Взаимодействие частиц ДНА с клеткой после 15 мин инкубации: а) инвагинация цитоплазматической мембраны в процессе взаимодействия частиц конъюгата ДНА-глицин, б) агрегат ДНА в цитоплазме клетки, два маленьких агрегата свободно находятся в цитоплазме и не окружены клеточной мембраной. в) частицы конъюгата ДНА-амикацин возле ядерной мембраны. Шкала 200 нм, вставки - 20 нм.

Пространственный анализ, проведенный на серийных ультратонких срезах показал, что часть ДНА уже через 15 мин инкубации обнаруживается внутри клеток (Рис. 7,б), причем частицы ДНА не окружены мембраной, а свободно лежат в цитоплазме. Было также обнаружено

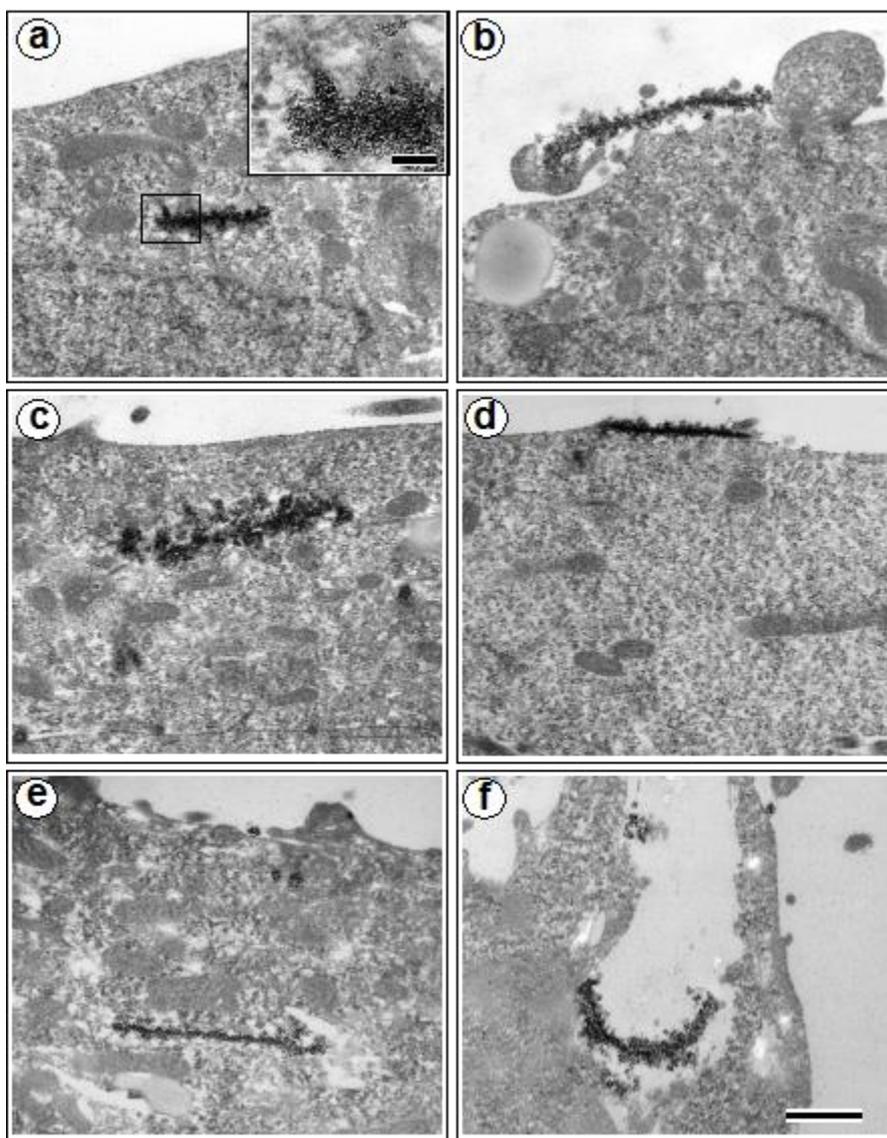
взаимодействие ДНА с внешней ядерной мембраной без проникновения частиц внутрь ядра (Рис. 7,с).

Показано, что связывание ДНА с поверхностью клеток происходит уже после 15 мин инкубации. При этом наибольшее количество клеток (83,3 %), имеющих на своей поверхности ДНА, было зафиксировано для исходных ДНА. Конъюгат ДНА-глицин был обнаружен на поверхности 33,8 % клеток, а конъюгат ДНА-амикацин – только на поверхности 22,6 % клеток.

Проникновение различных образцов ДНА внутрь клеток также имело различия. Наиболее активно проникали в клетки исходные ДНА – через 15 мин 38,9 % клеток уже содержали их (Табл. 2). Напротив, конъюгаты ДНА-глицин и ДНА-амикацин через 15 мин выявлялись преимущественно на поверхности клеток, и лишь только 2,9 и 3,9 % клеток, соответственно, содержали конъюгаты внутри (Табл. 2).

После 24 ч инкубации 96,8 % клеток имели на своей поверхности ДНА и 88,7 % внутри. В некоторых клетках на поверхности обнаруживалась цепочки из агрегатов ДНА. Как внутри клеток, так и на их поверхности встречались протяженные (более 0,5 мкм в длину) цепочки ДНА (Рис. 8). Возможно, во втором случае наблюдается результат выброса клеткой частиц ДНА (при промежуточных временах инкубации – 2 и 4 ч наблюдали большее содержание ДНА в клетках, чем на поверхности).

Статистический анализ клеток, инкубированных с конъюгатом ДНА-глицин, через 24 ч не показал значительных различий с показателями, зафиксированными после 4 ч инкубации. Также все 100 % клеток несли на своей плазматической мембране конъюгат ДНА-глицин, а доля клеток в которых комплексы были обнаружены внутри, изменилась незначительно (с 67,9 до 70,7%). Было лишь обнаружено появление мертвых клеток (1,7 %) (Табл. 2).



**Рис. 8.** Взаимодействие ДНА с клетками после 24 ч инкубации. Агрегаты ДНА имеют цепочечное строение, вокруг частиц не образуется внешняя мембрана; а,б – исходный ДНА; с,д – конъюгат ДНА-глицин, е,ф – конъюгат ДНА-амикацин. Шкала а-ф - 0.5 мкм, вставка – 100 нм.

**Выводы:** проведенное исследование показало, что

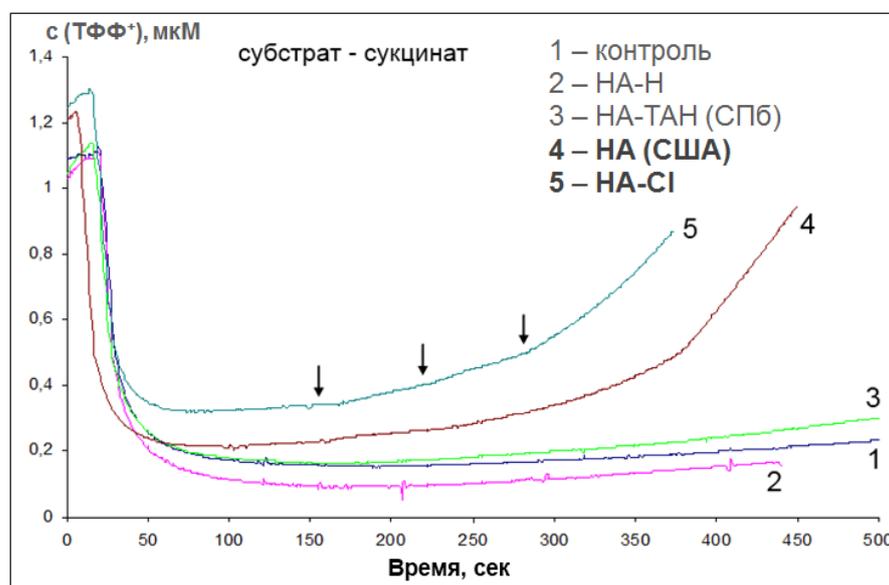
- ДНА проникает в клетки, причем кинетика поглощения клетками исходных ДНА и конъюгатов с глицином и амикацином отличается.
- ДНА внутри клеток не окружены мембраной и свободно лежат в цитоплазме;
- ковалентное связывание ДНА с глицином не препятствует связыванию с мембраной клетки частиц ДНА, но осложняет проникновение конъюгата внутрь клетки;
- ДНА не проникают в ядро или митохондрии при коротких временах инкубации. Однако, через 24 ч ДНА были обнаружены в ядре, что может быть связано с делением клетки.

- накопление через 24 ч в клетках конъюгата ДНА-амикацин оказывает цитотоксический эффект в отличие от исходного ДНА и конъюгата ДНА-глицин.

### 2.3. Митохондриальная активность модифицированных ДНА

Применение ДНА в биомедицинских приложениях предполагает всестороннее и глубокое изучение его влияния на клетки и субклеточные органеллы. Поэтому при выполнении работы серьезное внимание было уделено изучению влияния функционального состава поверхности ДНА на дыхание и мембранный потенциал изолированных митохондрий. Митохондрии являются центральным звеном в цепи энергетических клеточных процессов, которые в присутствии субстрата окисления (например, сукцинат натрия/калия, пируват натрия/калия и др.) активно генерируют мембранный потенциал на внутренней стороне мембраны.

