

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Шэнь Тяньи

**Наноалмаз содержащие покрытия ксеногенных биологических
протезов клапанов сердца: получение и анализ с помощью
меченных тритием веществ**

1.4.13. Радиохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории радионуклидов и меченых соединений на кафедре радиохимии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель **Чернышева Мария Григорьевна** - доктор химических наук, доцент

Официальные оппоненты **Ланин Сергей Николаевич** - доктор химических наук, профессор, профессор кафедры физической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Герман Константин Эдуардович – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник с возложением обязанностей заведующего лаборатории химии технеция Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

Ларенков Антон Алексеевич – кандидат химических наук, заведующий отделом радиационных технологий медицинского назначения Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «26» февраля 2025 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.10, ауд.308. E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин, ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.6); tianyi.shen@chemistry.msu.ru (Шэнь Тяньи, соискатель). С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3285>

Автореферат разослан «__» января 2025 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Северин Александр Валерьевич



Актуальность темы исследования

Использование радиоактивных индикаторов уже доказало свою эффективность во многих исследованиях. Несомненный прогресс в разработке новых способов получения меченых соединений и новых приемов их применения позволяет решать многие сложные задачи, имеющие громадное практическое значение. Успешный опыт работ в этом направлении на кафедре радиохимии МГУ имени М.В. Ломоносова позволяет работать в смежных областях, когда радиохимический подход позволяет получить принципиально новые знания. Одной из таких важных задач является разработка и характеристика покрытий, улучшающих свойства материалов для протезов клапана сердца.

Ксеногенные протезы сосудов и сердечного клапана широко используются в сердечно-сосудистой хирургии [1]. Биологические протезы изготавливаются из ткани перикарда, которую получают, например, из свиней или крупного рогатого скота. Сердечный клапан, сделанный из биологического матрикса, монтируется в основной корпус (пластиковый каркас или саморасширяющийся стент), который затем имплантируется в положение естественного клапана. Материал, полученный из животного, должен быть тщательно очищен и подготовлен перед имплантацией таким образом, чтобы организм не распознавал его как чужеродный, материал не кальцифицировался и протез имел максимально длительный срок службы [2]. Оказалось, что покрытия на основе детонационных наноалмазов улучшают механические характеристики биологического материала, повышая его механико-прочностные характеристики. Будучи биосовместимым наноматериалом с большой функционально-развитой поверхностью наноалмазы детонационного синтеза, образуют устойчивые комплексы с различными веществами, в том числе лекарственными веществами и биополимерами [3], что делает их перспективным материалом для создания покрытий биоматериала протезов для сердечно-сосудистой хирургии.

Степень разработанности темы исследования

На момент, предшествующий выполнению данной работы, в литературе были описаны методики получения адсорбционных и ковалентных композитов наноалмазов с лекарственными веществами, а также опубликована первая работа, показывающая возможность получения покрытий коллагеновых матриц бычьего перикарда слоем наноалмазов и хитозана [4]. Такое покрытие обеспечило увеличение прочности материала на разрыв, при этом сделало его достаточно эластичным с сохранением S-образной формы кривой напряжение – деформация, что приближает полученные материал к человеческому.

Однако не было информации об устойчивости таких покрытий, получении много компонентных покрытий наноалмаз – антибиотик – хитозан и их антисептических свойствах и устойчивости в организме. Известно также, что далеко не все вещества сохраняют антимикробную активность при адсорбции на наноалмазах, например мирамистин теряет антимикробные свойства в комплексе с наноалмазами из-за участия в образовании связи четвертичной аммониевой группы [5]. Важно получить комплекс состава наноалмаз – антибиотик с известным составом, определить его антимикробные характеристики и способность адсорбироваться на поверхности биологической матрицы. Для решения такой задачи удобным способом является использование меченных тритием соединений. Одним из достижений последних лет является открытие возможности введение трития в углеродные наноматериалы без существенной модификации поверхности с помощью метода термической активации трития. Таким образом, для решения задач данной работы использованы как меченные тритием антибиотики и хитозан, так и наноалмазы.

