

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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Рязань – 2016

Работа выполнена в Рязанском государственном медицинском университете имени академика И.П. Павлова и Химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Научные руководители:** **Лисичкин Георгий Васильевич**  
доктор химических наук, профессор

**Леонидов Николай Борисович**  
Заслуженный изобретатель РФ,  
доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Мясоедов Борис Федорович**  
академик РАН, доктор химических наук,  
профессор, главный научный сотрудник ФГБУН  
«Институт физической химии и электрохимии им.  
А.Н. Фрумкина РАН»

**Скачилова София Яковлевна**  
доктор химических наук, профессор,  
заведующая Отделом химии и технологии  
синтетических лекарственных средств ОАО  
«Всероссийский научный центр по безопасности  
биологически активных веществ»

**Ведущая организация:** **ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский  
государственный технологический институт  
(технический университет)»**

Защита состоится «21» октября 2016 года в 16 ч 30 мин на заседании Диссертационного совета Д 501.001.90 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова в аудитории 446 Химического факультета МГУ по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: <http://www.chem.msu.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета Д 501.001.90  
кандидат химических наук, доцент

 Шилина М.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Для создания систем доставки лекарственных веществ (ЛВ) предложено большое число наноносителей, из которых наиболее перспективными признаны углеродные носители – фуллерены, нанотрубки, графен. В последние годы в качестве носителей стали рассматриваться и детонационные наноалмазы (ДНА) (D. Но, 2010; A. Vul' et al., 2014; O.A. Williams, 2014).

ДНА в промышленном масштабе получают детонацией взрывчатых веществ при утилизации боеприпасов. ДНА представляют собой ультрадисперсные углеродные материалы со средним размером первичных частиц 5 нм, которые состоят из алмазного ядра, нарушенной углеродной оболочки и поверхностного слоя, образованного различными функциональными группами (ФГ) (И.И. Кулакова, 2004; В.Ю. Долматов, 2011). ДНА уже нашли применение при получении гальванических покрытий, полимерных композиций, смазочных материалов, полировальных паст, а также в системах магнитной записи (O. Shenderova et al., 2010; П.А. Витязь и др., 2013). За счет ФГ поверхность ДНА можно направленно модифицировать и прививать на нее различные соединения, в том числе, биологически активные и лекарственные (И.В. Шугалей и др., 2012).

В настоящее время именно ДНА начали привлекать внимание исследователей в развитых странах в качестве эффективных наноносителей в системах доставки биологически активных веществ (БАВ) и ЛВ (D. Но et al., 2015). Это связано с оптимальным сочетанием их физико-химических и биофармацевтических свойств. При этом ДНА не обладают канцерогенными или мутагенными свойствами, нетоксичны и биосовместимы. Высказано мнение, что ДНА может являться «идеальным наноносителем для создания систем доставки» ЛВ (E.K.H. Chow, 2011).

Основными проблемами углеродных наночастиц, в том числе и ДНА, при создании систем доставки ЛВ на их основе являются сложность стандартизации, унифицирования и визуализации в медико-биологических экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Изучение абсорбции (биораспределения) ДНА в организме, их фармакокинетики и фармакодинамики невозможно без разработки надёжных и точных методов качественного и количественного определения ДНА в гидрозолях, биологических жидкостях, тканях, органах и целостном организме. Решение этих задач крайне актуально не только для наномедицины, но и химии, нанотехнологии и биофармации, и позволит использовать ДНА в качестве эффективного носителя БАВ и ЛВ.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы является установление роли химических, физико-химических и биофармацевтических факторов при применении ДНА в качестве 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 БАВ и ЛВ;
- разработать способы иммобилизации диагностических соединений, БАВ и ЛВ на поверхности ДНА;
- разработать способы дезагрегации частиц ДНА, способы приготовления их стабильных гидрозолей и стерилизации;
- изучить диффузию частиц ДНА через модельную и биологическую мембраны;
- изучить методом ПЭМ проникновение частиц ДНА и его конъюгатов с ЛВ в клетку;
- изучить на моделях *in vitro* и *in vivo* токсичность ДНА и его конъюгатов с ЛВ;
- разработать способы визуализации и количественного определения ДНА в воде, биологических жидкостях, тканях и органах и изучить абсорбцию 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 индуктивно-связанной плазмы с масс-спектрометрией (ИСП-МС) и гамма-активационного анализа (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, УЗО и ЦФ. 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 БАВ и ЛВ.

4) Синтезированы конъюгаты ДНА с БАВ и ЛВ: *аминокислотами* глицином и цистеином, *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 метода ИСП-МС. Впервые синтезирован ДНА с тритиевой меткой и применен для визуализации частиц *ex vivo* с помощью метода жидкостной сцинтилляционной спектрометрии (ЖСС).

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

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 цитозоле клетки в виде цепочечных агрегатов, которые не окружены мембраной, и не оказывают токсического действия на структурные элементы клетки.

8) Впервые на трех видах экспериментальных животных (мыши, крысы, кролики) при разных путях введения с использованием нескольких методов визуализации изучено биораспределение ДНА в течение 6 месяцев. 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 (мыши, 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 (МБК) конъюгата ДНА-амикацин в 2-4 раза по сравнению с нативным амикацином.

10) 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 водорода (до 25,75 раза), превосходя по этому показателю глицин и лекарственный препарат сравнения мексидол.

11) Впервые выявлены и изучены специфическая (антиоксидантная, антигипоксическая и противоинсультная) активность синтезированного конъюгата ДНА-глицин в сравнении с глицином и лекарственным препаратом мексидолом. Показано, что конъюгат ДНА-глицин при меньшей дозировке превосходит действие глицина и мексидола, при этом проявляет новый вид фармакологической активности, не выявленной у глицина.

12) Предложен гипотетический механизм обнаруженного явления изменения интенсивности и спектра специфической фармакологической активности ЛВ при его иммобилизации на поверхности ДНА (рабочее название «эффект амплификации модифицирующей активности БАВ») как следствие образования супрамолекулярного комплекса при межмолекулярном взаимодействии иммобилизуемого ЛВ с поверхностью ДНА.

**Практическая значимость работы.** Полученные в работе данные могут быть использованы для синтеза конъюгатов ДНА с ЛВ и/или БАВ, визуализации ДНА в организме *ex vivo* с применением методов ИСП-МС и ЖСС, позволяющих количественно определять концентрацию ДНА во органах и тканях экспериментальных животных. 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 противоинсультным 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 (EP Pat. № 2687207, 2015; патент РФ № 2560697, 2015); конъюгат наноалмаза с глицином и способ его получения (US Pat. № 9254340, 2016; EP Pat. № 2662080, 2015; 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 учебно-образовательный процесс кафедры фармацевтической технологии РязГМУ им. акад. 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».