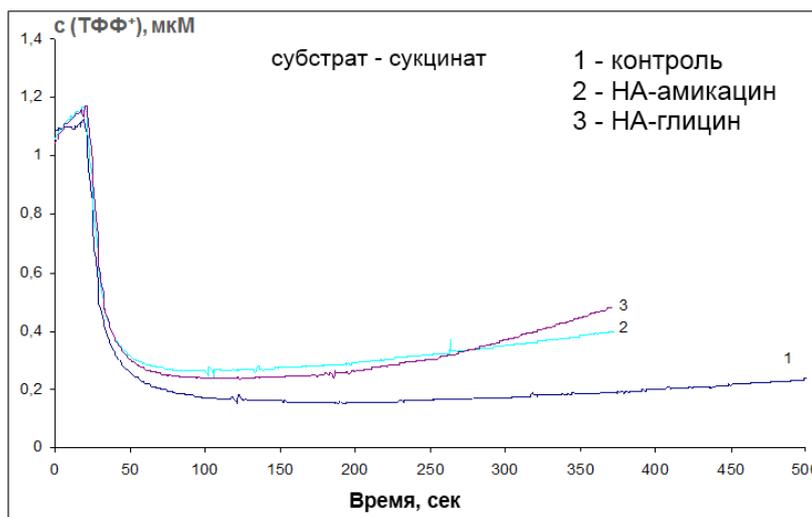
Для оценки изменения мембранного потенциала используют индикаторы, которые реагируют на изменение его величины. Так, с повышением мембранного потенциала индикатор – соль тетрафенилфосфония (ТФФ) начинает активно проникать внутрь митохондрий, при этом концентрация его свободной формы в ячейке понижается. При понижении мембранного потенциала, напротив, происходит высвобождение индикатора из внутреннего пространства митохондрий, тем самым, увеличивая количество свободного индикатора (Рис. 9).



**Рис. 9.** Падение мембранного потенциала митохондрий (выраженное в концентрации индикатора ТТФ) под влиянием образцов ДНА.

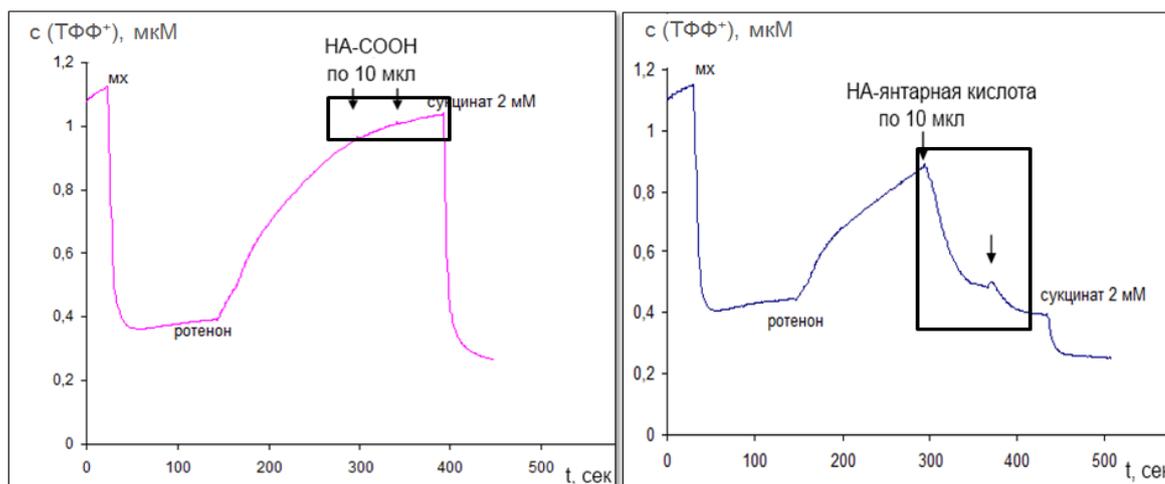
В работе изучали промышленный ДНА марки УДА-ТАН и модифицированные ДНА с различным функциональным покровом: гидрированный (ДНА-Н), хлорированный (ДНА-Сl) и окисленный (ДНА-СООН), а также ДНА с привитыми глицином, амикацином и янтарной кислотой. Показано, что функциональные группы ДНА –СООН, –ОН, –Н и ДНА с привитыми глицином или амикацином (Рис. 9,10) практически не оказывают негативного влияния на

функции митохондрий (мембранный потенциал и скорость поглощения кислорода), тогда как группы –С1 на поверхности ДНА приводят к постепенному снижению этих функций (Рис. 10).



**Рис. 10.** Падение мембранного потенциала изолированных митохондрий (выраженное в концентрации индикатора ТТФ) под влиянием конъюгатов ДНА с лекарственными веществами.

Янтарная кислота, иммобилизованная на ДНА, окисляется митохондриями аналогично индивидуальной (Рис. 74). Отсутствие негативного эффекта ДНА на функции митохондрий при оптимизации его функционального состава, а также сохранение активности наноформы интермедиата цикла Кребса позволяет считать перспективным не только создание систем доставки ЛВ нового поколения на основе ДНА, но и получение на их основе высокоэффективных оригинальных ЛС нового поколения.



**Рис. 11.** Влияние конъюгатов: ДНА-СООН (левый график) и ДНА-янтарная кислота (правый график) - на мембранный потенциал изолированных митохондрий печени крысы.

Из Рис. 11 (левый) видно, что образец ДНА-СООН приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий, а конъюгат ДНА-янтарная кислота – к увеличению мембранного

потенциала. Используя величину эффекта образцов нативной янтарной кислоты и конъюгата на мембранный потенциал митохондрий, было найдено, что в образец ДНА-янтарная кислота содержит около 0,5% масс. янтарной кислоты.

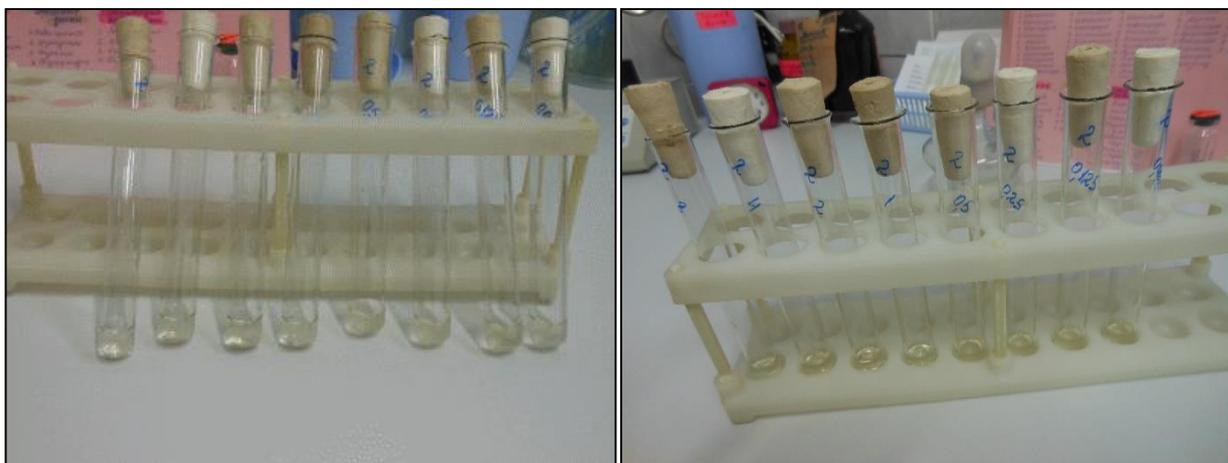
Была измерена скорость потребления кислорода митохондриями при окислении сукцината с добавлением аламетицина.

#### 2.4. Антибактериальная активность конъюгата ДНА-амикацин

Для определения наличия роста микроорганизмов, пробирки с посевами просматривали в проходящем свете. Рост культуры в присутствии АБП сравнивали с референтной пробиркой («отрицательный контроль») содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. Действующую концентрацию определяли по наименьшей концентрации АБП, которая подавляет видимый рост микроорганизмов. Метод разведения позволяет выявить и определить минимальные бактерицидные концентрации (МБК) антибиотиков.

МБК получают путем высевания бульонной культуры из пробирок, в которых четко фиксируется ингибирование роста бактерий на чашки с питательной средой. Те пробирки, в культуре которых вырастает менее 0,1% бактерий, принимают за соответствующие МБК.

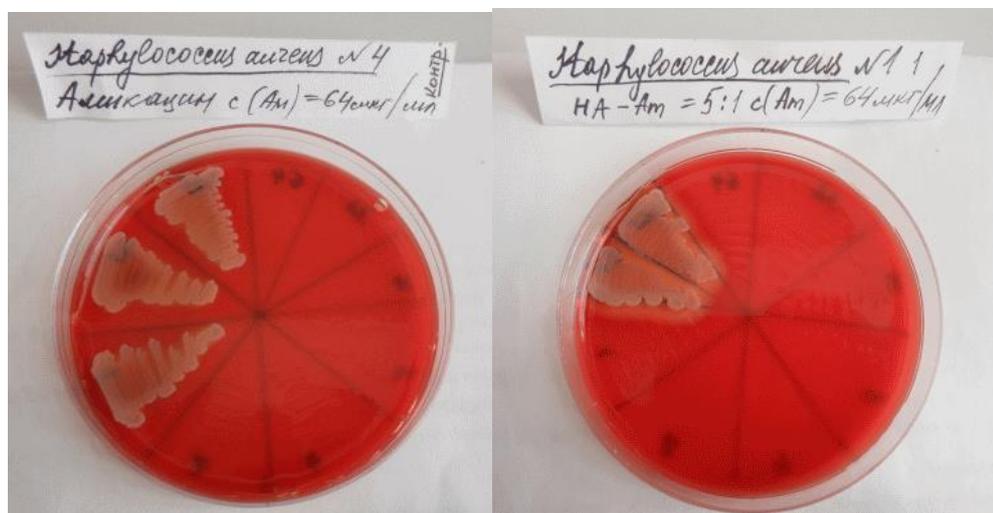
Ни в одной из исследуемых пробирок, содержащих ДНА, визуально не наблюдалось видимой задержки роста микроорганизма (Рис. 12).



