

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	2
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
1.1 Особенности и перспективы практического применения различных нанообъектов	4
1.2 Структура и физико-химические свойства наноалмазов.....	11
1.3 Метод ЭПР-спектроскопии	15
1.4 Статистическая обработка результатов.....	18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	19
2.1 Объекты исследования	19
2.2 Методика исследования <i>in vitro</i>	19
2.3 Методика исследований <i>in vivo</i>	21
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	22
3.1 Определение зависимости интенсивности ЭПР-сигнала от содержания НА в гомогенатах тканей мышей <i>in vitro</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Результаты исследований <i>in vivo</i>	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	23

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы заметно вырос интерес к изучению частиц нанометровых размеров и их возможному применению для решения широкого спектра задач, в том числе в области медицины и биологии. Стремительно развивающиеся нанотехнологии достигли прогресса благодаря созданию таких перспективных нанообъектов как наноалмазы, углеродные нанотрубки, графитовые нановолокна, магнитные ферригидритные частицы, частицы наносеребра и др.

Следует отметить углеродные материалы с алмазной кристаллической решеткой – это монокристаллы, алмазные пленки, порошки различной дисперсности алмазов, природные и синтетические алмазы детонационного синтеза. Свойства таких материалов зависят от функционального состава поверхности и методов получения. В связи с тем, что от структуры поверхностного слоя зависит функциональность частиц, большую роль играют физико-химические методы его модификации, в основном это относится к синтетическим наноалмазам. Модификация производится для того, чтобы получить на поверхности алмазного материала многофункциональный слой адсорбированного поверхностного соединения как органической, так и неорганической природы. Уникальной особенностью наноалмазов является то, что при помощи химической модификации на поверхности можно получить практически любой тип функциональных групп.

Модифицированные наноалмазы (НА) детонационного синтеза, благодаря их активной поверхности, обладают мощной сорбционной активностью, что позволяет использовать их в медицине в качестве переносчиков лекарственных средств в системах адресной доставки. Однако в настоящий момент представлено не достаточно информации о взаимодействии наноалмазов со сложными биосистемами.

Цель работы:

Оценить методом ЭПР особенности межорганного распределения НА после внутривенного введения мышам.

Задачи:

1. Установить возможность детектирования наноалмазов с помощью метода электронного парамагнитного резонанса в биологических тканях;
2. Установить зависимость интенсивности полученного сигнала от содержания наноалмазов в образцах биологических тканей *in vitro*;
3. Исследовать особенности распределения наноалмазов в организме мышей после внутривенного введения;

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности и перспективы практического применения различных нанообъектов

Нанотехнология считается одной из основных технологий двадцать первого века, а ее стремительное развитие положило начало многочисленным исследованиям различных наноматериалов для потенциального применения их в различных областях [1, 2].

Современные исследования веществ на молекулярном уровне открывают все новые возможности для поиска наноматериалов с перспективными свойствами для использования в медицине. Так, применение новых наноматериалов играет большую роль в диагностике болезней, разработке систем доставки лекарственных средств и внедрении различных имплантатов в организм [3]. Достижения в области биотехнологий позволили получить широкий спектр наноматериалов на основе углерода, включая углеродные нанотрубки, оксиды графена, фуллерены, наноалмазы и другие частицы [4]. Такие наноматериалы являются потенциальными кандидатами для различных применений в медицине, в том числе для диагностики и терапии различных патологий. Химические и физические свойства поверхности этих материалов позволяют использовать их в диагностических устройствах и даже в качестве компонентов для заместительной терапии костной ткани. Далее будет рассмотрено использование металлических наночастиц и их оксидов, углеродных и других частиц для конкретных биомедицинских применений [5, 6].

К примеру, широко обсуждается возможность применения наночастиц кремния для использования их не только в биомедицинских целях, как средство для терапевтической диагностики онкологических заболеваний, но также и в косметических продуктах, продуктах питания, автомобилестроении, красках и т.д. Но существенным минусом, который нельзя игнорировать, является их

потенциально опасное воздействие на окружающую среду и организм человека [7].

Не менее перспективными являются частицы, в основе которых лежат оксиды различных металлов. Наночастицы на основе оксида церия могут ингибировать пролиферацию раковых клеток *in vitro* и *in vivo*, как было показано в исследовании на линиях клеток карциномы шейки матки мышей в качестве модели [8].

В Красноярском научном центре из бактериальной культуры *Klebsiella oxytoca* были получены магнитные наночастицы на основе ферригидрита $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, которые, благодаря наличию магнитных свойств, представляют интерес в качестве средства для управляемой доставки фармацевтических субстанций. Проведенные исследования показали, что магнитные частицы способны к элиминации из области введения при внутримышечном, внутрибрюшинном и пероральном введении.

С использованием ЯМР томографии было обнаружено, что при внутримышечном и внутрибрюшинном введении время элиминации этих частиц не превышает 2 ч, при пероральном – соответствует времени эвакуации содержимого ЖКТ [9, 10].

Некоторые частицы можно использовать для достижения антибактериального эффекта. Было показано, что композиты из наночастиц серебра, на поверхность которых электростатическими методами были адсорбированы капсулы с ацетатом хлоргексидина, обладали устойчивым антибактериальным свойствами на протяжении более 30 суток [11].

Было обнаружено, что антибактериального эффекта можно добиться не только с помощью наночастиц серебра, но и с помощью фуллеренов. Фуллерены принадлежат к одной из аллотропных форм углерода и представляют собой замкнутые многогранники, составленные из чётного числа трёхкоординированных атомов углерода. Они обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые могут быть полезны для решения многих задач в области биологии и химии. Модификация сферы различными

функциональными группами повышает гидрофильность фуллеренов в несколько раз и предоставляет возможность создавать все новые и новые соединения для использования их в биомедицине.