**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;
- способ повышения устойчивости гидрозолей ДНА с определенными размерами частиц (15-30, 50-70, 90-100 нм и др.) при использовании комплексного подхода, включающего химическое модифицирование, УЗО и центрифугирование (ЦФ);

- способ определения концентрации ДНА в гидрозолях методами спектрофотометрии и флуориметрии в диапазонах 4-1000 и 0,5-117 мкг/мл, соответственно;

- оптимизация прививки на поверхность ДНА БАВ и ЛВ, имеющих  $-NH_2$ ,  $-COOH$  или  $-SH$  функциональные группы;

- методики визуализации ДНА в организме экспериментальных животных *ex vivo* с помощью йодной (привитой трийодбензиловый спирт) и 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 экспериментальных животных 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*;

- специфическая антиоксидантная, антигипоксическая и противоинсультная активности конъюгата ДНА-глицин.

**Степень достоверности результатов** химических и физико-химических исследований обусловлена тем, что использовался широкий набор современных инструментальных методов исследования, выполненных на сертифицированном оборудовании. Биологические эксперименты проводились с использованием утвержденных Минздравом России методик доклинических исследований БАВ. Показана воспроизводимость результатов исследования, выводы работы согласуются с опубликованными экспериментальными данными автора.

**Личный вклад автора** состоит 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.

**Публикации и апробация работы.** По результатам работы опубликовано 15 статей в рецензируемых печатных изданиях, 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.

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); 12th 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 «Наноматериалы 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 (МГУ, Москва, 2016).

### **Структура и объем работы.**

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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы работы и выбор объектов исследования, сформулированы цели и задачи работы, отмечена ее научная новизна.

В **Главе 1 (Обзор литературы)** рассмотрены вопросы получения, очистки ДНА, строение его частицы, химический и функциональный состав, методы химического модифицирования поверхности ДНА, способы и примеры иммобилизации на ней БАВ и ЛВ, дезагрегация частиц ДНА, получение и характеристики гидрозолей, способы визуализации ДНА *in vitro* и *in vivo*, данные о биораспределении ДНА в организме экспериментальных животных и применении ДНА в биомедицинских приложениях, в том числе, как носителя БАВ и ЛВ.

В **Главе 2 (Экспериментальная часть)** приводятся описания исследованных промышленных образцов ДНА, процедур модифицирования его поверхности, методик прививки на нее БАВ и ЛВ, используемых в работе инструментальных методов исследования, методик проведения физико-химических, биофармацевтических и биологических экспериментов, а также характеристики экспериментальных животных.

В работе использовали ДНА трех фирм-производителей: ЗАО «Алмазный центр» (ФГУП «СКТБ «Технолог»), Россия – марки УДА-ТАН, УДА-СФ и УДА-СТП; «PlasmaChem», ФРГ – марки PL-SDND, PL-D-G01; «Adamas nanotechnologies», США – марка Standart ND.

Всего в работе было использовано 352 мыши, 60 крыс и 44 кролика. Все эксперименты были выполнены в соответствии с общепринятыми этическими нормами.

В работе были применены следующие физико-химические методы: ПЭМ (JEM-2100 F, JEM 1230 и JEM 1011, JEOL, Япония); СЭМ (LEO 1455 VP, Carl Zeiss, ФРГ) с детектором Centarius; ИК-спектроскопия (IR200 Thermo Nicolet, Thermo Scientific, США); КР-спектроскопия (Ramanor U1000, Jobin Yvon, Франция; аргоновый лазер Stabilite 2017, Spectra-Physics, США),  $\lambda = 514$  и  $488$  нм; РФЭС (LAS-3000, Riber, Франция), анализатором ОРХ-150,  $A_{K\alpha} = 1486,6$ ,  $U_{\text{труб.}} = 12$  кВ,  $I_{\text{эмис.}} = 20$  мА,  $P = 7 \cdot 10^{-8}$  Па, калибровка по С 1s с  $E_{\text{св}} = 285$  эВ; ДСК (Mettler DSC-30, Mettler Toledo, США) в интервале температур от  $-80$  до  $+30$  °С,  $\nu = 5$  град/мин; ДРС (Zetasizer Nano ZS Zen3600, Malvern Instruments, Великобритания); РФА (STOE STADI P, STOE & Cie, ФРГ), геометрия  $\Theta/\Theta$  с  $\text{CuK}\alpha$  излучением; ИСП-МС (Elan DRC II, Perkin Elmer, США); ГАА на циклическом ускорителе электронов «Микротрон-Ст» (ЦНИИ Агат, Россия),  $E_{\text{эл}} = 21$  МэВ;  $I_{\text{эл}} = 10$  мкА;  $\nu = 200$  и  $400$  Гц;  $t_{\text{имп}} = 3$  мкс; поток гамма-квантов до  $n \cdot 10^{13}$   $\gamma/\text{с}$ , регистрация активности

на полупроводниковом детекторе Canberra GC1020; измерение  $S_{уд}$  по БЭТ на ASAP 2020, «Micromeritics», США; ЖСС (спектрометр Rackbeta 1215, LKB Wallac, Финляндия); ВЭЖХ (хроматограф Shimadzu, Япония),  $\lambda = 195$  нм, колонка Kromasil 100-5C18,  $v = 1$  мл/мин), УФ-видимая спектрофотометрия (Shimadzu UV-1800, Shimadzu, Япония), флуориметрия (спектрофлуориметр Флуорат-02-Панорама, Люмэкс, Россия),  $\lambda = 488$  нм; потенциометрическое титрование.

Химическим модифицированием поверхности ДНА получали гидрированный ДНА-Н ( $H_2$ , 800 °С, 2-8 ч), окисленный ( $O_2$ , воздух = 400 °С, 5 ч; воздушная плазма,  $T_{комн.}$ , 2 ч;  $O_3$ ,  $T_{комн.}$ , 1 ч), карбоксилированный ДНА- $COOH$  (смесь  $HNO_3/H_2SO_4 = 1:4$ , 120 °С, 24 ч; 1)  $SOCl_2$ ,  $T_{комн.}$ , 24 ч, 2)  $H_2O$ , 1 ч); восстановленный ДНА-ОН (окисление ДНА- $COOH$   $LiAlH_4/ТГФ$ ,  $T_{комн.}$ ,  $Ar$ , 12 ч), фторированный ДНА (плазма  $SF_6$ ,  $T_{комн.}$ , 2,5 ч), хлорированный ДНА- $Cl$  (плазма  $CCl_4$ ,  $T_{комн.}$ , 6 ч;  $Cl_2/CCl_4$ ,  $h\nu$ , 6 ч, 20-60 °С;  $SOCl_2$ ,  $T_{комн.}$ , 24 ч), аминированный ДНА- $NH_2$  (ДНА- $Cl$ ,  $NH_3$ , 450 °С, 3 ч)

На поверхность ДНА были привиты *линкеры*: этилен- (ДНА- $Hal$ , ДМСО,  $Pu$ , 120 °С, 24 ч) и гексаметилендиамины (EtOH,  $Pu$ , 80 °С, 24 ч), *маркеры* – 3,4,6-трийодбензиловый спирт (ДНА- $Cl$  в ТГФ, 80 °С, 48 ч; ДНА- $Cl$ ,  $NaN$ , 80 °С, 60 ч), тритий (ДНА, ДНА-Н, метод термической активации трития (МТАТ),  $T_2$ , W-нить, 2000 °С, 10 с).