**Рис. 12.** Пробирки, содержащие питательный бульон, ДНА-амикацин и бактериальную культуру. Каждая пробирка содержит последовательно разбавленный в два раза ДНА-амикацин, где концентрация амикацина варьируется от 8 до 0,0625 мкг/мл.

Это, очевидно, связано с наличием в изучаемых растворах наночастиц алмаза, которые образуют мутность. Поэтому были сделаны посевы из каждой пробирки на чашки с питательной средой (кровяной сердечно-мозговой агар) (Рис. 13). Из Рис. 13 видно, что чашки с агаром разделены на 8 отсеков, которые соответствуют концентрации амикацина в ДНА-амикацин равной 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 и 0,00625 мкг/мл. Бактерии *Staphylococcus aureus* под действием нативного амикацина проросли на концентрациях 0,0625, 0,125, 0,25 мкг/мл. Тогда как проросты бактерий при добавлении конъюгата ДНА-амикацин начинаются с концентрации 0,125 мкг/мл.

Следовательно, МБК амикацина для этого вида бактерий составляет 0,5 мкг/мл, а МБК конъюгата ДНА-амикацин 0,25 мкг/мл. Поэтому можно сделать вывод, что конъюгат ДНА-амикацин в два раза эффективнее действуют по сравнению с нативным амикацином на бактерии *Staphylococcus aureus*.



**Рис. 13.** Фотография чашек с агаром после пророста бактерий *Staphylococcus aureus*. Слева – ингибирование роста бактерий нативным амикацином на концентрациях от 0,5 до 8 мкг/мл; справа – ингибирование роста бактерий конъюгатом ДНА-амикацин на концентрациях 0,25-8 мкг/мл.

## 2.5. Изучение побочных действий ДНА на мышах

Регистрацию возможных побочных эффектов, признаков интоксикации и гибели животных проводили через 1 ч – 14 сут после внутрибрюшинного введения в сравнении с глицином в тех же дозах. Исследование проводили на белых беспородных половозрелых мышах-самцах массой 20-24 г возрастом 2-3 месяца. Всего использовалось 42 животных – 7 групп по 6 мышей.

В результате исследования было установлено, что конъюгат ДНА-глицин при внутрибрюшинном введении мышам в дозах 75, 150 и 225 мг/кг не вызывал признаков интоксикации и гибели животных на протяжении 14 сут (Табл. 3-5). При конъюгат ДНА-глицин также не вызывало у мышей изменения шерстяного покрова, состояния слизистых оболочек. Также отсутствовали птоз верхнего века, повышенная уринация, дефекация, саливация, пилоэрекция, вокализация, боковое положение. В пределах нормы были ритм и глубина дыхательных движений, отсутствовали агрессивность, пугливость, тремор, судороги, каталепсия, стереотипия и груминг. Не наблюдалось изменения позы. У животных были сохранены пинеальный, роговичный и болевой рефлексы. На протяжении всех 14 сут наблюдения животные удерживались на перевернутой сетчатой платформе в течение 5 сек (Табл. 3-5).

Таблица 3. Изучение возможных побочных эффектов и гибели мышей **через 1 час** после введения веществ (показатель изменения в группе в %).

Показатели	Группы			Глицин/доза, мг/кг			
	Конт- роль	Конъюгат ДНА-глицин/ доза, мг/кг			Глицин/доза, мг/кг		
		75	150	225	75	150	225
Изменение характера шерстяного покрова	0	0	0	0	0	0	0
Изменение состояния слизистых оболочек	0	0	0	0	0	0	0
Птоз верхнего века	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная уринация	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная дефекация	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная саливация	0	0	0	0	0	0	0
Наличие пилоэрекция	0	0	0	0	0	0	0
Наличие вокализации	0	0	0	0	0	0	0
Наличие бокового положения	0	0	0	0	0	0	0
Нарушение ритма и глубины дыхательных движений	0	0	0	0	0	0	0
Наличие агрессивности	0	0	0	0	0	0	0
Изменение реакции на постукивание по клетке	0	0	0	33,3*	0	0	33,3*
Повышенная пугливость	0	0	0	0	0	0	0
Наличие тремора	0	0	0	0	0	0	0
Наличие судорог	0	0	0	0	0	0	0
Изменение порогов болевой реакции	0	66,7*	100*	100*	0	100*	100*
Изменение позы, катаlepsия	0	0	0	0	0	0	0
Нарушение координации движений в тесте вращающегося стержня	0	16,7	50*	50*	33,3*	33,3*	50*
Удерживание 5 с на перевернутой сетчатой платформе	100	100	100	100	100	100	100
Перелезание с перевернутой сетчатой платформы наверх	100	66,7*	66,7*	50*	66,7*	66,7*	66,7*
Наличие пинеального рефлекса	100	100	100	100	100	100	100
Наличие роговичного рефлекса	100	100	100	100	100	100	100
Наличие седации	0	66,7*	100*	100*	0	100*	100*
Наличие стереотипии	0	0	0	0	0	0	0
Наличие груминга	0	0	0	0	0	0	0
Гибель животного	0	0	0	0	0	0	0

\*-  $P < 0,05$  – относительно контроля по критерию  $\chi^2$

Таблица 4. Изучение возможных побочных эффектов и гибели мышей **через 24 часа** после введения фармакопейного глицина и описываемого анксиолитика (показатель изменения в группе в %).

Показатели	Группы			Глицин/доза, мг/кг			
	Конт- роль	Конъюгат ДНА-глицин/ доза, мг/кг			75	150	225
		75	150	225			
Изменение характера шерстяного покрова	0	0	0	0	0	0	0
Изменение состояния слизистых оболочек	0	0	0	0	0	0	0
Птоз верхнего века	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная уринация	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная дефекация	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная саливация	0	0	0	0	0	0	0
Наличие пилоэрекция	0	0	0	0	0	0	0
Наличие вокализации	0	0	0	0	0	0	0
Наличие бокового положения	0	0	0	0	0	0	0
Нарушение ритма и глубины дыхательных движений	0	0	0	0	0	0	0
Наличие агрессивности	0	0	0	0	0	0	0
Изменение реакции на постукивание по клетке	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная пугливость	0	0	0	0	0	0	0
Наличие тремора	0	0	0	0	0	0	0
Наличие судорог	0	0	0	0	0	0	0
Изменение порогов болевой реакции	0	0	0	0	0	0	0
Изменение позы, катаlepsия	0	0	0	0	0	0	0
Нарушение координации движений в тесте вращающегося стержня	0	0	0	0	33,3*	16,7	33,3*
Удерживание 5 с на перевернутой сетчатой платформе	100	100	100	100	100	100	100
Перелезание с перевернутой сетчатой платформы вверх	100	100	100	100	100	100	100
Наличие пинеального рефлекса	100	100	100	100	100	100	66,6*
Наличие роговичного рефлекса	100	100	100	100	100	100	100
Наличие седации	0	0	0	0	0	0	0
Наличие стереотипии	0	0	0	0	0	0	0
Наличие груминга	0	0	0	0	0	0	0
Гибель животного	0	0	0	0	0	0	0

\*-  $P < 0,05$  – относительно контроля по критерию  $\chi^2$

Таблица 5. Изучение возможных побочных эффектов и гибели мышей **через 14 сут.** после введения фармакопейного глицина и описываемого анксиолитика (показатель изменения в группе в %).

Показатели	Группы				Глицин/доза, мг/кг		
	Конт- роль	Конъюгат ДНА-глицин/ доза, мг/кг			75	150	225
		75	150	225			
Изменение характера шерстяного покрова	0	0	0	0	0	0	0
Изменение состояния слизистых оболочек	0	0	0	0	0	0	0
Птоз верхнего века	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная уринация	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная дефекация	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная саливация	0	0	0	0	0	0	0
Наличие пилоэрекция	0	0	0	0	0	0	0
Наличие вокализации	0	0	0	0	0	0	0
Наличие бокового положения	0	0	0	0	0	0	0
Нарушение ритма и глубины дыхательных движений	0	0	0	0	0	0	0
Наличие агрессивности	0	0	0	0	0	0	0
Изменение реакции на постукивание по клетке	0	0	0	0	0	0	0
Повышенная пугливость	0	0	0	0	0	0	0
Наличие тремора	0	0	0	0	0	0	0
Наличие судорог	0	0	0	0	0	0	0
Изменение порогов болевой реакции	0	0	0	0	0	0	0
Изменение позы, катаlepsия	0	0	0	0	0	0	0
Нарушение координации движений в тесте вращающегося стержня	0	0	0	0	0	0	0
Удерживание 5 с на перевернутой сетчатой платформе	100	100	100	100	100	100	100
Перелезание с перевернутой сетчатой платформы вверх	100	100	100	100	100	100	66,7*
Наличие пинеального рефлекса	100	100	100	100	100	100	100
Наличие роговичного рефлекса	100	100	100	100	100	100	100
Наличие седации	0	0	0	0	0	0	0
Наличие стереотипии	0	0	0	0	0	0	0
Наличие груминга	0	0	0	0	0	0	0
Гибель животного	0	0	0	0	0	0	0

\*-  $P < 0,05$  – относительно контроля по критерию  $\chi^2$

Таким образом, показано, что конъюгат ДНА-глицин не обладает какими-либо побочными или токсическими эффектами при введении в больших дозах, превышающих терапевтические более чем на порядок.

## 2.6. Определение острой токсичности конъюгата ДНА-глицин и его компонентов

### 2.6.1. ДНА

Проведенные исследования показали, что однократное внутрибрюшинное введение ДНА в токсических дозах сопровождается заторможенностью мышей, после чего мыши погибали в течение 24 ч после введения вещества. Дозы и объемов введения ДНА для расчета ЛД<sub>50</sub> представлены в Табл. 6.