Липофильность сферы фуллеренов позволяет им взаимодействовать с активными центрами различных энзимов, что было показано в опыте с ВИЧ-протеазой [12]. Также они способны интеркалировать в биологические мембраны, дестабилизируя их, что играет большую роль в антибактериальной активности. Исследования антибактериальной активности формы фуллерена C₆₀ проводились многими научными группами и привели к успешным результатам с такими бактериями, как *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* и *Mycobacterium avium*. Что интересно, повышенная эффективность иммобилизованных элементов также наблюдалась против штамма человеческого *Mycobacterium tuberculosis* [13, 14].

Одними из таких частиц являются углеродные нанотрубки, они представляют собой бесшовные цилиндры, состоящие из одного или нескольких слоев графена с открытым или закрытым концом [15, 16]. Диаметр обычно составляет от 0,8 до 2 нм и от 5 до 20 нм, хотя диаметры однослойных трубок могут превышать и 100 нм. Длина варьируется от менее 100 нм до нескольких сантиметров. Повышенный интерес к нанотрубкам, как к компонентам биосенсоров и медицинских устройств, обусловлен их размерной и химической совместимостью с биомолекулами, такими как ДНК и белки. В то же время нанотрубки обладают флуоресцентными и фотоакустическими свойствами [17, 18]. В разрабатываемые продукты на основе углеродных нанотрубок входят струйно-печатные тест-полоски для количественного обнаружения эстрогена, прогестерона, сенсоры для NO₂ и сердечного тропонина а так же микрочипы для ДНК и белка [19]. Для применения нанотрубок *in vivo* их можно интернализировать клетками, путем связывания их кончиков с рецепторами на клеточной мембране. Например, на углеродных нанотрубках в организм был введен противоопухолевый лекарственный препарат – доксорубин, количество введенного препарата составило до 60

мас.% по сравнению с 8-10 мас.% введенного препарата при помощи липосом [20].

Несмотря на значительные достижения современной онкологии, устойчивость злокачественных опухолей ко многим лечебным средствам указывает на необходимость разработки новых терапевтических подходов. В последние годы многочисленные исследования сосредоточили свое внимание на многообещающем использовании наноматериалов, таких как нанопроволоки оксида железа, оксиды цинка или мезопористые наночастицы кремния, для лечения рака и метастазов на молекулярном уровне. Среди них углеродные нанотрубки стали выгодными кандидатами не только для доставки лекарственных средств, но и ценным инструментом для разработки эффективных контрастных агентов для медицинской или фотодинамической визуализации опухолей, для проведения прямой физической абляции метастазов, а также для генной терапии [21].

Так же как фуллерены и нанотрубки, графен является еще одной аллотропной модификацией углерода. Это двумерный наноматериал, для которого в настоящее время предлагается все большее число областей применения. Установлено, что его оксид обладает бактерицидными свойствами. Было проведено исследование с наночастицами оксида графена *in vitro*, направленное на изучение антибактериальной активности на трех типах бактерий: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Для исследования *in vivo* была выбрана бактерия *Klebsiella pneumoniae* в качестве типичной бактерии с множественной лекарственной устойчивостью. В исследовании *in vitro* оксид графена эффективно уничтожал бактерии в чашках с агаром и, таким образом, защищал альвеолярные макрофаги от инфекции в культуре. При оценке *in vivo*, наночастицы вводили интраназально в легкие мышей, а затем изучали повреждение тканей органов, включая легкие, печень, селезенку и почки, а также учитывали их проникновение в полиморфноядерные нейтрофилы, распространение бактерий и смертность у инфицированных *Klebsiella pneumoniae* мышей. Обнаружено, что оксид графена может

останавливать рост и распространение *Klebsiella pneumoniae* как *in vitro*, так и *in vivo*, что приводит к значительному увеличению выживаемости клеток, меньшему повреждению тканей и подавлению воспалительного ответа. Важно отметить высокую выживаемость мышей. Эти данные показывают, что оксид графена является многообещающим материалом для контроля патогенов [22].

Наноленты из оксида графена являются не менее интересным материалом для биомедицинских применений, благодаря способности связываться с функциональными группами. Исследования показали, что они тоже обладают антибактериальными свойствами. Высокие концентрации оксида графена биологически оценивались с использованием клеток остеобластов человека, грамположительных и грамотрицательных бактерий [23, 24]. Была проанализирована биологическая активность клеток, их жизнеспособность, остеогенная дифференцировка, матричная минерализация, что непосредственно связано с восстановлением кости и бактерицидным эффектом высоких концентраций оксида графена (10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 300 мкг/мл). Оксид графена не проявлял цитотоксических эффектов до концентрации 100 мкг/мл и изменения генной экспрессии при использовании в умеренной дозе не происходило. Было установлено, что бактерии *S. aureus* и *E. coli* были подвержены повреждению при инкубации с 100 мкг, что показывает примерно 50% бактериальной смерти. Наноленты оксида графена проявляют уникальные свойства при использовании в подходящей дозе, проявляя бактерицидный эффект и не вызывают повреждений при восстановлении кости [25].

В последние годы растет интерес к применению наноалмазов в биологии и медицине. Это связано с уникальной комбинацией свойств наноалмазов. Малый размер, низкая стоимость, масштабное производство, незначительная токсичность, химическая инертность и высокоадсорбирующая поверхность наноалмазов – все эти параметры делают его весьма перспективным материалом, когда речь идет о биомедицинских применениях. Недавние исследования связаны с использованием наноалмазов в адресной доставке лекарств и диагностике заболеваний. Также наноалмазы могут быть

использованы в костной хирургии, в качестве компонентов каркасов для тканевой инженерии, в борьбе с вирусами и резистентными к лекарствам микробами, а также в доставке генетического материала в клеточное ядро [26].

Недавние доклинические исследования показали, что комбинированные нанотерапии, состоящие либо из нескольких классов наноматериалов, либо из одной наноплатформы, функционализированной несколькими терапевтическими агентами, могут подавлять рост опухоли с повышенной эффективностью, по сравнению с доставкой вещества отдельно. Среди всех многообещающих наноматериалов, которые находятся на стадии исследования, наноалмазы получили большее внимание благодаря уникальным химико-физическим свойствам их поверхности [27].