Конъюгаты ДНА-БАВ были получены с: *глицином* (ДНА- $Cl$ , EtOH/ $H_2O$ , основание Хунига, 80 °С, 24 ч), *цистеином* (ДНА- $Cl$ , EtOH, основание Хунига, 78 °С, 12 ч), *амикацином* (ДНА- $Cl$ , основание Хунига, EtOH, 50 °С, 24 ч), *янтарной кислотой* (ДНА-ОН, янтарный ангидрид,  $CHCl_3$ , 60 °С, 24 ч), протеолитическими ферментами – *трипсином*, *папаином*, *химотрипсином* (ДНА- $COOH$ , EDC, 30 мин, NHS, буфер MES + фермент, 4 °С, 24 ч), *пирофосфатазой* (ДНА- $NH_2$ , глутаровый альдегид, буфер Нерес-КОН,  $T_{комн.}$ , 1 ч).

Гидрозоли химически модифицированных образцов ДНА готовили несколькими циклами «УЗО в течение 1-2 мин - ЦФ при 6000-11000 об/мин». Концентрацию ДНА в гидрозолях определили гравиметрическим методом (пьезокварцевым микровзвешиванием или высушиванием на покровном стекле), а также по разработанным нами методикам с помощью спектрофотометрии и флуориметрии.

Изучение диффузии ДНА проводили в ячейке Франца через модельную (целлофан) и биомембрану (вывернутая кишка крысы). Детектирование прошедших через мембрану частиц ДНА осуществляли пьезокварцевым микровзвешиванием и по радиоактивности тритиевой метки.

Биораспределение ДНА *in vivo* изучали методами рентгеновской компьютерной томографии (РКТ), (кролики), *ex vivo* – ИСП-МС (йодная метка, кролики) и ЖСС (третиевая метка, крысы и мыши) после внутривенного введения ДНА в течение 6 мес. Образцы органов и тканей гомогенизировали при нагревании в 1-3 М растворе NaOH (для метода ЖСС – с добавлением 30%-ого пероксида водорода).

Биологическую активность коммерческих образцов ДНА определяли в тесте люминесцентных бактерий *E. coli*, K12 TG1(pF1) со встроенными генами полного CDABE lux-оперона люминесцентной системы из бактерий *V. fischeri* 6 МГУ.

Влияние ДНА и его конъюгата ДНА-глицин на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) *in vitro* оценивали по уровню диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в суспензии модельных мембран липосом.

Каталитическую активность ферментов трипсина, папаина и химотрипсина в образовании *n*-нитроанилина из хромогенного олигопептидного специфического субстрата определяли спектрофотометрически ( $\lambda = 410$  нм). Активность фермента неорганическая пирофосфатаза *E. Coli* (PPаза) в разложении пирофосфат-ионов определяли спектрофотометрически по скорости образования гидрофосфата.

Проникновение ДНА, конъюгатов ДНА-глицин и ДНА-амикацин в клетки (HeLa, MOLT-4) на временах инкубации 15 мин, 2, 4 и 24 ч изучали методом ПЭМ на серийных ультратонких срезах (ультрамикротом Leica Ultracut UCT, Leica, ФРГ) после заливки смолой Epon.

Митохондриальную активность ДНА определяли по изменению мембранного потенциала изолированных митохондрий печени крыс при поглощении иона трифенилфосфония (TRP), который регистрировали с помощью TRP-селективного электрода компьютеризированной системы Record 4 (ИТЭБ РАН, Россия).

Антибактериальную активность конъюгата ДНА-амикацин определяли на бактериальных штаммах путем высевания бульона с исследуемым образцом на питательную среду – мясо-глюкозо-глицериновый агар.

Острая токсичность гидрозолей ДНА и конъюгата ДНА-глицин была изучена на 120 мышах линии BALB/c (самцы, масса тела 18-22 г) при однократном внутрибрюшинном введении. Значения LD<sub>50</sub> определяли методом Дейхмана и Ле Бланка.

Антигипоксическую активность конъюгата ДНА-глицин исследовали в сравнении с глицином и препаратом сравнения мексидолом, используя тесты нормобарической и

гемической гипоксии (мышы,  $n = 10$ ,  $\Sigma = 100$ ) по официальным методикам доклинического изучения БАВ.

Исследование противоинсультного действия конъюгата ДНА-глицин проведено с использованием методики экспериментального инсульта, вызванного интрацеребральной посттравматической гематомой (крысы,  $n = 10$ ,  $\Sigma = 40$ ), по официальной методике доклинического изучения БАВ.

### Глава 3. Результаты и их обсуждение

**Физико-химическая неэквивалентность ДНА.** Сравнение физико-химических свойств ДНА выполняли на марках PL-D-G01 (шифр – I), Standart ND (шифр – II), PL-SDND (шифр – III), УДА-ТАН (шифр – IV).

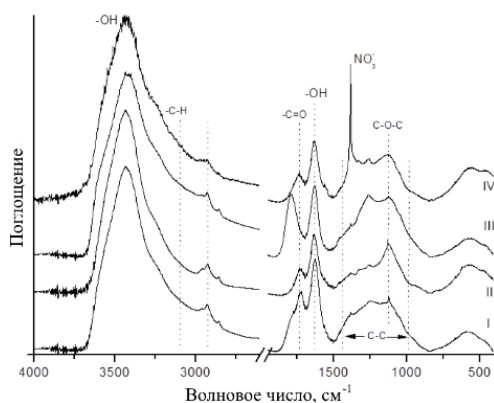


Рис. 1. ИК-спектры ДНА разных марок.

Были выявлены различия образцов ДНА, полученных от разных производителей, в функциональном составе, размере алмазного ядра,  $\zeta$ -потенциале и размере агрегатов в золях. В ИК-спектрах образцов ДНА 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. В спектрах образцов II и IV данная полоса отсутствует, но есть полоса с максимумом при  $1730 \text{ см}^{-1}$ , которая, соответствует поглощению карбонильной группы  $>\text{C}=\text{O}$ . По данным РФЭС четыре образца ДНА имеют на поверхности по 12,2, 8,5, 15,8 и 8,7 % ат. кислорода, соответственно. В спектрах РФЭС образца IV пик N1s представлен двумя компонентами 399,3 и 402,5 эВ. Последняя связана с наличием иона  $\text{NO}_3^-$  (Рис. 1), а первую можно отнести к азоту в структуре частицы ДНА (1,0 % ат.).