Таблица 6. Расчет доз, концентраций и объемов введения препарата внутрибрюшинно мышам линии BALB/с при определении ориентировочной ЛД<sub>50</sub> по методу Дейхмана и ЛеБланка (концентрация гидрозоля ДНА – 18 мг/мл).

Исследуемые дозы, мг/кг	Масса тела животных, г			
	19	20	21	22
	Вводимые объемы, мл			
225	0,24	0,25	0,26	0,28
450	0,48	0,5	0,53	0,55
675	0,71	0,75	0,79	0,83
900	0,95	1,00	1,05	1,10
2250	2,38	2,5	2,63	2,75
2700	2,85	3,00	3,15	3,30
3600	3,80	4,00	4,20	4,40

При изучении токсичности наночастиц алмаза при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/с на первом этапе были получены следующие результаты (Табл. 7). При этом показатели ориентировочных ЛД<sub>50</sub> для мышей линии BALB/с составили для самцов 2700 мг/кг.

Таблица 7. Показатели токсичности наночастиц алмаза при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/с (1-й этап исследований); «-» отсутствие гибели, «+» гибель животных.

Пол животных	Исследуемые дозы, мл/мышь (мг/кг)					
	225	450	675	900	2250	2700
Самцы	-	-	-	-	-	+

При изучении токсичности препарата на втором этапе в развернутых экспериментах на группах мышей линии BALB/с с использованием метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксоу с учетом полученных на 1-м этапе ориентировочных показателей ЛД<sub>50</sub> были испытаны дозы в диапазоне 900-3600 мг/кг.

При статистической обработке результатов проведенных исследований были получены данные, свидетельствующие о низкой токсичности препарата (Табл. 8).

*Таблица 8.* Показатели токсичности наночастиц алмаза при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/С (2-й этап исследований).

Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
	ЛД <sub>10</sub>	ЛД <sub>16</sub>	ЛД <sub>50±m</sub>	ЛД <sub>84</sub>
Самцы	2400	2600	3420 ± 414	4450

Подводя итоги изучения токсичности наночастиц алмаза при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/с, можно отметить, что ДНА в испытанных концентрации является малотоксичным, и показатели средних смертельных доз (ЛД<sub>50</sub>) составляют 3420 ± 414 мг/кг.

### 2.6.2. Глицин

Проведенные исследования показали, что однократное внутрибрюшинное введение глицина в токсических дозах сопровождается заторможенностью мышей, после чего мыши погибали в течение 24 ч после введения вещества. Дозы и объемов введения глицина для расчета ЛД<sub>50</sub> представлены в Табл. 9.

*Таблица 9.* Расчет доз, концентраций и объемов введения препарата внутрибрюшинно мышам линии BALB/с при определении ориентировочной ЛД<sub>50</sub> по методу Дейхмана и ЛеБланка.

Исследуемые дозы, мг/кг мг/кг	Концентрация раствора	Масса тела животных, г			
		19	20	21	22
		Вводимые объемы, мл			
280	3% (30 мг/мл)	0,18	0,19	0,20	0,21
420		0,27	0,28	0,29	0,31
620		0,39	0,41	0,43	0,45
940		0,60	0,63	0,66	0,69
1400		0,88	0,93	0,98	1,02
2100		1,33	1,40	1,47	1,54
3200	16,67% (166,67 мг/мл)	0,36	0,38	0,4	0,42
4700		0,53	0,56	0,59	0,62
7100		0,81	0,85	0,89	0,94

При изучении токсичности глицина при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/с на первом этапе были получены следующие результаты (Табл. 10). При этом показатели ориентировочных ЛД<sub>50</sub> для мышей линии BALB/с составили 4700мг/кг.

Таблица 10. Показатели токсичности глицина при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c (1-й этап исследований); «-» отсутствие гибели, «+» гибель животных.

Пол животных	Исследуемые дозы, мг/кг								
	280	420	620	940	1400	2100	3200	4700	7100
Самцы	-	-	-	-	-	-	-	+	+

При изучении токсичности препарата на втором этапе в развернутых экспериментах на группах мышей линии BALB/c с использованием метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона с учетом полученных на 1-м этапе ориентировочных показателей ЛД<sub>50</sub> были испытаны дозы в диапазоне 3200-4700 мг/кг. Расчет доз и объемов введения глицина мышам линии BALB/c и полученные результаты при установлении параметров токсикометрии методом Литчфилда и Уилкоксона представлены в Табл. 11.

Таблица 11. Расчет доз и объемов при внутрибрюшинном введении препарата мышам линии BALB/c при изучении токсичности по методу Литчфилда и Уилкоксона (с = 166,7 мг/мл)

Исследуемые дозы, мг/кг	Масса тела животных, г			Наблюдавшийся эффект: числитель - погибшие мыши, знаменатель число мышей в группе
	20	21	22	
	Вводимые объемы, мл			Самцы
3200	0,38	0,4	0,42	0/5
3900	0,47	0,49	0,52	2/5
4700	0,56	0,59	0,62	4/5

При статической обработке результатов проведенных исследований по оценке токсичности глицина при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c были получены следующие результаты (Табл. 12).

Таблица 12. Показатели токсичности глицина при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c (2-й этап исследований).

Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
	ЛД <sub>10</sub>	ЛД <sub>16</sub>	ЛД <sub>50±m</sub>	ЛД <sub>84</sub>
Самцы	2900	3480	4100±300	4825

Подводя итоги изучения острой токсичности глицина при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c, можно отметить, что он является малотоксичным, и показатель средней смертельной дозы (ЛД<sub>50</sub>) составляет 4100±300 мг/кг.

### 2.6.3. Конъюгат ДНА-глицин

Проведенные исследования показали, что однократное внутрибрюшинное введение наночастиц алмаза с глицином в токсических дозах сопровождается заторможенностью мышей, затруднением дыхания, после чего мыши погибали в течение 48 ч после введения вещества, что

в два раза медленнее по сравнению с ДНА и нативным глицином. Дозы и объемов введения глицина для расчета ЛД<sub>50</sub> представлены в Табл. 13.

Таблица 13. Расчет доз, концентраций и объемов внутрибрюшинного введения препарата мышам линии BALB/c при определении ориентировочной ЛД<sub>50</sub> по методу Дейхмана и ЛеБланка (концентрация ДНА-глицин – 22,4 мг/мл).

Исследуемые дозы, мг/кг	Масса тела животных, г			
	19	20	21	22
	Вводимые объемы, мл			
280	0,24	0,25	0,26	0,28
560	0,48	0,5	0,53	0,55
840	0,71	0,75	0,79	0,83
1120	0,95	1,00	1,05	1,10
2800	2,38	2,5	2,63	2,75
3360	2,85	3,00	3,15	3,30
3920	3,33	3,5	3,68	3,85

При изучении токсичности наночастиц конъюгата ДНА с глицином при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c на первом этапе были получены следующие результаты (Табл. 14).

При этом показатель ориентировочной ЛД<sub>50</sub> для мышей линии BALB/c составил 2800 мг/кг. При изучении токсичности препарата на втором этапе в развернутых экспериментах на группах мышей линии BALB/c с использованием метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона с учетом полученных на 1-м этапе ориентировочных показателей ЛД<sub>50</sub> были испытаны дозы в диапазоне 1120-3920 мг/кг

Таблица 14. Показатели токсичности наночастиц алмаза с глицином при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c (1-й этап исследований); «-» отсутствие гибели, «+» гибель животных.

Пол животных	Исследуемые дозы, мг/кг						
	280	560	840	1120	2800	3360	3920
Самцы	-	-	-	-	+	+	+

.Расчет доз и объемов введения наночастиц алмаза с глицином мышам линии BALB/c и полученные результаты при установлении параметров токсикометрии методом Литчфилда и Уилкоксона представлены в Табл. 15.

Таблица 15. Расчет доз и объемов при внутрибрюшинном введении препарата мышам линии BALB/c при изучении токсичности по методу Литчфилда и Уилкоксона.

Исследуемые дозы, мг/кг	Масса тела животных, г			Наблюдавшийся эффект: числитель - погибшие мыши, знаменатель - число мышей в
	20	21	22	
	Вводимые объемы, мл			Самцы

1120	L0	1,05	1,10	0/5
2800	2,5	2,63	2,75	3/5
3360	3,00	3,15	3,30	4/5
3920	3,5	3,68	3,85	5/5

При статистической обработке результатов проведенных исследований были получены данные, свидетельствующие о низкой токсичности препарата (Табл. 16).

*Таблица 16.* Показатели токсичности наночастиц алмаза с глицином при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c (2-й этап исследований).

Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
	ЛД <sub>10</sub>	ЛД <sub>16</sub>	ЛД <sub>50±m</sub>	ЛД <sub>84</sub>
Самцы	1720	2200	2730±250	3360

Подводя итоги изучения токсичности ДНА-глицин при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c, следует отметить, что ДНА-глицин является малотоксичным, и показатель средней смертельной дозы (ЛД<sub>50</sub>) составляет 2730±250 мг/кг.

Вывод. Исследование острой токсичности всех веществ показало, что они являются малотоксичными, показатели ЛД<sub>50</sub> составляют для: ДНА 3400 ± 400 мг/кг, глицин 4100 ± 300 мг/кг, наночастицы алмаза с глицином 2730 ± 250 мг/кг. При этом видно, что токсичность конъюгата ДНА-глицин несколько выше, чем его отдельные компоненты ДНА и глицин.