Иным применением НА является разделение и очистка белков. Была проведена работа по выделению рекомбинантного Ca^{2+} -активируемого фотопротейна апообелина и рекомбинантной люциферазы из бактериальных клеток *Escherichia coli*. Клеточные белки экстрагировались из биомассы, а клеточный дебрис удалялся центрифугированием. В супернатанте ресуспендировались частицы НА, которые далее собирались с помощью центрифугирования. Осадок частиц с адсорбированными белками, в том числе с апообелином, дважды промывался буфером для удаления несорбированных балластных белков. Апообелин десорбировался с поверхности частиц буфером. Полученный по данной технологии препарат апообелина имел высокую степень чистоты, выход апообелина составлял не менее 35-45%. Затем производилась очистка люциферазы и в супернатант добавлялись НА и после перемешивания собирались центрифугированием. Осадок промывался дважды для удаления неадсорбированных балластных белков. Люцифераза десорбировалась с поверхности частиц буфером. Конечный препарат белка по данным электрофореза имел высокую степень чистоты с выходом 45-60%. Необходимо отметить высокую экспрессность технологии очистки белков с помощью наноалмазов. Вся процедура занимала не более 40 минут [28].

В настоящее время исследуется возможность использования наноалмазов детонационного синтеза в качестве носителей для систем адресной доставки лекарственных препаратов. Получены супрамолекулярные комплексы из наноалмазных частиц и адресующих белковых молекул (наноалмаз-IgG I125 и RAM-наноалмаз-BSA I125). В экспериментах *in vitro* установлено, что такие комплексы стабильны и обладают высокой коллоидной устойчивостью в сыворотке крови, а также инертностью по отношению к клеточным элементам крови. Показано, что после одновременной ковалентной иммобилизации на наночастицы двух белков, RAM (rabbit anti-mouse antibody – антитела кролика против антител мыши) и BSA I125 (bovine serum albumin – бычий сывороточный альбумин), полученный комплекс может специфически связываться с антигеном-мишенью (IgG мыши) [29].

Биобезопасность человека при использовании наноматериалов стала актуальной проблемой, поскольку состав, морфология и химические свойства частиц становятся все более сложными. Если при попадании в организм человека наночастицы накапливаются и взаимодействуют с различными биомолекулами и химическими компонентами, может возникнуть риск для здоровья [30]. Соответственно, для каждого вида наночастиц требуются испытания, чтобы оценить их влияние на сложные биологические системы.

Однако следует заметить, что детонационные НА, имея несомненные достоинства, обладают существенным недостатком, ограничивающим их биотехнологическое применение. Этим недостатком является низкая коллоидная устойчивость алмазных наночастиц в дисперсионных средах, что делает невозможным получение устойчивых гидрозолей НА без обработки ультразвуком и обуславливает существенные трудности в получении строго определённых концентраций НА в гидrozолях. Влиять на физико-химические свойства НА посредством модификации алмазного ядра весьма сложно, гораздо проще изменить свойства НА можно модифицируя поверхность наночастиц.

Наноалмазы с химически модифицированной поверхностью в водной среде образуют устойчивые гидрозолы, допускающие кипячение,

замораживание и автоклавирование, что делает возможным применения данного наноматериала в медико-биологических целях [31].

1.2 Структура и физико-химические свойства наноалмазов

Наноалмазы – углеродные частицы, имеющие трехслойную структуру. Ядро наноалмазов имеет размеры 4-6 нм, и в нем находится до 90% атомов углерода. Промежуточный слой вокруг ядра построен из рентгеноаморфных структур углерода, толщиной 0.4 – 1.0 нм, и содержит от 10 до 30% атомов углерода. В поверхностном слое кроме углерода находятся и другие гетероатомы (О, Н), образующие ряд функциональных групп. При этом атомы азота достаточно равномерно распределены по всем слоям. Детонационные наноалмазы представляет собой химически инертный материал, с трудом поддающийся окислению. Чистые алмазы не токсичны, не являются канцерогенами и не вызывают мутации генов, они не растворяются в биологических жидкостях. У наноалмазов химически пассивное ядро классического алмаза почти круглой или овальной формы и высокоразвитая поверхность. Наличие на поверхности наночастиц различных химически активных функциональных групп, углеводородных фрагментов и микропримесей металлов определяют их высокие сорбционные свойства к биомолекулам [32].

Помимо упомянутых углеводородных, галоидных и кислородсодержащих групп, синтезированные алмазы, в зависимости от условий их обработки, на своей поверхности могут иметь азотсодержащие (аминные, амидные, циано- и нитрогруппы), сульфоновые и др. группы [33, 34]

Благодаря этим группам, НА способны адсорбировать водород, кислород, моно - и диоксид углерода. Кислород физически адсорбируется на поверхности алмаза уже при 195 К, а при 273-417 К наряду с обратимой физической адсорбцией наблюдается необратимая хемосорбция. Десорбция хемосорбированного кислорода в этом случае возможна лишь при повышенных

температурах с одновременным отрывом поверхностных атомов углерода в виде CO или CO₂. На разных гранях количество сорбированного кислорода приблизительно одинаково [35, 36].

В зависимости от наличия тех или иных поверхностных групп алмаз по-разному смачивается водой. Так, наличие кислородсодержащих групп делает поверхность алмаза гидрофильной, а метильных, гидридных, галогенидных - гидрофобной [37].

Это обстоятельство важно учитывать при создании алмазных наноконструктов для биолого-медицинского использования. В связи с наличием сложного функционального покрова на поверхности алмаза необходимо проводить предварительную обработку алмазного материала с целью получения однородного по функциональному составу поверхностного слоя, так называемую монофункционализацию поверхности [38].

Благодаря тому, что наноалмазы унаследовали большинство свойств алмаза, они являются выдающимся и перспективным материалом во многих областях, включая биомедицину. Речь идет о таких свойствах, как биосовместимость, оптические свойства, флуоресценция, высокая теплопроводность и электросопротивление, коллоидная стабильность и устойчивость наноалмаза к суровым условиям, а так же химически активная поверхность [1, 39, 40].