На дифрактограммах ДНА рефлексы уширены. Средние размеры ОКР для каждого образца, рассчитанные по формуле Шеррера, составили 4,19, 4,62, 3,91 и 4,35 нм, соответственно.

Степень агрегированности частиц ДНА в порошках исследовали методом ДСК, позволяющим определить появление тепловых эффектов при плавлении нанофазы льда в межчастичном пространстве в агрегатах ДНА. Наименее агрегированным оказался образец III, так как только для него четко заметен эндотермический эффект при температуре около  $-7 \text{ }^\circ\text{C}$ , соответствующий плавлению нанофазы льда в порах агрегатов. Наиболее агрегированным оказался образец II.

УЗО образца IV (ванна, 50 В) приводит к появлению на спектре ДРС устойчивого пика агрегатов ДНА размером 100 нм и микронных частиц, которые разбиваются при повышении мощности УЗО до 300 Вт. При применении циклической УЗО и ЦФ отчетливо наблюдается тенденция к уменьшению размерам агрегатов ДНА, размеры которых находятся в области от 50 до нескольких сотен нм. Гидрозоли образцов ДНА, приготовленные таким образом, имели размеры агрегатов 600, 550, 50 и 60 нм и  $\zeta$ -потенциалы -4, -11, -41 и +34 мВ, соответственно.

Примесный состав коммерческих образцов ДНА оказался разным, в том числе, для разных партий одной марки (Табл. 1). Наибольшее количество примесей в промышленных образцах ДНА имеет образец IV (до 1,05% 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  $H_2SO_4$ . Вносить примеси (Fe, Cr) также могут отдельные элементы оборудования из нержавеющей стали, применяемые для выделения ДНА из алмазной шихты.

Таблица 1. Состав и количество примесных элементов в образцах ДНА (метод ГАА).

Элемент	Образцы ДНА, % масс., (А,В – разные партии)							
	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> – глицин
<b>Cl</b>	0,10	0,03	0,56	0,08	0,09	0,07	0,05	2,20
<b>Ti</b>	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,02	$7 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-3}$	0,01	$6 \cdot 10^{-3}$	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>	-	$2 \cdot 10^{-3}$	-	0,01	0,01	$5 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$
<b>Zr</b>	$1 \cdot 10^{-3}$	-	$2 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-4}$
<b>Mo</b>	-	-	-	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$
<b>Sb</b>	-	$3 \cdot 10^{-3}$	-	$6 \cdot 10^{-4}$	-	$6 \cdot 10^{-4}$	-	-
<b>Sr</b>	$4 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	-	-	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$
<b>Mn</b>	-	0,03	-	-	-	-	-	-
<b>U</b>	-	-	-	-	$3 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	-	-
<b>Eu</b>	-	-	-	0,03	-	-	-	-
<b><math>\Sigma</math></b>	0,10	0,41	0,99	1,01	1,05	0,66	0,22	2,99

Очистку ДНА проводили в кислотной и щелочной среде, варьируя концентрацию реагентов, температуру и время обработки. После щелочной очистки удаляются нитрат-анионы, что подтверждается исчезновением в ИК-спектре полосы при  $1385 \text{ см}^{-1}$ . Наилучший результат по удалению серы показало перемешивание образцов в 0,01-0,1 М NaOH при  $T_{\text{комн}}$ . Кипячение (12 ч) в концентрированных кислотах  $HNO_3$ , HCl и  $H_2SO_4$  позволило снизить содержание железа с 1488 до 247, 11 и 436 ppm, соответственно.

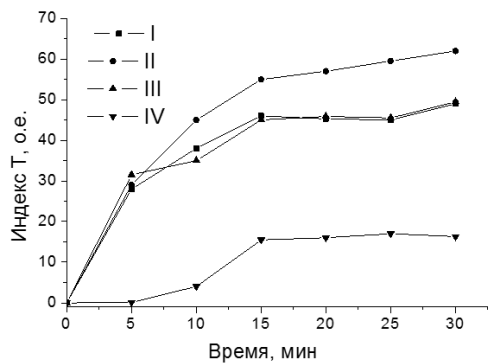


Рис. 2. Влияние марки ДНА и времени инкубирования с люминесцентными бактериями на индекс токсичности.

При инкубировании ДНА с люминесцентными бактериями, интенсивность их свечения снижалась (Рис. 2). Наименее токсичным оказался образец IV, который и использовался в дальнейших биологических экспериментах. Образцы I и III, полученные от одной фирмы, имеют схожую динамику изменения индекса токсичности. Так как эти образцы отличаются химией своей поверхности, можно сделать вывод, что этот

параметр не определяет тушение люминесценции бактерий.

### Унификация и стандартизация ДНА. Для унификации поверхности ДНА разных

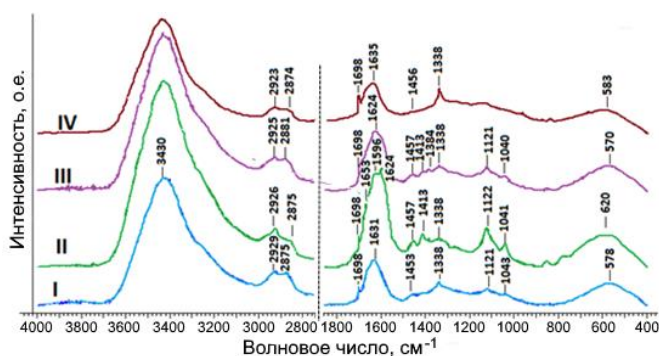


Рис. 3. ИК-спектры гидрированных ДНА.

марок использована высокотемпературная обработка их водородом (800 °С, 2-8 ч). В ходе восстановительной обработки происходит образование новых гидридных групп на поверхности ДНА, преимущественно за счет восстановления и деструкции большинства

кислородсодержащих групп до –Н и –ОН-групп (Рис. 3). Гидрозоли гидрированных ДНА полученные 5-ти кратной обработки циклами «УЗО и ЦФ», стабильны и имеют одинаковый размер агрегатов около 50 нм, а значение ζ-потенциала частиц ДНА в гидрозолях находится в интервале +40-45 мВ, что позволяет считать образцы ДНА унифицированными по функциональному составу и размерам агрегатов.