## 2.7. Расшифровка томограмм кролика после введения ДНА

Для получения более четкого изображения патологически измененных участков в организме в методе РКТ применяют эффект усиления контрастности, которых достигается внутривенным введением рентгеноконтрастного веществ (РКВ). Современные разрешенные к применению РКВ для улучшения их растворимости используются в виде солей или смеси солей. Однако, для решения задачи изучения биораспределения ДНА *in vivo* эти РКВ нельзя использовать, так как не достигается их ковалентная иммобилизация на поверхности наночастиц. Поэтому в качестве рентгеноконтрастного вещества в работе был выбран триодбензиловый спирт (R), который с помощью химического синтеза был иммобилизован на поверхности наноалмаза (ДНА-R), а также было методами ИКС и РФЭС доказано его строение. Полученное вещество обладало явно гидрофобными свойствами, поэтому на этапах получения суспензии и непосредственно перед ее введением в бедренную вену кролика была применена ультразвуковая обработка его суспензии в физиологическом растворе.

По литературным данным [2] уже в течение 5 мин 20% введенного внутривенно РКВ выводятся из кровотока, а менее чем через 1 ч, накапливаясь в почках, - переходят в мочевыделительную систему. Поэтому было решено проводить исследования в течение этого периода времени и выбирать временные точки эксперимента, соответствующие 5, 25 и 45 мин

после введения ДНА-R и R. Сравнительное изучение *in vivo* биораспределения R и ДНА-R должно было показать эффект наноносителя в изменении характера его распределения в организме кролика по органам-мишеням.

По данным имеющихся отпечатанных томограмм и исходных цифровых записей информации на оптических дисках обнаружено следующее. В отпечатанных томограммах визуально видимых глазом отличий в характере распределения ДНА-R и R, по сравнению с контролем (без введения РКВ), не обнаружено во всех временных точках эксперимента. На основании этих данных, используя компьютерную программу SIENET Sky – VA50B, поставляемую вместе с программным обеспечением РКТ, было решено посчитать плотности органов по Хаусфилду для более точного анализа полученных томограмм. Экспериментальные данные представлены в Табл. 17.

Статистическая обработка данных плотности органов по Хаусфилду для всех экспериментальных животных (кроликов) показала, что изменений в плотности органов в зависимости от введенных рентгеноконтрастных веществ не наблюдается (Табл. 18). Статистический анализ плотности органов в разных плоскостях тела также не выявил их изменений в пределах ошибки. Это можно объяснить малой концентрацией РКВ в вводимых суспензиях ДНА-R и R, которая при данной чувствительности метода РКТ не позволяет обнаружить наличие изменений в рентгеновской плотности органов. В рамках поставленной задачи повышение концентрации ДНА в водно-солевой суспензии для преодоления предела чувствительности метода/прибора нецелесообразно. Основные результаты эксперимента приведены в Табл. 18.

В отличие от основных органов (мозг, сердце, печень, селезенка, почки), в которых изменения плотности органов не наблюдается, измерения плотности кровотока в печеночной вене показали высокую флуктуацию полученных данных. Введение суспензии ДНА-R выявило, что на 5-й минуте после её введения, плотность кровотока увеличивается, что можно связать с его циркуляцией в крови. На 25-й и 45-й минуте плотность кровотока постепенно снижается, что связано с выведением из кровотока ДНА-R. При этом уровень плотности заметно падает по сравнению с исходным уровнем.

Таблица 17. Экспериментальные данные относительной плотности по Хаусфилду из снимков рентгенограмм для эксперимента внутривенного введения *in vivo* НА-R и R во времени.

№ животоного	Вводимое вещество/время наблюдения	Исследуемые органы																	
		Мозг			Сердце			Печень			Селезенка			Почки			Печеночная вена		
		Тип среза тела/Плотность органов по Хаусфилду во времени																	
1	НА-R 1,2 мг/кг контроль	А			F			F			F			А			F		
	5 мин	31.9			40.1			49.7			53.5			34.6 35.5					
	25 мин	30.7			47.2			71.9			55.2			32.5 37.4			117.6		
	45 мин	27.7			48.5			48.6			49.4			20.6 32.7			118.2		
2	НА-R 2,5 мг/кг контроль	А			F			F			F			А					
	5 мин	32.5			37.9			59.7			49.7			30.8					
	25 мин	39.0			43.6			58.5			67.7			33.2					
	45 мин	32.7			44.5			64.6			62.0			45.0					
3	НА-R 0,5 мг/кг контроль	F			F			F			F			F					
	5 мин	28.8			37.2			66.2			71.9			37.6					
	25 мин	32.1			47.6			63.5			66.9			36.5					
	45 мин	25.4			46.0			85.9			61.6			41.6					
4	НА-R 5 мг/кг контроль	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	А		
	5 мин	40.1	31.2	26.9	27.3	40.6	47.0	43.8	52.0	56.1	53.4	56.3	53.4	36.6	42.8	39.0			
	25 мин	27.4	33.0	36.3	42.6	39.8	36.8	61.9	59.6	57.2	63.0	56.6	56.2	37.9	39.9	40.0			
	45 мин	34.8	33.4	32.3	32.3	40.3	41.7	49.4	43.6	45.7	62.8	58.4	56.8	36.7	33.9	35.5	33.4		
5	НА-R 5 мг/кг контроль	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A	L	F
	5 мин	25.9	23.7	26.5	38.6	38.0	34.8	56.8	57.9	63.1	61.2	59.9	53.0	34.3	36.1	31.8	33.8		138.7
	25 мин	26.5	25.1	30.0	21.8	23.1	28.7	53.2	58.3	58.9	54.1	56.1	57.8	33.5	31.4	32.4	30.7		65.5
	45 мин	25.5	21.3	30.4	34.5	34.2	34.4	38.2	54.6	57.8	56.6	59.6	55.3	30.5	34.2	32.2	29.8		66.6
6	НА-R 5 мг/кг контроль	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A		F
	5 мин	27.2	26.4	29.1	44.4	40.5	45.3	72.4	60.7	65.8	60.1	64	58.7	39.8	45.1	41.6	41.5		93.1
	25 мин	28.6	30.7	29.5	35.4	46.5	46.3	68.0	64.9	65.2	58.0	67.1	66.7	37.3	37.4	39.9	41.1		95.5
	45 мин	23.8	34.8	32.6	45.3	44.5	54.4	60.5	62.8	60.3	61.6	63.4	56.7	29.7	22.2	28.3	30.8		122.5
		26.6	29.0	27.9	49.3	40.4	43.1	84.7	57.4	62.6	61.5	60.5	57.1	27.5	35.3	29.9	36.1		98.4 175.7

7	НА-R 5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A		F
	контроль	28.5	23.6	25.0	31.2	41.9	40.4	65.5	66.1	67.4	64.0	63.8	65.4	37.6	39.7	34.3	34.6		127.5
	5 мин	27.0	20.0	22.1	47.2	34.0	36.2	68.0	60.0	53.5	59.0	61.8	59.7	39.3	38.8	44.5	32.6		247.0
	25 мин	29.7	29.7	23.9	40.9	37.6	37.0	66.1	67.1	76.7	63.7	63.9	62.8	37.6	35.8	32.1	38.9		124.2
	45 мин	-	-	-	34.3	43.1	42.0	61.4	63.3	61.4	89.9	60.9	65.7	33.5	33.4	33.7		159.9	
8	НА-R 5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A		F
	контроль	31.8	36.3	29.0	41.4	45.4	38.2	80.8	76.0	80.7	61.8	63.6	66.0	34.5	38.2	43.1	35.4		129.3
	5 мин	33.2	33.2	24.7	44.8	44.6	43.5	61.7	76.9	67.1	62.8	62.9	64.1	43.5	51.7	47.9	38.1		256.6
	25 мин	30.3	32.9	31.0	37.4	38.4	57.2	50.9	57.2	63.1	62.9	64.3	61.7	39.7	32.8	30.7	35.5		154.5
	45 мин	35.2	35.1	38.6	36.9	44.5	44.4	59.3	63.6	70.7	59.9	66.5	63.2	30.6	34.1	33.0	32.6		94.8
9	НА-R 5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A		F
	контроль	21.9	21.9	23.6	42.7	44.5	50.8	34.3	38.6	41.5	34.1	53.3	48.6	45.3	23.7	30.3	35.6		310.4
	5 мин	51.2	20.0	28.7	39.1	42.4	37.4	77.1	62.3	50.4	69.0	57.9	84.6	42.2	32.8	36.6	43.3		273.5
	25 мин	27.3	28.4	29.8	42.2	48.1	45.0	66.5	73.7	69.2	52.9	63.6	70.5	33.8	37.3	35.3	31.9		261.6
	45 мин	18.2	25.9	24.2	39.3	36.9	39.2	53.4	48.4	52.1	42.7	55.6	45.6	24.9	33.3	32.7	34.5		71.7
10	R 0,5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A	L	F
	контроль	34.0	36.7	27.9	42.6	50.4	40.7	54.8	57.5	52.3	63.8	57.7	49.2	42.0		35.3		40.7	96.9
	5 мин	12.9	25.8	28.8	37.5	46.7	38.4	59.8	58.7	60.6	49.0	56.1	49.5	32.3		36.0	34.2	33.2	46.5
	25 мин	28.1	27.5	24.9	46.6	50.6	40.7	59.1	55.8	57.9	61.0	48.4	52.0	36.3		32.3	35.5	30.3	74.9
	45 мин	31.1	36.9	29.1	44.6	44.1	35.6	56.1	54.4	58.2	58.3	52.3	47.8	40.0		29.6	35.9	36.0	169.2
11	R 0,5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A	L	F
	контроль	24.2	23.6	25.8	36.4	42.5	46.3	56.4	48.7	56.2	60.3	56.9	60.9	34.5		31.9		36.8	
	5 мин	29.0	25.5	31.4	42.0	39.9	44.1	53.2	57.4	55.7	53.1	56.9	53.6	36.6		34.3		37.5	
	25 мин	24.8	21.5	27.8	40.4	43.3	41.8	53.4	57.7	54.6	53.0	54.2	55.1	38.5		39.2		36.7	
	45 мин	29.1	28.8	31.2	43.3	43.0	43.7	57.7	51.4	51.4	54.2	53.7	56.1	36.7		37.9		39.5	
12	R 0,5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A	L	F
	контроль	24.9	23.8	27.8	44.0	49.8	45.0	61.4	61.7	62.5	56.7	59.9	58.4	45.3				39.4	
	5 мин	21.7	25.0	25.4	47.7	44.1	43.5	59.5	66.0	63.5	59.4	63.4	60.6	37.9				36.7	
	25 мин	27.5	29.1	29.0	29.8	31.6	34.3	62.3	58.0	60.3	54.6	58.4	56.0	30.9				33.6	
	45 мин	26.4	28.7	24.6	48.8	52.1	52.0	64.5	66.6	59.1	58.7	59.6	63.1	30.1				41.3	
13	R 0,5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A		F
	контроль	24.4	26.1	22.5	32.0	28.6	22.6	42.8	49.7	49.0	62.5	64.8	64.4	28.0	44.1	46.6	35.1		196.9
	5 мин	23.0	24.9	25.0	23.5	42.4	38.4	57.6	62.2	67.0	58.9	60.3	63.4	37.2	39.1	36.3	35.2		113.5
	25 мин	23.9	23.2	24.4	34.2	35.7	35.9	59.8	61.4	60.1	68.2	58.2	66.4	33.4	26.6	30.7	31.1		108.3
	45 мин	21.9	25.0	24.1	43.4	47.0	48.0	58.2	62.5	62.9	60.8	60.9	58.0	35.8	40.5	37.6	34.2		93.9
14	R 0,5 мг/кг	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	L	A	F	F	A	A		F
	контроль	23.3	21.4	27.0	40.2	42.9	43.0	60.5	61.1	57.5	63.8	62.7	60.1	41.2	38.2	41.9	42.7		178.3
	5 мин	24.8	30.7	28.6	38.0	47.1	35.2	68.7	61.0	64.5	58.6	59.8	56.1	38.5	39.0	44.1	44.6		37.7
	25 мин	20.8	19.9	23.3	51.4	47.0	45.2	68.2	65.3	61.9	57.0	55.7	61.6	33.7	34.0	36.4	31.2		43.2
	45 мин	32.2	29.3	31.5	35.7	37.2	43.0	71.0	68.7	63.3	62.9	64.9	61.9	36.8	32.7	31.9	33.2		152.1