Для синтеза этих наночастиц используются взрывчатые вещества с отрицательным кислородным балансом, например, смесь 60 мас.% тротила (C₆H₂(NO₂)₃CH₃) и 40 мас.% гексогена (C₃H₆N₆O₆). Эти вещества помещают в закрытую металлическую камеру, где в присутствии N₂, CO₂ и H₂O, а также при высоком давлении и температуре, они детонируют. После детонации образовавшуюся алмазосодержащую сажу собирают со дна и стен камеры.

Считается, что наиболее устойчивой фазой углерода при низких давлениях является графит, а при высоких давлениях алмаз, причем обе фазы плавятся при температурах выше 4500 К (температура плавления каждой фазы зависит от давления). Во время детонации давление и температура мгновенно

возрастают, достигая точки Жуге (точка А на диаграмме, приведенной ниже), которая попадает в область жидких углеродных кластеров размером 1-2 нм для многих взрывчатых веществ. По мере уменьшения температуры и давления (красная линия на схеме) атомы углерода конденсируются в нанокластеры, которые сливаются в более крупные капли жидкости и кристаллизуются. Когда давление падает ниже линии равновесия алмаз-графит, рост алмаза заменяется образованием графита.

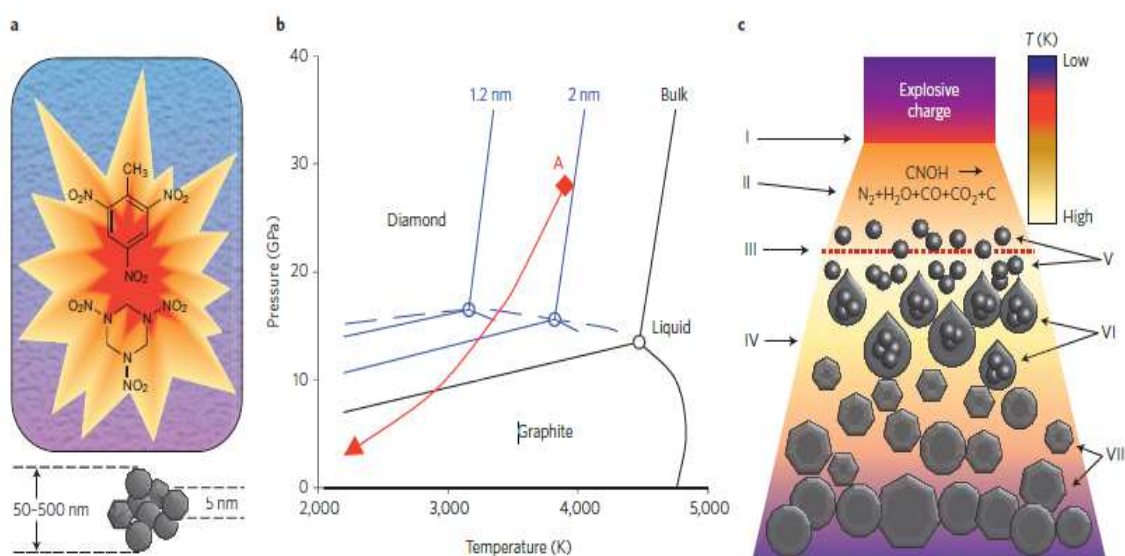


Рисунок 1 – Схема синтеза наноалмазов [41]

Выше представлена схема распространения детонации, на которой показаны зона ударной волны (I), зона химической реакции (II), в которой разлагаются молекулы взрывчатых веществ, плоскость Чепмена-Жуге (III), увеличение количества продуктов детонации (IV), образование углеродных нанокластеров (V); коагуляция в жидкие наноклапты (VI), а также кристаллизация, рост и агломерация наноалмазов (VII) [41].

Взрывчатые вещества, с помощью которых получают наноалмазы, представляют собой как источник углерода, так и энергию для его преобразования. В синтезе могут использоваться и другие взрывчатые

вещества, помимо ТНТ и гексогена, а детонация происходит в закрытой камере, заполненной инертным газом или водным хладагентом, что называется «сухим» или «мокрым» синтезом, соответственно.

Получаемый продукт - детонационная сажа - представляет собой смесь алмазных частиц (диаметром 4-5 нм) с другими аллотропами углерода и различными примесями. Детонационная сажа содержит до 75 мас.% алмаза. Выход углерода составляет 4-10% от веса взрывчатого вещества, в зависимости от скорости охлаждения среды [42, 43].

Другие методы, где используются взрывчатые вещества (например, использование ударных волн для получения наноалмазов из графита), дают возможность получать наноалмазы с размерами кристаллитов более 10 нм.

В дополнение к алмазной фазе, детонационная сажа содержит как графитовый углерод (25-85 мас.%), так и негорючие примеси (металлы и оксиды, 1-8 мас.%) [44]. Металлические примеси образуются от воспламенителя, используемого для инициирования детонации (обычно азидов свинца, серебра или меди) и стальных стенок детонационной камеры (железа и других металлов). Различные примеси могут находиться внутри агрегатов наноалмазов или прикрепляться к их внешней поверхности, следовательно, агрегаты наноалмазов должны быть разделены на части для удаления захваченных примесей [1, 45].

В Красноярском Институте биофизики СО РАН была разработана технология модификации наноалмазов детонационного синтеза, которая обеспечивает их высокую коллоидную устойчивость, что открывает перспективы их использования в биомедицине (Рис.2). Золи с модифицированными наноалмазами могут долго храниться, а так же подвергаться многочисленным замораживаниям, автоклавированию и обратимому переводу из золя в сухое состояние без потери коллоидной устойчивости и структурных изменений. Такой материал успешно применяется, например, как полифункциональный адсорбент для выделения и очистки белков, используется в индикаторных системах (биочипах) [46].