**Химическое модифицирование ДНА.** При гидрировании ДНА содержание водорода увеличилось с 0,2 до 0,5% масс. (элементный анализ), а кислорода – снизилось с 8-9 до 5-6 % ат. (РФЭС). При обработке воздухом содержание водорода падало до 0,13 % масс., а кислорода – увеличивалось до 9-10 % ат. При гидрировании ДНА удельная площадь поверхности увеличивалась с  $240 \pm 1$  до  $272 \pm 5$  м<sup>2</sup>/г, а при окислительной обработке воздухом – до  $331 \pm 10$  м<sup>2</sup>/г. Увеличение поверхности образцов ДНА при модифицировании может быть связано с уменьшением электростатического взаимодействия между частицами, приводящим к уменьшению размеров агрегатов ДНА. По данным потенциометрического титрования содержание протоно-донорных групп в ДНА уменьшилось с  $3,2 \cdot 10^{-4}$  до  $0,2 \cdot 10^{-4}$  моль/г после гидрирования ДНА и увеличилось до  $9,9 \cdot 10^{-4}$  моль/г после обработки ДНА воздухом.



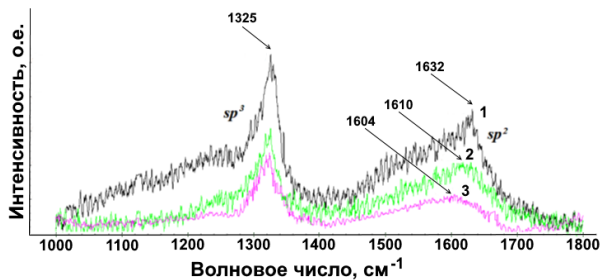


Рис. 4. КР-спектры ДНА: 1 – исходный; 2 – окисленный воздухом; 3 – гидрированный.

В КР-спектрах образцов ДНА полоса, соответствующая  $sp^3$ -глероду алмазной решетки, проявилась при  $1325\text{ см}^{-1}$  (Рис.4). Вторая полоса, соответствующая  $sp^2$ -углероду, проявляется при  $1632$ ,  $1610$  и  $1604\text{ см}^{-1}$ , соответственно. Наибольшее смещение

наблюдается для исходного ДНА, в котором имеется максимальное содержание карбонильных групп, а наименьшее – для гидрированного ДНА. Такое смещение можно отнести не к  $sp^2$ -углероду графита, а к полосам функциональных групп, содержащих  $sp^2$ -углерод, связанный с кислородом.

Окисление ДНА через стадию получения хлорангирида с последующим взаимодействием с водой позволило повысить содержание кислорода на поверхности до  $15,5\%$  ат. Окисление воздушной плазмой оказалось аналогично окислению кислородом воздуха. Озонированием ДНА не удалось изменить функциональный его состав.

Были оптимизированы время (6 ч) и температура фотохимического хлорирования ДНА (до  $60\text{ }^\circ\text{C}$ ), который предложен в качестве основы для систем доставки БАВ и ЛВ.

**Введение  $[^3\text{H}]$ -метки в ДНА.** Впервые методом МТАТ был синтезирован ДНА с тритиевой меткой. Предложены пути повышения эффективности мечения ДНА за счет повышения содержания С-Н групп на поверхности при использовании гидрированного ДНА (с 34 до 90 ГБк/г) и увеличения доступной для мечения поверхности за счет предварительной дезагрегации частиц ДНА (до 2,6 ТБк/г).

**Получение гидрозолей ДНА.** После химического модифицирования ДНА и применения цикличной (2-8 раз) УЗО с ЦФ гидрозоли имели  $\zeta$ -потенциал  $|30-70|\text{ мВ}$ , высокую концентрацию до  $5\%$  масс. и размером частиц от 10-15 нм. При этом гидрозоли были устойчивы более 1 года. Для стабильных гидрозолей ДНА был разработан способ определения концентрации наноалмаза в воде и водных средах с содержанием частиц от 1 нг/мл с использованием комплекса методов: гравиметрии, спектрофотометрии (4-1000 мкг/мл), флуориметрии (0,5-117 мкг/мл) и пьезокварцевого микровзвешивания (1-100 нг).

**Прививка БАВ и ЛВ на поверхность ДНА.** Для каждого БАВ или ЛВ с учетом его химического строения были найдены оптимальные варианты их прививки на поверхность ДНА. Глицин и амикацин были привиты через аминогруппу к хлорированному ДНА, а цистеин – через тиогруппу. Для получения конъюгата ДНА с янтарной кислотой

использовали гидроксильную поверхность ДНА и янтарный ангидрид. Протеолитические ферменты были ковалентно иммобилизованы на поверхность ДНА-СООН по реакции кросс-линкинга EDC/NHS с аминогруппами ферментов. Пирофосфатаза была привита на поверхность ДНА-NH<sub>2</sub> через глутаровый альдегид с использованием доступных -СООН групп фермента. Максимальная плотность прививки БАВ на поверхность ДНА составила для амикацина – 0,7, цистеина – 1,6, глицина – 2,5, янтарной кислоты – 0,2 мол/нм<sup>2</sup>, соответственно. Количество привитых на ДНА ферментов составило для трипсина – 24,0; папаина – 7,0; химотрипсина – 7,4 и пирофосфатазы – 40,5 % масс., соответственно.

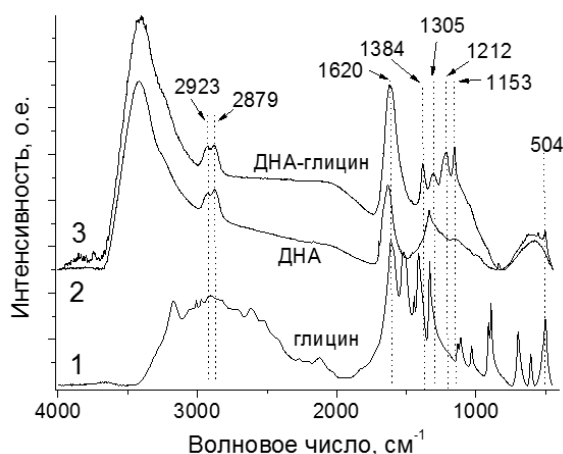


Рис. 5. ИК-спектры: 1 – глицина; 2 – ДНА; 3 – конъюгата ДНА-глицин.

При изучении свойств синтезированного нами конъюгата ДНА с глицином были обнаружены существенные изменения в его ИК-спектре (Рис. 5). В частности, появление новых полос поглощения, которые оказались наиболее близки к частотам поглощения его структурного аналога – супрамолекулярного комплекса фуллерена с глицином. По данным РФЭС в конъюгате ДНА-глицин наблюдалось

увеличение содержания азота и кислорода до 8 и 11 % ат., соответственно.

Иммобилизованные ферменты сохраняли свою активность в диапазоне 30-50% от первоначальной и имели повышенную термо- и рН-стабильность.