Таблица 18. Плотность органов по Хаусфилду для внутривенного введения *in vivo* ДНА-  
R и R во времени.

РКВ, мг/кг	Экспер. точки, время после введения	Исследуемые органы/плотность по Хаусфилду, отн.ед.					
		Мозг	Сердце	Печень	Селезенка	Почки	Печеночн ая вена
<b>ДНА-R, 5 мг/кг</b>	контроль	28±5	41±5	60±5	58±5	37±5	160±5
	5 мин	29±5	38±5	61±5	62±5	39±5	188±5
	25 мин	30±5	41±5	57±5	61±5	33±5	146±5
	45 мин	30±5	41±5	59±5	59±5	34±5	119±5
<b>R, 0,5 мг/кг</b>	контроль	26±5	40±5	56±5	61±5	39±5	157±5
	5 мин	26±5	41±5	61±5	58±5	38±5	66±5
	25 мин	25±5	41±5	61±5	58±5	34±5	76±5
	45 мин	28±5	44±5	60±5	58±5	35±5	138±5

Обратная же ситуация наблюдается при введении суспензии R. На 5-й минуте после введения плотность кровотока в печеночной вене резко падает, а со временем - постепенно возрастает к первоначальному значению. Полученные различия связаны, по-видимому, с разным объемом распределения изучаемых веществ.

#### **Выводы:**

1. Плотности органов в различных плоскостях тела во времени при введении суспензий ДНА-R и R не меняются. Это связано с тем, что для исследования методом РКТ биораспределения наноалмазов в жизненно важных органах концентрация ДНА в суспензии оказалось недостаточной. Повышение же концентрации ДНА в суспензии для преодоления порога чувствительности метода РКТ не представляется фармакологически возможным.

2. Метод РКТ не применим для изучения биораспределения *in vivo* наноалмазных частиц в заданных диапазонах концентраций.

### **2.8. Специфическая активность конъюгата ДНА-глицин**

Известно, что заменимая аминокислота глицин, являясь центральным нейромедиатором тормозного типа действия, проявляет седативное действие и улучшает метаболические процессы в тканях мозга. В современной терапевтической практике глицин применяют как средство, ослабляющее влечение к алкоголю, уменьшающее явления абстиненции, депрессивные

нарушения, повышенную раздражительность, нормализующее сон, а также в комплексном лечении нарушений мозгового кровообращения.

Поэтому было решено изучить фармакологическую активность конъюгата ДНА с глицином (ДНА-глицин) на различных психофармакологических моделях *in vivo* по методикам [4], соответствующим проведению доклинических исследований новых препаратов для лечения и профилактики заболеваний ЦНС.

### 2.8.1. Антигипоксическая активность

Проблема гипоксии на протяжении многих десятилетий является чрезвычайно актуальной в медицине, в том числе в военной и спортивной, и привлекает постоянное внимание клиницистов и фармакологов с точки зрения профилактики, лечения и изучения механизмов развития различных патологических состояний, включая острые и хронические нарушения мозгового кровообращения и внезапную смерть.

Исследование антигипоксической активности конъюгата ДНА-глицин проводили в сравнении с глицином и широко известным в РФ препаратом сравнения мексидолом по методикам нормобарической гипоксии с гиперкапнией и гемической гипоксии.

**Нормобарическая гипоксии с гиперкапнией.** Установлено, что контрольные животные, помещенные в условия нормобарической гипоксии с гиперкапнией, погибают в среднем в течение 15-ти мин (Табл. 19). Из Табл. 19 видно, что конъюгат ДНА-глицин в дозе 0,5 мг/кг не оказывал антигипоксического действия, при повышении дозы до 1 мг/кг наблюдалась тенденция к увеличению времени выживания животных. В дозе 5 мг/кг конъюгат достоверно увеличивал (на 14,85 %) время выживания мышей, а в дозе 10 мг/кг время выживания мышей в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией достоверно увеличивалось на 21,49 % (Табл. 20). Глицин в дозе 1 мг/кг не оказывал противогипоксического действия. В дозе 10 мг/кг глицин достоверно (на 13,67 %) увеличивал время выживания мышей в условиях нормобарической гипоксии (Табл. 20). Препарат мексидол в десятикратной превышающей дозе (100 мг/кг) также достоверно увеличивал продолжительность жизни в условиях нормобарической гипоксии и имел схожий терапевтический эффект по сравнению с конъюгатом ДНА-глицин в дозе 10 мг/кг.

Таблица 19. Противогипоксическая активность конъюгата ДНА-глицин, глицина и мексидола при однократном введении в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией у мышей.

Вещества	Доза, мг/кг	Продолжительность жизни, мин
Контроль	–	15,08±0,45
ДНА-глицин	0,5	14,54±0,19
ДНА-глицин	1	16,09±0,21

ДНА-глицин	5	17,32±0,6*
ДНА-глицин	10	18,32±0,43*
Глицин	1	15,32±0,42
Глицин	10	17,14±0,41*
Мексидол	100	18,01±0,12*

\*-  $p < 0,05$  достоверность различий по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой контроля

Конъюгат ДНА-глицин в дозе 20 мг/кг (внутрибрюшинно, 2 раза: за 4 часа и 40 мин до посадки в гермообъем) достоверно на 35,63 % увеличивал по сравнению с контрольной группой продолжительность жизни животных в условиях гипоксии с гиперкапнией. (Табл. 20).

*Таблица 20.* Противогипоксическая активность конъюгата ДНА-глицин в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией при повторном введении.

Группа, доза, число животных	Доза, мг/кг	Продолжительность жизни, мин
Контроль	–	25,56±1,28
ДНА	эквив. Объем	28,23±0,41
ДНА-глицин	20	34,26±2,03*

\*-  $p < 0,05$  достоверность различий по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой контроля.

Из данных Табл. 19 и 20 видно, что ДНА не изменял время выживания животных по сравнению с показателями контрольных животных. Следовательно, ДНА не обладает противогипоксическим эффектом.

**Гемическая гипоксия.** Установлено, контрольные животные в условиях гемической гипоксии погибают, в среднем, в течение 18 мин после введения нитрита натрия (Табл. 22). Конъюгат ДНА-глицин в дозе 10 мг/кг статистически достоверно и существенно (в 1,73 раза) увеличивал по сравнению с контролем время выживания мышей. Противогипоксическое действие конъюгата ДНА-глицин имеет дозозависимый характер и усиливается с увеличением дозы. Глицин в дозе 10 мг/кг статистически достоверно увеличивал (в 1,45 раза по сравнению с контролем) время выживания мышей в условиях гемической гипоксии (Табл. 22). В этих же условиях мексидол в дозе 100 мг/кг не увеличивал продолжительность выживания животных по сравнению с контролем.

Таблица 21. Противогипоксическая активность конъюгата ДНА-глицин, глицина и мексидола в тесте гемической гипоксии.

Вещества	Доза, мг/кг	Продолжительность жизни, мин
Контроль, дист. Вода	–	17,58±0,75
ДНА-глицин	10	30,49±2,4*
Глицин	10	25,50±3,57*
Мексидол	100	20,5±3,45

\*-  $p < 0,05$  достоверность различий по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой контроля.