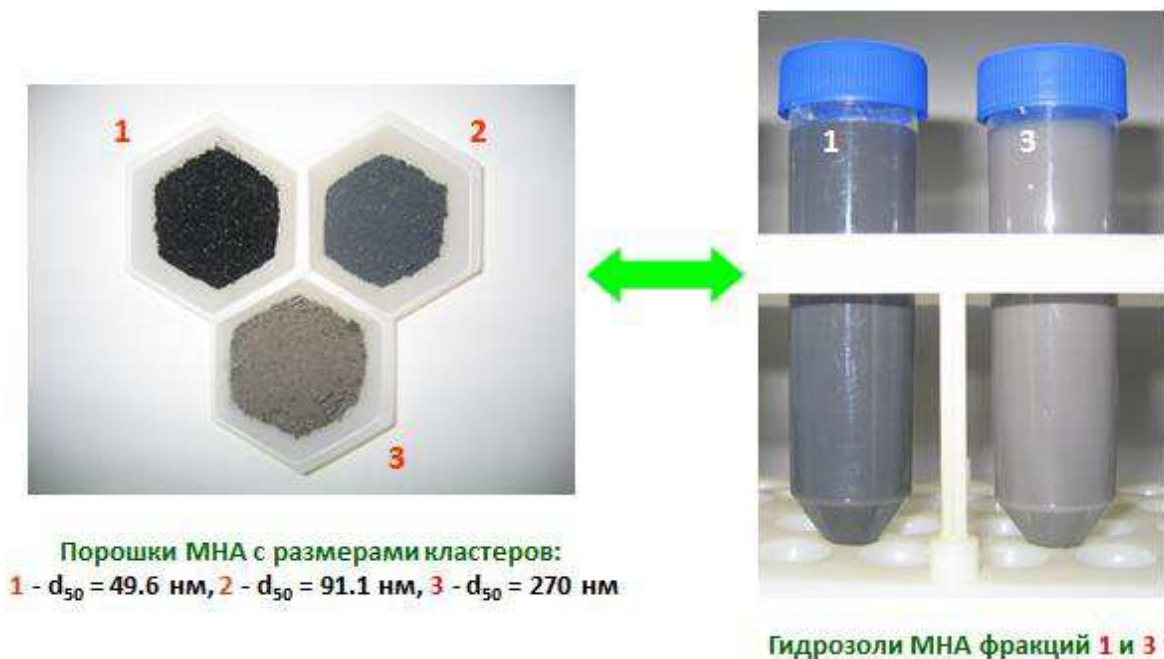


Рисунок 2 – Получение золей из сухих фракций наноалмазов

Сами по себе алмазы, как известно, являются диамагнетиками, но, тем не менее, синтезированные алмазные наноматериалы проявляют парамагнитные свойства за счет различных дефектов и ненасыщенных связей. Электронный парамагнитный резонанс служит методом для исследования таких свойств [47].

1.3 Метод ЭПР-спектроскопии

Метод электронного парамагнитного резонанса основан на взаимодействии вещества с магнитным полем. Как следует из названия метода, он применяется для исследования парамагнитных частиц. У частиц имеется магнитный момент. Магнитные моменты же, в свою очередь, создаются неспаренными электронами, которые имеют заряд, и при спиновом движении возникает магнитное поле, направленное вдоль оси вращения. Магнитный момент (S) согласно законам квантовой механики – квантуется. Соответственно принимает значение $(-S; +S)$. Магнитный момент классифицируется в магнитонах Бора. В этом случае, если мы разделим на магнитон Бора

магнитный момент, то S приобретает различные целые и дробные значения. $S=1/2(\text{min}) S=1, S=1,5$ (или $3/2$) и т.д. В этом случае, изменение магнитного момента может происходить кратно 1, т.е. для спина $1/2$, получается 2 значения, для спина 1, будет -1,0,1 [48].

Магнитный момент ($S=1/2$) неспаренного электрона во внешнем магнитном поле ориентируется двумя способами – по полю и против поля. Следовательно, если в исследуемой системе имеются неспаренные электроны, и наложение внешнего магнитного поля приводит к разделению электронов на две группы: магнитные моменты одних ориентированы по полю, других – против.

Каждой из ориентаций магнитных моментов электронов соответствует свободная энергия. Разница в энергии электронов определяется выражением

$$\Delta E_1 = E_2 - E_1 = g\beta H \quad (1.1)$$

где β – константа, называемая магнетоном Бора и равная $9.27 \cdot 10^{-21}$ эрг/Гс,

g – константа, называемая g фактором и равная 2,

H – напряженность магнитного поля.

Величина ΔE зависит от напряженности внешнего магнитного поля. При величине $H = 3000$ Гс, $\Delta E = 4 \cdot 10^{-5}$ эВ или 1 кал/моль, что при комнатной температуре гораздо меньше средней энергии теплового движения молекул.

В соответствии с законом Больцмана заселенность нижнего и верхнего уровня описывается выражением

$$n_2 = n_1 e^{-\Delta E/kT} = n_1 e^{-g\beta H/kT} \quad (1.2)$$

где n_1 и n_2 – количество электронов верхнего и нижнего уровней, определяемое выражением 2. (общее число неспаренных электронов в системе n_1+n_2).

Величина ΔE может быть выражена и другим способом, а именно

$$\Delta E = h\nu \quad (1.3)$$

где $h\nu$ - величина кванта энергии, необходимого для перевода электрона из одного состояния в другое.

$$h\nu = g\beta H \quad (1.4)$$

Данное выражение (1.4) носит название условия резонанса, которое позволяет понять смысл явления ЭПР. Если к находящейся в магнитном поле системе, содержащей неспаренные электроны, подвести высокочастотное излучение с частотой ν , определяемой условием резонанса, то в исследуемой системе возникнут вынужденные электронные переходы между соседними уровнями (E_1 и E_2). Переходы из верхнего состояния в нижнее происходят с испусканием энергии, а переходы из нижнего в верхнее - поглощением. При выполнении условия резонанса в образце будет наблюдаться поглощение высокочастотного излучения, поскольку число переходов снизу вверх больше.

Частота, при которой наблюдается резонансное поглощение высокочастотного излучения образцом, связана с напряженностью магнитного поля. Резонансное поглощение можно наблюдать при изменении H при постоянстве ν [49].