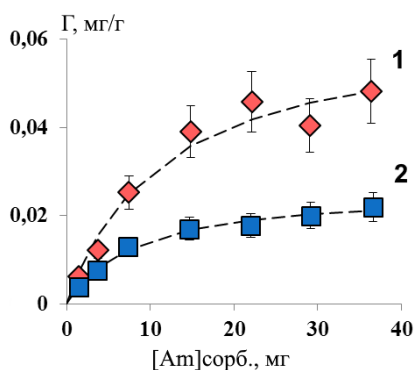


Рис. 6. Количество прочно связанного амикацина на 1 – ДНА-СООН, 2 – ДНА-Н.

Показано, что адсорбция амикацина зависит от химической природы поверхности ДНА. Так, количество прочно связанного антибиотика для ДНА-СООН (48 мг/г) более чем в 2 раза превышало количество амикацина по сравнению с ДНА-Н (22 мг/г) (Рис. 6). При этом, если адсорбированный амикацин постепенно десорбируется в раствор в течение месяца, то ковалентно связанный амикацин не отщепляется.

**Трансмембранная диффузия ДНА.** Важным этапом работы стало исследование диффузии частиц ДНА в доклиническом тесте с использованием ячейки Франца как модельное изучение проникновения ДНА через биомембраны организма. Показано,

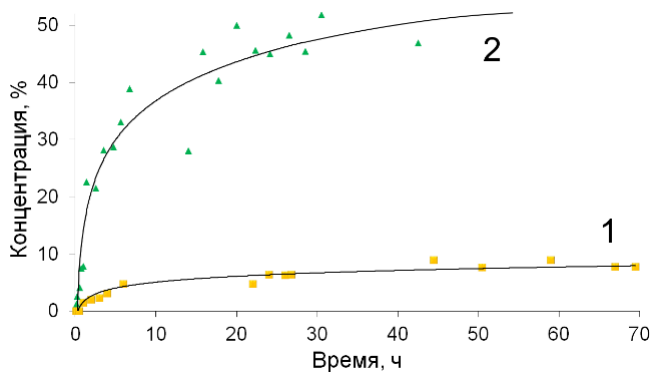


Рис. 7. Проникновение частиц ДНК через целлофан. 1 - без УЗО, 2 - с УЗО.

диффузии, рассчитанные по закону Фика для однородной среды, находились в диапазоне  $(0,5-1) \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{с}$ .

**Биораспределение ДНК.** Были разработаны методы визуализации ДНК. Для определения ДНК *in vivo* применен метод РКТ. Однако его чувствительности не хватило для изучения всех органов. Поэтому было решено перейти к методикам *ex vivo*, в частности, к методам ИСП-МС при использовании йодной метки (привитой трийодбензиловый спирт) и ЖСС – при использовании тритиевой метки.

С помощью йодной метки на кроликах показано, что максимальное накопление ДНК наблюдается в легких. И в течение месяца наноалмаз постепенно выводится из органов животного. Впервые показано, что ДНК проникает через гематоэнцефалический барьер и имеет длительную экспозицию накопления в головном мозге. Это представляется перспективным для разработки систем доставки ЛВ при лечении заболеваний ЦНС, а также в создании эффективных пролонгированных лекарственных форм.

Изучение биораспределения ДНК с тритиевой меткой на мышах в течение 6 месяцев также подтвердило его максимальное накопление в легких, проникновение в головной мозг и постепенное выведение через желудочно-кишечный тракт и мочеполовую систему (Рис. 8). Накопление ДНК в легких открывает принципиальную возможность его использования в разработке высокоэффективных систем доставки ЛВ для лечения заболеваний органов дыхания, в частности, туберкулеза.

На мышах (в/бр) были определены значения  $LD_{50}$  стандартизованного ДНК-Н и конъюгата ДНК-глицин, составившие 3,4 и 2,7 г/кг веса, соответственно, что относит эти вещества к IV классу опасности (малотоксичные вещества).

что на диффузию частиц ДНК через целлофановую мембрану влияет их размер и УЗО. Так, УЗО увеличивает прохождение частиц ДНК с 9 до 50 % в течение 24 ч (Рис. 7). Показано, что кинетические кривые диффузии через модельную и биомембраны идут симбатно до момента начала деструкции биомембраны. Коэффициенты

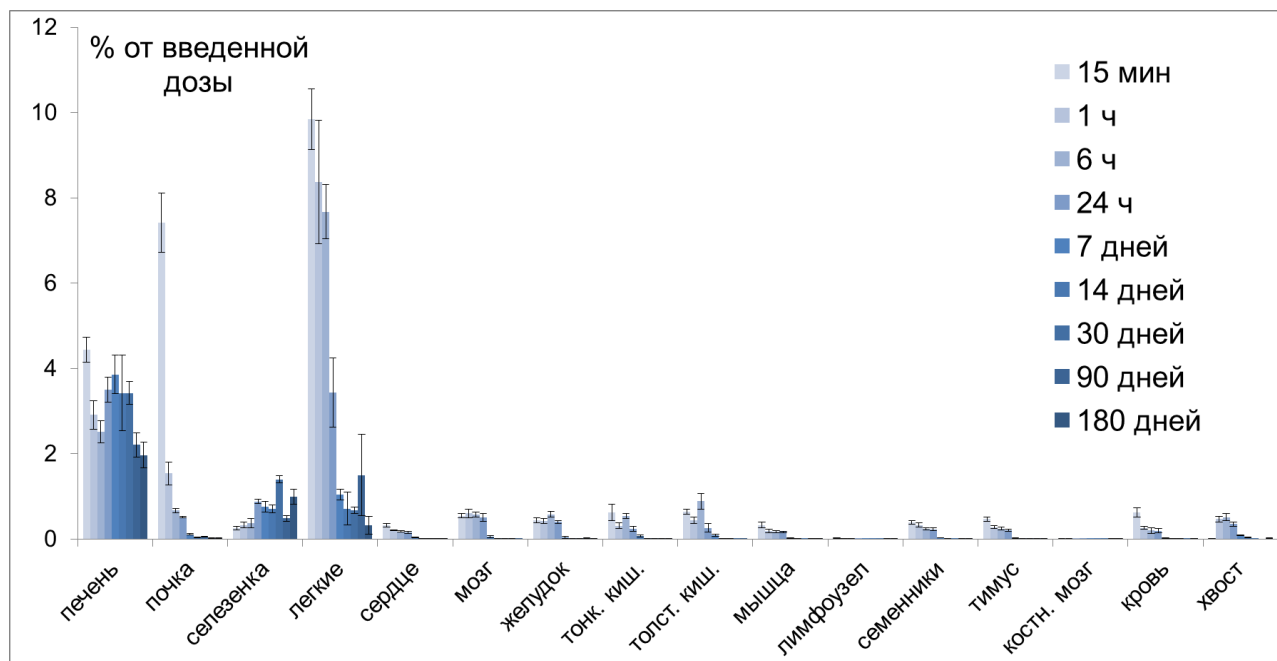


Рис. 8. Биораспределение [ $^3\text{H}$ ]-ДНА по органам мыши в течение 6 мес.