**Вывод:** полученные данные свидетельствуют о наличии выраженной притивогипоксической активности конъюгата ДНА-глицин в условиях моделей нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и гемической гипоксии, что характеризуется статистически достоверным увеличением времени выживания животных в условиях гипоксий. Противогипоксический эффект конъюгата ДНА-глицин имеет дозозависимый характер и усиливается с увеличением дозы от 10 до 20 мг/кг и выявляется как при однократном, так и при повторном введении. По противогипоксической активности в тесте нормобарической гипоксии конъюгат ДНА-глицин превосходит ДНА, не уступает глицину и препарату сравнения мексидолу, а в тесте гемической гипоксии существенно превосходит как ДНА и глицин, так и препарат сравнения мексидол.

### 2.8.2. Противоинсультная активность

Ежегодно наблюдаемый рост числа цереброваскулярных заболеваний, высокая смертность населения от инсульта и значительная инвалидизация больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения позволяют рассматривать эти заболевания не только как медицинскую, но и как социальную проблему.

Инсульт занимает 2-е место в структуре общей смертности населения и является основной причиной стойкой утраты трудоспособности: примерно 20% больных, перенесших инсульт, становятся тяжелыми инвалидами и нуждаются в посторонней помощи. По патогенезу выделяют геморрагический и ишемический инсульты, в том числе связанные с поражением артерий крупного калибра.

Среди всех видов инсульта преобладают ишемические поражения мозга. Но наиболее тяжелым осложнением различных заболеваний сосудов мозга является геморрагический инсульт (внутричерепное кровоизлияние), который возникает в любом возрасте.

Известна эффективность глицина при остром ишемическом инсульте. Установлено, что глицин (сублингвально, 1-2 г/сут. в течение 5 дней) положительно влияет на клинический исход заболевания, снижает 30-дневную летальность, ускоряет регресс неврологической симптоматики, расстройств сознания и других общемозговых симптомов, признаков отека мозга, очагового дефекта, улучшает функциональное восстановление больных, вызывает достоверное уменьшение объема инфаркта мозга и торможение последующей кистозной трансформации очага. Побочным эффектом препарата является легкая седация.

Исследований положительного влияния глицина на лечение и профилактику геморрагического инсульта не известно.

Изучение динамики выживания/гибели крыс после операции показало, что к 14-му дню наблюдения выжило 90 % ложнооперированных животных, а в группе крыс с геморрагическим инсультом выжило только 40 % крыс, что статистически достоверно (при  $P \leq 0,05$ ) меньше, чем у ложнооперированных животных (Табл. 23). После ежедневного 7-ми дневного введения конъюгата ДНА-глицин (4 мг/кг) к концу эксперимента выжило 60% крыс, что статистически достоверно (при  $P \leq 0,05$ ) выше (в 1,5 раза), чем выживание в группе крыс с инсультом (Табл. 22).

На фоне препарата сравнения мексидола (200 мг/кг, 7 дней) к 14-м суткам выжило 70% крыс, что было достоверно по сравнению с контролем геморрагического инсульта (Табл. 22).

Таблица 22. Влияние конъюгата ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) на гибель крыс после геморрагического инсульта.

Группа крыс	Количество погибших животных после операции по отношению к общему числу прооперированных животных в а.е. и в %							
	Время после операции, сут.							
	1		3		7		14	
	а.е.	%	а.е.	%	а.е.	%	а.е.	%
Интактные	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0
Ложнооперированные	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10
С геморрагическим инсультом	2/20	10	4/20	20	10/20	50 <sup>#</sup>	14/20	70 <sup>#</sup>
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин	0/10	0	2/10	20	3/10	30	4/10	40 <sup>&amp;</sup>
С геморрагическим инсультом + мексидол	1/10	10	1/10	10	3/10	30	3/10	30 <sup>*</sup>

<sup>#</sup> - достоверность значений от ложнооперированных крыс, при  $P \leq 0,05$  (точный критерий Фишера); <sup>\*</sup> - достоверность значений от крыс с геморрагическим инсультом, при  $P \leq 0,05$  (точный

критерий Фишера); & - тенденция к достоверности значений от крыс с геморрагическим инсультом, при  $P \leq 0,1$  (t-критерий Стьюдента).

Таким образом, конъюгат ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) уменьшал гибель животных после геморрагического инсульта на уровне тенденции достоверности ( $P \leq 0,1$ ) и несколько уступал по этому показателю 50-кратно превосходящему по дозе мексидолу (200 мг/кг, 7 дней), который достоверно уменьшал гибель животных.

Установлено, что в группе ложнооперированных крыс количество животных с легкими неврологическими нарушениями (вялость движений, слабость конечностей, односторонний полуптоз) составляло от 33 до 60%, а тяжелые неврологические нарушения у ложнооперированных крыс не наблюдались. У крыс с геморрагическим инсультом (у 50- 67% животных) выявлялись тяжелые неврологические нарушения в виде манежных движений, парезов и параличей конечностей. Конъюгат ДНА-глицин значительно снижало степень тяжести неврологических нарушений, что проявлялось в статистически достоверном уменьшении процента крыс с тяжелыми неврологическими проявлениями (парезы, параличи конечностей) на протяжении всего времени наблюдения – на 1-е, 7-е и 14-е сутки после инсульта (Табл. 23). Наряду с этим, конъюгат ДНА-глицин снижало выраженность неврологического дефицита, что проявлялось в достоверном уменьшении числа баллов по шкале McGrow на 1-е и 14 сутки после инсульта (Табл. 23).

Таблица 23. Шкала оценки неврологического дефицита у животных по шкале Stroke-index McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной.

Неврологические симптомы Stroke index	Оценка неврологического статуса по шкале McGrow в баллах
<i>Вялость, замедленность движений</i>	0,5
<i>Слабость конечностей</i>	1
<i>Тремор</i>	1
<i>Односторонний полуптоз</i>	1
<i>Двусторонний полуптоз</i>	1,5
<i>Односторонний птоз</i>	1,5
<i>Двусторонний птоз</i>	1,5
<i>Манежные движения</i>	2
<i>Парез 1-4 конечностей</i>	2,0-5,0
<i>Паралич 1-4 конечностей</i>	3,0-6,0
<i>Коматозное состояние</i>	7

Мексидол также вызывал ослабление неврологического дефицита, достоверно уменьшая количество животных с тяжелыми нарушениями, но только на 14-й день после операции (Табл.

25). Мексидол достоверно не уменьшал выраженность неврологического дефицита в баллах по шкале McGrow. На 1-е и 7 сутки после инсульта наблюдалась лишь тенденция к снижению этого показателя (Табл. 24).

Таблица 24. Влияние конъюгата ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) на % животных с неврологическим дефицитом (по шкале McGrow) после геморрагического инсульта.

Группа крыс	Кол-во животных с легкими нарушениями, %					
	Время после операции, сут.					
	1		7		14	
	А.е.	%	А.е.	%	а.е.	%
Интактные	0/10	0	0/10	0	1/10	0
Ложнооперированные	6/10	60	5/10	50	3/9	33
С геморрагическим инсультом	10/18	55,5	4/12	33,3	2/9	22
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин	7/10	70	4/7	57	5/6	83*
С геморрагическим инсультом + мексидол	6/9	66,5	4/7	57	3/7	43*
	Кол-во животных с тяжелыми нарушениями, %					
Интактные	0/10	0	1/10	0	0/10	0
Ложнооперированные	0/10	0	0/10	0	0/9	0
С геморрагическим инсультом	8/18	44,5 <sup>#</sup>	8/12	66,6 <sup>#</sup>	6/9	67
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин	1/10	10*	2/7	28*	1/6	16*
С геморрагическим инсультом + мексидол	2/9	22	3/7	43	2/7	28*

# - достоверность от ложнооперированных крыс, при  $P \leq 0,05$  (точный критерий Фишера);\* - достоверность от крыс с ГИ, при  $P \leq 0,05$  (точный критерий Фишера).

Таким образом, конъюгат ДНА-глицин в дозе 4 мг/кг обладает способностью уменьшать неврологические дефициты, наблюдаемые после геморрагического инсульта по шкале McGrow. Под влиянием конъюгата ДНА-глицин наблюдается статистически достоверное уменьшение процента крыс с тяжелыми неврологическими проявлениями (парезы, параличи конечностей) и уменьшение выраженности неврологического дефицита (Stroke-index), вычисляемого по числу баллов по шкале McGrow, на протяжении всего времени наблюдения (1–14-е сут. после инсульта).

Мексидол (200 мг/кг, 7 дней) достоверно уменьшает процент животных с тяжелыми нарушениями только на 14 день после операции и достоверно не уменьшает выраженность неврологического дефицита в баллах (Stroke index) по шкале McGrow (Табл. 25).

Таблица 25. Влияние конъюгата ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) на Stroke index по шкале McGrow, выраженный в баллах у крыс после геморрагического инсульта.

Группа крыс	Оценка неврологического статуса по шкале McGrow в баллах (среднее на группу)		
	Время после операции, сут.		
	1	7	14
Интактные	0	0	0
Ложнооперированные	1,05 ± 0,28	0,7 ± 0,21	0,35 ± 0,13
С геморрагическим инсультом	3,38 ± 0,48 <sup>#</sup>	4,28 ± 0,9 <sup>#</sup>	2,89 ± 1,12 <sup>#</sup>
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин	1,9 ± 0,37 <sup>*</sup>	1,9 ± 0,87 <sup>*</sup>	1,42 ± 0,45 <sup>*</sup>
С геморрагическим инсультом + мексидол	2,05 ± 0,54 <sup>&amp;</sup>	2,79 ± 0,65 <sup>&amp;</sup>	2,0 ± 0,82

<sup>#</sup> - достоверность значений от ложнооперированных крыс, при  $P \leq 0,05$  (t-критерий Стьюдента); <sup>\*</sup> - достоверность значений от крыс с геморрагическим инсультом, при  $P \leq 0,05$  (t-критерий Стьюдента); <sup>&</sup> - тенденция к достоверности значений от крыс с геморрагическим инсультом, при  $P \leq 0,1$  (t-критерий Стьюдента).