По оси ординат откладывается величина поглощенного образцом высокочастотного излучения, а по оси абсцисс – напряженность поля (рис.2.1).



Рисунок 3 – Вид сигнала, полученного ЭПР-спектрометром,

где по оси ординат откладывается величина поглощенного образцом высокочастотного излучения, а по оси абсцисс - напряженность поля

Основные части спектрометра ЭПР:

1. Магнит, создающий переменное поле
2. Источник радиочастотного излучения (на основе диодов Ганна)
3. Система, позволяющая подвести радиочастотное излучение к образцу и сконцентрировать это излучение на образце (волновод и резонатор)
4. Схема, позволяющая зарегистрировать поглощение радиочастотного излучения.

1.4 Статистическая обработка результатов

По результатам исследования была сформирована электронная база данных, на основе которой производился статистический анализ. Для полученных данных определяли среднее арифметическое значение (X), ошибку средней арифметической (m). Проверку гипотезы о статистической достоверности различий выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни [50].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

В работе были использованы НА со средним размером кластеров в гидрозолях $d_{50} = 70.6$ нм (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Англия). Исходный гидрозоль с концентрацией наночастиц 1 мг/мл готовили добавлением деионизованной воды Milli-Q system, Millipore, США, к навеске порошка НА. В качестве лабораторных животных использовали самцов мышей ICR массой 26-28 г, полученных в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирская обл.). Содержание НА в образцах определяли с помощью ЭПР Фурье-спектрометра Elexsys E580 (Bruker, Германия) в Центре коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

2.2 Методика исследования *in vitro*

Разведение исходного образца с НА до золь с разными концентрациями осуществляли в несколько стадий. В качестве исходного образца использовались НА марки RUDDUM-W (0 – 200), $d_{50} = 70,6$ нм, концентрация гидрозоля составляла 3 масс. %.

Ход работы:

1. Из исходного гидрозоля готовится в деионизованной воде золь с концентрацией 1 масс. % (400 мкл деионизованной воды + 200 мкл исходного гидрозоля НА).
2. Затем, из этого гидрозоля готовится образец с концентрацией 0,1 масс. % (900 мкл деионизованной воды + 100 мкл гидрозоля НА) – Образец 1.
3. Из образца 1 последовательными разведениями деионизованной водой с шагом в 5 (800 мкл деионизованной воды + 200 мкл гидрозоля НА предыдущей концентрации) готовится ряд золь со следующими концентрациями:

- Образец 1 – 0,1 масс.% (концентрация частиц 1мг/мл);
 - Образец 2 – 0,02 масс.% (концентрация частиц 200мкг/мл);
 - Образец 3 – 0,004 масс.% (концентрация частиц 40мкг/мл);
 - Образец 4 – 0,0008 масс.% (концентрация частиц 8 мкг/мл);
4. Из образцов №1-№4 добавляется по 200 мкл золя НА и вносится в 800 мкл гомогенатов, полученных из органов мышей. Таким образом, каждый образец НА разводится в 5 раз и получается следующий ряд концентраций НА в экстракте:

- Проба 1 – 0,02 масс.% (концентрация частиц 200 мкг/мл)
- Проба 2 – 0,004 масс.% (концентрация частиц 40мкг/мл)
- Проба 3 – 0,0008 масс.% (концентрация 8мкг/мл)
- Проба 4 – 0,00016 масс.% (концентрация частиц 1,6мкг/мл)

В качестве контроля используется 800 мкл + 200 мкл воды.

Гомогенаты тканей получали с помощью ручного стеклянного гомогенизатора. Для исключения контаминации биоматериалов частицами металла, все манипуляции с органами и тканями животных осуществляли с помощью пластиковых и керамических инструментов. Полученные образцы помещались во фторопластовые контейнеры объемом 0,8 мл и замораживались в жидком азоте. Затем замороженные образцы ставились в резонатор ЭПР-спектрометра.

В предыдущих экспериментах было установлено, что важным условием эффективного применения метода ЭПР для выявления МНА в образцах биоматериалов является их глубокое замораживание при низких температурах и увеличение объема исследуемого образца. Благодаря этому, были разработаны оригинальные контейнеры из фторопласта, которые позволяют проводить замораживание образцов в жидком азоте, и специальный держатель, позволяющий переносить замороженные образцы из контейнеров при температуре жидкого азота. В свою очередь, применение такого держателя

позволило использовать безампульный способ фиксации образца в резонаторе ЭПР спектрометра и увеличить объем изучаемых проб биоматериалов.

2.3 Методика исследований *in vivo*

Для исключения контаминации биоматериалов частицами металла, все манипуляции с органами и тканями животных осуществляли с помощью пластиковых и керамических инструментов. Использовали эфирный наркоз. Кровь брали из подключичной артерии, после чего животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Органы гомогенизировали в дистиллированной воде с помощью стеклянного гомогенизатора. Соотношение вес ткани - вода при гомогенизации: печень 1:1, селезенка 1:10, почки 1:4, сердце 1:10, головной мозг 1:3, мышцы бедра 1:3, легкие 1:6.