Дополнительно было изучено действие ДНА на клеточном уровне, в частности, динамика проникновения ДНА и его конъюгатов в клетку. Показано, что быстрее всего (уже через 15 мин) в клетку проникает стандартизованный наноалмаз, а медленнее всего – конъюгат ДНА-глицин. Спустя сутки количество клеток, содержащих внутри себя исследованные ДНА, практически выравнивается. Электронно-микроскопическое исследование показало, что наноалмаз находится в клетке (в цитозоле) в виде цепочечных агрегатов, не окруженных мембраной. При этом ДНА не оказывал цитотоксического действия на клетки и их органеллы.

Изучение антибактериальной активности конъюгата ДНА-амикацин по сравнению с амикацином на штаммах *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* показало её повышение в 2-4 раза.

Существенные изменения строения глицина на поверхности ДНА позволили предположить изменение электронного состояния (структуры) глицина как фармакофора, что поставило вопрос о биотестировании конъюгата. Были изучены более 10 видов специфической активности, в том числе, антиоксидантная, противогипоксическая и противоишемическая активность. Было показано, что ДНА, как и его конъюгат с глицином, эффективно тушат хемилюминесценцию в дозах 50-100 мкг/мл, превышая не только активность глицина, но и на уровне тенденции – активность препарата сравнения мексидола.

Этот конъюгат в дозе 10 мг/кг увеличивал продолжительность жизни животных при недостатке кислорода, находясь на одном уровне с мексидолом в тесте нормобарической

гипоксии, и превышал его в тесте гемической гипоксии. Следовательно, показал себя эффективным и перспективным антигипоксантом.

Так как сам глицин широко применяется при лечении ишемического инсульта, была изучена активность конъюгата ДНА-глицин на моделях ишемического и геморрагического инсульта. Неожиданно конъюгат не проявил активность на модели ишемического инсульта и обнаружил высокую активность на модели геморрагического инсульта, снижая гибель крыс с 70 до 40 %. При этом существенно, с 83 до 16%, снижалось количество животных с тяжелыми нарушениями после операции. Отметим, что до настоящего времени в мировой фармакологии отсутствуют лекарственные средства для эффективного лечения геморрагического инсульта, который является наиболее тяжелой формой инсульта.

Изучение конъюгата ДНА-глицин на моделях экспериментальной психофармакологии позволило выявить практически в каждом случае изменение фармакологической активности по сравнению с глицином. Это позволило предположить существование фундаментального явления нанохимии и наномедицины – изменение интенсивности и спектра фармакологической активности лекарственного вещества при его иммобилизации на поверхности ДНА и предложить механизм этого явления, обусловленный образованием супрамолекулярного комплекса наноалмаз-лекарственное вещество. Это направление работ открывает принципиальную возможность создания на основе ДНА нового класса высокоэффективных инновационных лекарственных средств, которые можно рассматривать как новые вещества с собственным набором физико-химических и фармакологических свойств. Направленная иммобилизация на ДНА БАВ и/или ЛВ может обеспечить качественный скачок в увеличении их специфической активности, снижении токсичности и побочных эффектов. Полученные результаты являются основой нового физико-химического (нанотехнологического) подхода к получению уникальных лекарственных средств, проявляющих специфическую активность, превышающую характеристики препаратов, разрабатываемых на основе современного уровня развития синтетической химии и биотехнологии. Данный подход позволяет по-новому рассмотреть пути развития отечественной химико-фармацевтической науки и промышленности, решая проблемы импортозамещения и повышения экспортного потенциала.

## Основные результаты и выводы

1. Комплексом физико-химических методов исследования ПЭМ, ДРС, ДСК, ИКС, РФЭС ИСП-МС и ГАА и методом измерения бактериальной люминесценции выявлена примесная (химическая), физико-химическая и биологическая неэквивалентность промышленных образцов ДНА разных марок. 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 (свыше 1 года) гидрозолей ДНА с помощью комплексного подхода, включающего химическое модифицирование, УЗО и ЦФ. 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 ДНА) для повышения эффективности иммобилизации лекарственных и/или биологически активных веществ и синтезированы конъюгаты ДНА с лекарственными и биологически активными веществами: аминокислотами глицином и цистеином, 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 иммобилизации их на ДНА.
4. Разработан способ визуализации *ex vivo* ДНА с йодной меткой (трийодбензиловый спирт) на основе метода ИСП-МС анализа. Впервые синтезирован ДНА с тритиевой меткой и применен для визуализации частиц ДНА *ex vivo*
5. Впервые изучена диффузия 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 частиц ДНА прошедших через модельную мембрану с 9 до 50% при приложении УЗО. 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. Установлено, что ДНА проникают в клетки уже через 15 мин инкубации, накапливаются в клетках в виде цепочечных агрегатов, находятся в

цитозоле не окруженные мембраной 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, максимально накапливаются в легких и постепенно выводятся из организма. Определены значения LD<sub>50</sub> 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 опасности (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 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 водорода (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 лекарственным препаратом сравнения – мексидолом. 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 иммобилизации на поверхности наночастицы (ДНА) – рабочее название «эффект амплификации модифицирующей активности БАВ». Предложен гипотетический механизм этого явления за счет образования супрамолекулярного комплекса при межмолекулярном взаимодействии иммобилизуемого ЛВ с поверхностью ДНА.

## Список основных публикаций по теме диссертации

1. Lisichkin G.V., Kulakova I.I., Gerasimov A.Y., Karpukhin A.V., Yakovlev R.Y. Halogenation of detonation-synthesis nanodiamond surface // *Mendeleev Comm.* – 2009. – V. 19. – P. 309-310.
2. Кулакова И.И., Корольков В.В, Яковлев Р.Ю., Лисичкин Г.В. Структура частиц модифицированного наноалмаза детонационного синтеза // *Рос. нанотехнол.* – 2010. – Т. 5 (7-8). – С. 66-73.
3. Karpukhin A.V., Avkhacheva N.V., Yakovlev R.Y., Kulakova I.I., Yashin V.A., Lisichkin G.V., Safronova V.G. Effect of detonation nanodiamonds on phagocyte activity // *Cell Biology Int.* – 2011. – V. 35. – P. 727-733.
4. Яковлев Р.Ю., Соломатин А.С., Леонидов Н.Б., Кулакова И.И., Лисичкин Г.В. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ // *Рос. хим. ж.* – 2012. Т. 56 (3-4). – С. 114-125.
5. Yakovlev R.Y., Kulakova I.I., Leonidov N.B., Lisichkin G.V. Surface modification of detonation nanodiamond with ethylenediamine and hexamethylenediamine // *Mendeleev Comm.* – 2012. – V. 22. – P. 213-214.
6. Яковлев Р.Ю., Осипова О.С., Соломатин А.С., Кулакова И.И., Муравьева Г.П., Авраменко Н.В., Леонидов Н.Б., Лисичкин Г.В. Подход к унифицированию физико-химических свойств наноалмаза промышленного производства // *Рос. хим. ж.* – 2013. – Т. 57 (5). – С. 86-96.
7. Badun G.A., Chernysheva M.G., Yakovlev R.Y., Leonidov N.B., Semenenko M.N., Lisichkin G.V. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method // *Radiochim. Acta.* – 2014. – V. 102 (10). – P. 941-946.
8. Yakovlev R.Y., Dogadkin N.N., Kulakova I.I., Lisichkin G.V., Leonidov N.B., Kolotov V.P. Determination of impurities in detonation nanodiamonds by gamma activation analysis method // *Diamond Rel. Mater.* – 2015. – V. 55. – P. 77-86.
9. Rodina E.V., Valueva A.V., Yakovlev R.Y., Vorobyeva N.N., Kulakova I.I., Lisichkin G.V., Leonidov N.B. Immobilization of inorganic pyrophosphatase on nanodiamond particles retaining its high enzymatic activity // *Biointerphases.* – 2015. – V. 10 (4). – P. 041005-1-041005-12.
10. Buchatskaya Y., Romanchuk A., Yakovlev R., Shiryayev A., Kulakova I., Kalmykov S.. Sorption of actinides onto nanodiamonds // *Radiochim. Acta.* – 2015. – V. 103 (3). – P. 205-211.