Таким образом, конъюгат ДНА-глицин превосходит мексидол по способности уменьшать проявления неврологического дефицита по шкале McGrow после геморрагического инсульта.

Изучение влияния конъюгата ДНА-глицин на нарушение моторных функций и координации движений после геморрагического инсульта проводили в тесте вращающегося стержня. На горизонтальный стержень диаметром 4 см, вращающийся со скоростью 3 об/мин, помещали крыс. Неспособность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2-х мин рассматривали как проявление нарушения координации движений [20]. Установлено, что у крыс с геморрагическим инсультом ухудшаются моторные функции и координация движений, обусловленные неврологическими нарушениями, что выражается в статистически достоверном увеличении количества падений со стержня за 2 мин (Табл. 26).

В группе крыс с геморрагическим инсультом, получавших конъюгат ДНА-глицин (4 мг/кг в течение 7 дней), количество падений животных с вращающегося стержня было снижено (при  $P \leq 0,1$ ) по сравнению с контрольными животными с геморрагическим инсультом на 7-е и 14-е сутки после операции (Табл. 27). Это уменьшение наблюдалось на уровне тенденции. Мексидол не уменьшал число падений с вращающегося стержня даже на уровне тенденции (Табл. 26).

Таблица 26. Влияние конъюгата ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) на координацию движений крыс с геморрагическим инсультом в тесте вращающегося стержня.

Группа животных	Количество падений за 2 мин		
	Время после операции, сут.		
	1	7	14
Интактные	1,23± 0,15	0,18± 0,08	0,12 ± 0,09
Ложнооперированные	1,82 ± 0,71	0,40 ± 0,11	0,80 ± 0,36
С геморрагическим инсультом	3,80 ± 0,52 <sup>#</sup>	4,33 ± 1,02 <sup>#</sup>	2,25 ± 0,56 <sup>#</sup>
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин	5,44 ± 1,21	2,40 ± 0,67 <sup>&amp;</sup>	0,8 ± 0,58 <sup>&amp;</sup>
С геморрагическим инсультом + мексидол	3,47 ± 1,13	2,96 ± 0,84	1,51± 0,63

# - достоверность значений от ложнооперированных крыс, при  $P \leq 0,05$  (t-критерий Стьюдента); & - тенденция к достоверности значений от крыс с геморрагическим инсультом, при  $P \leq 0,1$  (t-критерий Стьюдента).

Таким образом, конъюгат ДНА-глицин уменьшает неврологический дефицит, улучшает моторные функции в тесте вращающегося стержня после геморрагического инсульта, что выражается в уменьшении числа падений животных со стержня.

Установлено, что при воспроизведении УРПИ через 24 ч после обучения, 100 % интактных животных и 80 % ложнооперированных крыс помнили об ударе током и не заходили в темную “опасную” камеру. Через 14 сут. после инсульта до 70 % интактных крыс и 50 % ложнооперированных крыс осуществляли рефлекс пассивного избегания (Табл. 28). У крыс с геморрагическим инсультом при воспроизведении УРПИ через 24 ч после обучения наблюдалось снижение латентного времени рефлекса и уменьшение количества обучившихся животных до 50%. К 14-м сут. почти все животные забывали ситуацию и заходили в темную камеру, при этом помнили УРПИ только 12,5% крыс. Эти данные свидетельствуют о развившемся дефиците обучения и памяти у крыс с геморрагическим инсультом (Табл. 27).

Таблица 27. Влияние конъюгата ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) на обучение и воспроизведение УРПИ у крыс после геморрагического инсульта.

Группа животных	Обучение	Воспроизведение рефлекса	
	Латентное время рефлекса, с	Латентное время рефлекса, с	Количество животных не зашедших в темную камеру, %
1-е сутки			
Интактные	28,36 ± 5,46	180,0 ± 0,0	100
Ложнооперированные	38,2 ± 7,71	152,4 ± 24,69	80
С геморрагическим инсультом	89,67±26,18	106,2± 28,11 <sup>#</sup>	50 <sup>#</sup>
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин	90,3±21,33	180,0 ± 0,0*	100*
С геморрагическим инсультом + мексидол	56,25 ± 19,1	130,4 ± 20,1	60
7-е сутки			
Интактные		166,5± 13,5	90
Ложнооперированные		105,1 ± 21,7	60 <sup>#</sup>
С геморрагическим инсультом		47,26 ± 23,17	14
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин		160,0 ± 20,0*	85*
С геморрагическим инсультом + мексидол		102,18 ±23,51*	50*
14-е сутки			
Интактные		132,4± 23,96	70
Ложнооперированные		96,33 ± 34,02	50
С геморрагическим инсультом		46,4 ± 31,7 <sup>#</sup>	12,5 <sup>#</sup>
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин		180,0 ± 0,0 *	100*
С геморрагическим инсультом + мексидол		62,9 ± 16,1	40*

# - достоверность от ложнооперированных крыс, при  $P \leq 0,05$  (точный критерий Фишера, t-критерий Стьюдента); \* - достоверность от контрольных крыс с геморрагическим инсультом, при  $P \leq 0,05$  (точный критерий Фишера, t-критерий Стьюдента).

В группе крыс с геморрагическим инсультом, получавших конъюгат ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней), почти все животные воспроизводили УРПИ на протяжении всего времени наблюдения,

что выражалось в увеличении латентного времени рефлекса и в количестве животных, не зашедших в темную камеру (Табл. 27).

На фоне мексидола также наблюдалось увеличение количества обучившихся крыс по сравнению с контрольными животными с геморрагическим инсультом с 1 по 14-е сутки после операции, показатели которых были сопоставимы с результатами ложнооперированных животных (Табл. 27).

Таким образом, конъюгат ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) полностью восстанавливал нарушенную геморрагическим инсультом способность животных к обучению и запоминанию обученного, что выражалось в достоверном увеличении латентного времени захода в темную камеру и процента животных, хорошо запомнивших ситуацию и совсем не зашедших в темную камеру, как через 24 ч, так и спустя 14 сут. после инсульта. Сопоставление эффектов конъюгата ДНА-глицин и мексидола на нарушенные геморрагическим инсультом когнитивные функции показывает, что конъюгат ДНА-глицин обладает более выраженной способностью восстанавливать и улучшать нарушенную инсультом способность к обучению и запоминанию информации при уменьшенной дозировке препарата.

Изучение влияния конъюгата ДНА-глицин на двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональность после геморрагического инсульта оценивали в условиях методики открытого поля. Установка открытое поле для крыс представляет собой камеру площадью 60х60 см с прозрачной крышкой. Пол камеры разделен равномерно линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 4 см. На 10-е сутки после геморрагического инсульта в процессе 3-х мин пребывания крысы в открытом поле регистрировали число вставаний на задние лапки (вертикальная двигательная активность), число переходов из квадрата в квадрат (горизонтальная двигательная активность), число обследований отверстия, число умываний (груминг) и количество болюсов.

При исследовании крыс с геморрагическим инсультом в тесте открытого поля (на 11-е сут. после операции) регистрировалось снижение двигательной активности (на уровне тенденции) и статистически достоверное увеличение количества эпизодов груминга и числа фекальных болюсов, что характеризуется как повышенное эмоциональное напряжение, по сравнению с животными интактной и ложнооперированной групп (Табл. 28).

*Таблица 28.* Влияние конъюгата ДНА-глицин (4 мг/кг, 7 дней) на поведение крыс с геморрагическим инсультом в тесте открытого поля.

Группа животных	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Обследование отверстий	Груминг	Кол-во болюсов
Интактные	19,73±3,65	6,05±1,45	4,21±1,58	1,32±0,26	1,74±0,28
Ложнооперированные	15,54±3,22	3,23±0,63	3,67±0,94	1,46±0,35	1,07±0,17
С геморрагическим инсультом	11,17±3,23	5,83±2,02	4,0±1,16	3,16±0,5 <sup>#</sup>	2,16±0,0 <sup>#</sup>
С геморрагическим инсультом + конъюгат ДНА-глицин	3,5±1,43*	1,0±0,36*	0,83±0,47*	1,2±0,07*	2,1±0,68*
С геморрагическим инсультом + мексидол	12,65±2,87	4,54±1,13	3,88±1,27	1,49±0,33	0,9±0,11

# - достоверность от ложнооперированных крыс, при  $P \leq 0,05$  (t-критерий Стьюдента); \* - достоверность от крыс с геморрагическим инсультом, при  $P \leq 0,05$  (t-критерий Стьюдента).

После введения конъюгата ДНА-глицин наблюдалось статистически достоверное ( $P \leq 0,05$ ) снижение, по сравнению с контрольными крысами с геморрагическим инсультом, двигательной активности (по показателям горизонтальных и вертикальных перемещений), ориентировочно-исследовательского поведения (по показателю обследования отверстий) и груминга и нормализация эмоционального статуса (по показателям эпизодов груминга и количеству фекальных болюсов) (Табл. 28). Полученные данные подтверждают наличие у конъюгата ДНА-глицин седативного действия и способности улучшать эмоциональное состояние животных после инсульта.

Мексидол не вызывал достоверных изменений поведения животных в открытом поле по сравнению с показателями крыс с инсультом (Табл. 28).

**Вывод:** конъюгат ДНА-глицин в дозе 4 мг/кг и режиме введения в течение 7-ми дней после инсульта обладает позитивным эффектом на экспериментальной модели геморрагического инсульта, что выражается в уменьшении гибели животных, в ослаблении проявлений неврологического дефицита и улучшении нарушенных инсультом когнитивных функций и эмоционального статуса.