Все полученные образцы тщательно перемешивали, помещали в пластиковые контейнеры и замораживали в жидком азоте. После этого замороженные образцы извлекали из контейнеров и помещали при температуре жидкого азота в специальный держатель, который переносили в резонатор ЭПР спектрометра Elexsys E580 (“Bruker”, Германия), и регистрировали ЭПР спектры при температуре 85 – 90 К.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mochalin, V. N. The Properties and Applications of Nanodiamonds / O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi // *Nat. Nanotechnol* – Vol. 7 – №1 – 2012 – P. 11-23.
2. Saji, V. S. Nanotechnology in biomedical applications-A Review / V. S Saji, H. Choe, K.W.K. Young // *Int. J. Nano and Biomaterials* – Vol. 3 – №2 – 2010 – P. 119-139.
3. Faraji, A. H. Nanoparticles in cellular drug delivery / Amir H. Faraji, Peter Wipf // *Bioorganic & Medicinal Chemistry* – № 17 – 2009 – P. 2950–2962.
4. Liu, D. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential / Dong Liu, Fang Yang, Fei Xiong, Ning Gu // *Theranostics* – Vol. 6 – №9 – 2016 – P. 1306-1323.
5. Ramos, Ana P. Biomedical applications of nanotechnology / Ana P. Ramos, M. A. E. Cruz, C. B. Tovani, P. Ciancaglini // *Biophysical Reviews* – 2016 – P. 79–89.
6. Bhattacharya K. Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation / K. Bhattacharya, S. P. Mukherjee, A. Gallud, S. C. Burkert, S. Bistarelli, S. Bellucci, M. Bottini, A. Star, B. Fadeel // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* – 2015 – P. 333-351.
7. Mebert, A. M. Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity [Электронный ресурс] / A. M. Mebert, C. J. Baglole, M. F. Desimone, D. Maysinger // *Food and Chemical Toxicology* – 2017 – P. 82.
8. Xia, L. Cuprous oxide nanoparticles inhibit the growth of cervical carcinoma by inducing autophagy [Электронный ресурс] / L. Xia, Y. Wang, Y. Chen, J. Yan, F. Hao, X. Su, C. Zhang, M. Xu // *Oncotarget*, Advance Publications, 2017 – doi: 10.1007/s00204-017-1993-y.
9. Inzhevatkin, E. V. Elimination of Iron-Containing Magnetic Nanoparticles from the Site of Injection in Mice: a Magnetic-Resonance Imaging Study / E. V. Inzhevatkin, E. V. Morozov, E. D. Khilazheva, V. P. Ladygina, S. V.

- Stolyar, and O. V. Falaleev // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 158, No. 6 – 2015 – P. 777-781.
10. Ishchenko, L.A. Magnetic properties and application of biomineral particles produced by bacterial culture / L.A. Ishchenko, S.V. Stolyar, V.P. Ladygina, Yu.L. Raikher, M. Balasoiu, S. Iskhakov, E.V. Inzhevatin // *Physics Procedia*, Vol. 9 – 2010 – P. 279-282.
 11. Zhou, Y. PLLA microcapsules combined with silver nanoparticles and chlorhexidine acetate showing improved antibacterial effect / Y. Zhou, K. Hub, Z. Guo, K. Fang, X. Wang, F. Yang, N. Gua // *Materials Science and Engineering C* 78– 2017 – P. 349–353.
 12. Saleh, N. A. (2015). The QSAR and docking calculations of fullerene derivatives as HIV-1 protease inhibitors / N. A. Saleh // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* – 2014 – P. 1523-1529
 13. Bosi, S. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications / S. Bosi, T. D. Ros, G. Spalluto, M. Prato // *European Journal of Medicinal Chemistry* 38 – 2003 – P. 913-923.
 14. Skariyachan S. Nanoparticle Fullerene (C60) demonstrated stable binding with antibacterial potential towards probable targets of drug resistant *Salmonella typhi* – A computational perspective and in vitro investigation [Электронный ресурс] / S. Skariyachan, A. Parveen, S. Garka // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* – 2016 – Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2016.1257441>.
 15. Dresselhaus, M. Physics of carbon nanotubes / M. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito // *Carbon* – 1995 – Vol. 33 – P. 883–891.
 16. Wilder, J.W. Electronic structure of atomically resolved carbon nanotubes. J.W. Wilder, L.C. Venema, A.G. Rinzler, R.E. Smalley, C. Dekker // *Nature* – 1998 – Vol. 391 – P. 59–62.
 17. Heller, D. A. Single-Walled Carbon Nanotube Spectroscopy in Live Cells: Towards Long-Term Labels and Optical Sensors / D. A. Heller, S. Baik, T. E. Eurell, M. S. Strano // *Advanced Materials* №17 – 2005 – P. 2793–2799.

18. De La Zerda, A. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice / A. De La Zerda [et al.] // Nature Nanotechnology – №3 – 2008 – P. 557 – 562.
19. Star, A. Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors / A. Star, E. Tu , J. Niemann, J.C. Gabriel, CS. Joiner, C. Valcke // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – №103 – 2006 – P. 921–926.
20. Liu, Z. Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery / ACS Nano – Vol.1 – №1 – 2007 – P. 50–56.
21. Sanginario A. // Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment // Sanginario A., Miccoli B., Demarchi D. // Biosensors – 2017 – P. 7-9.
22. Wu, X. Graphene Oxide as an Efficient Antimicrobial Nanomaterial for Eradicating Multi-Drug Resistant Bacteria in Vitro and in Vivo [Электронный ресурс] / Xu Wu, Shirui Tan, Yuqian Xing, Qinqin Pu, Min Wu, Julia Xiaojun Zhao // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces – 2017 – Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.024>.
23. Liu, S. Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on Escherichia coli and Bacillus subtilis investigated by atomic force microscopy / S. Liu, A.K. Ng, R. Xu, J. Wei, C.M. Tan, Y. Yang, Y. Chen, // Nanoscale 2 – 2010 – P. 2744–2750.
24. Nepal, D. S. Balasubramanian, A.L. Simonian, V.A. Davis, Strong antimicrobial coatings: single-walled carbon nanotubes armored with biopolymers / D. Nepal, S. Balasubramanian, A.L. Simonian, V.A. Davis // Nano Letters – Vol. 8 – №7 – 2008 – P. 1896–1901.
25. Ricci, R. Graphene oxide nanoribbons as nanomaterial for bone regeneration: Effects on cytotoxicity, gene expression and bactericidal effect / R. Ricci, N.C.S. Leite, N.S. da-Silva, C. Pacheco-Soares, R.A. Canevari, F.R. Marciano, T.J. Webster, A.O. Lobo // Materials Science and Engineering C 78 – 2017 – P. 341–348.