11. Яковлев Р.Ю. Особенности химического модифицирования поверхности детонационных наноалмазов аминосодержащими соединениями // Рос. медико-биол. вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – № 3. – С. 130-135.
12. Кулакова И.И., Корольков В.В., Яковлев Р.Ю. Карпухин А.В., Лисичкин Г.В. Строение частицы химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза / Породоразрушающий и металлообрабатывающий инструмент – техника и технология его изготовления и применения. – Сб. науч. тр. – Вып. 12. – Киев, 2009. – С. 299-305.
13. Леонидов Н.Б., Селезнев Н.Г., Яковлев Р.Ю. Перспективность применения наноалмазов в качестве носителей для систем доставки лекарственных веществ // Медицина в Кузбассе. – 2009. – Спецвыпуск №7. – С. 56-57.
14. Валуева А.В., Яковлев Р.Ю., Родина Е.В., Кулакова И.И., Лисичкин Г.В., Леонидов Н.Б. Иммобилизация фермента пироглутаматазы на наноалмазе детонационного синтеза / В сб. Наноструктуры в конденсированных средах (Сб. научн. ст. по матер. IV Междун. научн. конф. "Наноструктурные материалы-2014. (НАНО-2014) Беларусь-Россия-Украина. – Минск, 2014. С. – 146-151.
15. Соломатин А.С., Яковлев Р.Ю., Федотчева Н.И., Леонидов Н.Б. Влияние детонационного наноалмаза на скорость окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий / В сб. Наноструктуры в конденсированных средах (Сб. научн. ст. по матер. IV Междун. научн. конф. "Наноструктурные материалы-2014. (НАНО-2014) Беларусь-Россия-Украина. – Минск, 2014. – С. 99-103.
16. Яковлев Р.Ю., Селезнев Н.Г., Лисичкин Г.В., Леонидов Н.Б. Наноалмазы в фармации и медицине / Учебн.-метод. пособие – Рязань: РИО УМУ, 2016. – 115 с.
17. Yakovlev R.Y., Lisichkin G.V., Leonidov N.B. Development and investigation of functionalized nanodiamonds for pharmaceutical and medical applications / Mediterranean – East-Europe Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed 2011. – Uzhgorod, 2011. – P. 169-170.
18. Yakovlev R.Y. The problem of nanodiamond visualization in biopharmaceutical research / Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures. – Book of Abstract. – St Petersburg, 2011. – P. 376.
19. Yakovlev R.Yu., Eliseev A.A., Leonidov N.B. *In Vitro* and *In Vivo* Studies of Nanodiamonds Covalently Bonded with Glycine as a Model for Development of a Drug Delivery Platform / 2012 MRS Spring Meeting & Exhibit. Symposium FF: Nanodiamond Particles and Related Materials – From Basic Science to Applications. – San Francisco, 2012. – FF4.4.

20. R.Yu. Yakovlev, N.B. Leonidov, G.V. Functionalization of nanodiamonds for development of a drug delivery platform / Book of Abstr. Int. Conf. Diamond and Carbon Materials. – Granada, 2012. Poster 2.6.
21. Яковлев Р.Ю., Кулакова И.И., Леонидов Н.Б., Лисичкин Г.В. Химическое модифицирование и биологические свойства наноалмазов / 5-я Всерос. конф. (с междунар. участ.) «Химия поверхности и нанотехнология». – Тезисы доклада. – Хилово, 2012. – С. 292-293.
22. Yakovlev R.Yu., Eliseev A.A., Kulakova I.I., Leonidov N.B., Lisichkin G.V. Ex vivo study of nanodiamond particles biodistribution using ICP-MS / Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). – Book of Abstract. – St Petersburg, 2013. – P. 65.
23. Яковлев Р.Ю., Соломатин А.С., Леонидов Н.Б., Догадкин Н.Н., Колотов В.П. Изучение примесного состава детонационных наноалмазов для биомедицинских приложений методом гамма-активационного анализа / –II-ой съезд аналитиков России. – Тезисы доклада. – М., 2013. – С. 534.
24. Yakovlev R.Yu., Badun G.A., Chernysheva M.G., Leonidov N.B., Lisichkin G.V. Tritium labeling nanodiamond and its applications in transmembrane diffusion and biodistribution studies / Int. Conf. Diamond and Carbon Materials, – Riva del Garda, 2013. – Poster 1.096.
25. Yakovlev R.Yu., Leonidov N.B., Lisichkin G.V. Biodistribution Peculiarities of Detonation Nanodiamond / XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), – Moscow, 2014. – Poster 08.064.
26. Yakovlev R.Yu., Kulakova I.I., Golubev O.V., Leonidov N.B., Lisichkin G.V. Determination of detonation nanodiamonds concentration in hydrosols by optical methods / Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures. – Book of Abstract. – St. Petersburg, 2015. – P. 119.
27. Создание нового класса высокоэффективных лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе детонационного наноалмаза / В сб. Международной выставки химической промышленности и науки «Химия+». VIII конкурс проектов молодых ученых. – М., 2014. – С. 50-51.
28. Химические подходы к повышению эффективности систем доставки лекарственных веществ на основе детонационного наноалмаза / Мат. науч. конф. «Ломоносовские чтения». Секция «Химия». – М., МГУ, 2016. – С. 11.

Работа поддержана грантами РФФИ: №№ 11-03-00543, 12-03-09206 13-08-00647, 14-03-00423, 15-04-06795, 16-08-01156.