26. Turcheniuk, K. Biomedical Applications of Nanodiamond [Электронный ресурс] / K. Turcheniuk, Vadym N. Mochalin // Nanotechnology – Vol. 28 – 2017 – Режим доступа: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6ae4>.
27. Ho, D. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine [Электронный ресурс] / D. Ho, C.H. Wang, E.K. Chow // Science Advances – Vol. 1 – № . 7 – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4643796/>.
28. Бондарь, В.С. Детонационный наноалмаз: создание новых материалов и технологий для выделения белков / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь, К.В. Пуртов, О.А. Могильная, Г.А. Выдрякова, Н.А. Тюлькова, Э.К. Родичева, С.И. Медведева, А.Г. Дегерменджи, И.И. Гительзон // Научно-техническая политика, Российские нанотехнологии, т. 3, №5–6 – 2008 – С. 78-83.
29. Purtoy, K. Nanodiamonds as Carriers for Address Delivery of Biologically Active Substances / K. Purtoy, A. Petunin, A. Burov, A. Puzyr ,V. Bondar // Nanoscale reswarch letters – Vol. 5 – 2010 – P. 631–636.
30. Su, H. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine [Электронный ресурс] / H. Su, Y. Wanga, Y. Gua, L. Bowmanb, J. Zhaoa, M. Dingb // Journal of applied toxicology – 2017 – Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.3476/full>.
31. Бондарь, В. С. Наноалмазы для биологических исследований / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Физика твердого тела – т. 4 – 2004 – С. 87-96.
32. Puzyr, A. Nanodiamonds with novel properties: A biological study / A. Puzyr, A. Baron, C. Purtoy, E. B. Bortnikov, N. Scobelev, O. Mogilnaya, V. Bondar // Diamond & Related Materials – № 16 – 2007 – P. 2124–2128.
33. Vidali, G. Helium as a probe of the surface of diamond / G. Vidali, M. W. Cole, W. H. Weinberg, W. Steele – Vol.51 – № 2 – 1983 – P.118-121.
34. Derry, T. E. Oxygen and hydrogen on the surface of diamond / T. E. Derry, C. C. P. Madiba, J. P. F. Sellshop / Nuclear Instruments and Methods in Physics - Vol. 218 – № 1– 1983 – с.559-562.

35. Evans, S. Surface properties of diamond: a review / Evans S., Thomas J. M. // *Diamond Research* – 1978 – P. 31-36.
36. Faklaris, O. Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells / Orestis Faklaris [et al.] // *ACS Nano* – Vol. 3 – №12 – 2009 – P. 3955–3962.
37. Schmidlin, L. Identification, quantification and modification of detonation nanodiamond functional groups / L. Schmidlin, V. Pichot, M. Comet, S. Josset, P. Rabu, D. Spitzer // *Diamond and Related Materials* – Vol. 22 – 2012 – P. 113-117.
38. Kaur, R. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems / R. Kaur, I. Badea // *International Journal of Nanomedicine* – Vol. 8 – №1 – 2003 – P. 203 – 220.
39. McGuinness, L. P. Quantum measurement and orientation tracking of fluorescent nanodiamonds inside living cells / L. P. McGuinness, Y. Yan, A. Stacey, D. A. Simpson, L. T. Hall, D. Maclaurin, S. Praver, P. Mulvaney, J. Wrachtrup, F. Caruso, R. E. Scholten, L. C. L. Hollenberg // *Nature Nanotechnology* – Vol. 6 – 2011 – P. 358–363.
40. Yuan, Y. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / Y. Yuan [et al.] // *Diamond and Related Materials* – Vol. 19 – № 4 – 2010 – P. 291-299.
41. Danilenko, V. V. Synthesis, Properties and Applications of Ultrananocrystalline Diamond (Proceedings of NATO Advanced Research Workshop / Eds. Gruen, D. Shenderova O. & Vul', A. // Springer – 2005 – P. 181–198.
42. Shenderova, O. A. Ultrananocrystalline Diamond: Synthesis, Properties, and Applications / O. A. Shenderova, D. M. Gruen (Eds.) // William Andrew Publisher, – 2006 – P. 618.
43. Dolmatov, V. Y. Detonation synthesis ultradispersed diamonds: Properties and applications / V. Y. Dolmatov // *Russian Chemical Reviews* – 2001 – Vol. 70 – №7 – P. 687–708.

44. Osswald, S. Control of sp²/sp³ carbon ratio and surface chemistry of nanodiamond powders by selective oxidation in air / S. Osswald, G., Yushin, V. Mochalin, S. O. Kucheyev, Y. J. Gogotsi // J. Am. Chem. Soc. – Vol. 128 – №35 – 2006 – P. 11635–11642.
45. Dolmatov, V. Y. Detonation synthesis ultradispersed diamonds: Properties and applications / V. Y. Dolmatov // Usp. Khim. – 2001– 687–708.
46. Бондарь, В.С. Наноалмазы для биологических исследований / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Физика твердого тела – вып. 4 – т. 46 – 2004 – С. 581-759.
47. Белобров, П. И. Парамагнитные свойства наноалмаза / П.И. Белобров, С.К. Гордеев, Э.А. Петраковская, О.В. Фалалеев // Доклады академии наук – 2001 – т.379, С. 65-78.
48. Pepper S. V. Diamond studies by electron energy loss spectroscopy in the characteristic loss region // Surface Science – Vol.123 – № 1 – 1982– С. 47-60.
49. Д.Ингрэм //Электронный парамагнитный резонанс в биологии.// Изд-во «Мир», 1972, С. 165-184.
50. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – учебное пособие – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва – Высшая школа – 1990 – С. 351.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

 Заведующий кафедрой
Е.И. Шишацкая

подпись

« 23 » июня 20 17 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

ДЕТЕКЦИЯ НАНОАЛМАЗОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ С ПОМОЩЬЮ ЭПР-СПЕКТРОМЕТРИИ

Руководители:



доцент, канд.мед.наук

Барон А.В.

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия



канд. биол. наук

Инжеваткин Е.В.

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник:

ББ13-01Б

041313570



Волкова М.Б.

номер группы

номер зачетной книжки

подпись, дата

инициалы, фамилия