Цель и задачи работы

Целью данной работы является получение и диагностика с помощью радиохимических методов покрытий, улучшающих свойства биологических материалов, которые используют для изготовления протезов клапана сердца.

Для достижения цели поставлены следующие *задачи*:

- Получение и количественная характеристика адсорбционных комплексов наноалмаз-амикацин, наноалмаз-левофлоксацин и наноалмаз-ванкомицин;
- Отработка методики и получение меченного тритием ванкомицина;
- Отработка и использование методики измерения количества меченных тритием наноалмазов на поверхности коллагеновых матриц и аорты свиньи;
- Количественная характеристика коллагеновых матриц и свиной аорты с наноалмазным покрытием после 4-х месячной эксплуатации животными: определения состава покрытия, отложений кальция и развития бактериальных инфекций.

Методология и методы исследования

В работе использованы современные физико-химические методы анализа и метод радиоактивных индикаторов. С помощью метода термической активации трития метка введена в органические вещества (амикацин, левофлоксацин, ванкомицин и хитозан), а также в детонационные наноалмазы (положительные и отрицательные). Для регистрации бета-излучения трития в растворах использовали метод жидкостной сцинтилляционной спектрометрии. Для характеристики адсорбционных комплексов наноалмаз-антибиотик использовали метод ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Содержание металлов, в частности кальция в азотнокислом растворе после разложения коллагеновой матрицы или аорты определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой.

Методика эксперимента включала следующие этапы:

1. Получение меченных тритием веществ;
2. Получение адсорбционных комплексов наноалмазы-антибиотик;
3. Нанесение покрытий на коллагеновые матрицы бычьего перикарда;
4. Анализ антимикробных свойств покрытий;
5. Изучение *in vivo* стабильности покрытий и их изменений при эксплуатации.

Научная новизна работы

Впервые показана возможность использования меченных тритием наноалмазов для определения их количества в покрытиях прототипов ксеногенных биологических протезов клапанов сердца. Тритий прочно удерживается в составе наночастиц и не удаляется даже при кипячении их в концентрированной азотной кислоте в течение часа.

Впервые получены и охарактеризованы адсорбционные комплексы наноалмазов с левофлоксацином и ванкомицином. Проведено сравнение механизма образования комплекса наноалмазов с амикацином и левофлоксацином; определены параметры кинетики адсорбции ванкомицина на наноалмазах.

Впервые показано влияние заряда поверхности и количества наноалмазов на механико-прочностные характеристики коллагенового материала с алмазосодержащим покрытием.

Впервые определена *in vivo* стабильность каждого компонента покрытия при эксплуатации материала и его кальцинирование.

Положения, выносимые на защиту

1. Наноалмазы детонационного синтеза образуют на поверхности биологической ткани прочные покрытия, улучшая механико-прочностные характеристики материала.
2. Алмазосодержащие покрытия биологических тканей устойчивы в организме и не вызывают дополнительное кальцинирование ткани.
3. Отрицательные наноалмазы, промышленно стабилизированные в форме суспензии, способны сами подавлять развитие бактериальных инфекций. Их действие может быть усилено введением в состав покрытия адсорбционных комплексов наноалмазы-антибиотик.

Теоретическая и практическая значимость.

Получены адсорбционные комплексы детонационных наноалмазов с антибиотиками широкого спектра действия: амикацином (аминогликозид III поколения), левофлоксацином (фторхинол III поколения) и ванкомицином (трициклический гликопептид). Состав комплексов количественно

охарактеризован и предложены механизмы их образования. Показана антимикробная активность полученных комплексов, что позволило использовать их в качестве компонентов покрытий биологических материалов, применяемых для протезирования в кардиохирургии.

Предложена методика получения устойчивых покрытий, улучшающих механико-прочностные характеристики и антимикробных свойства биологических материалов, применяемых в кардиохирургии.

Разработана методика одновременного определения состава покрытия по меченному тритием компоненту и количества металлов на поверхности материала, в частности, кальция методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС).

Соответствие паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.13 – Радиохимия по области исследований:

- получение и идентификация меченых соединений;
- метод радиоактивных индикаторов. Химические аспекты использования радионуклидов в биологии и медицине.

Степень достоверности

Достоверность определяется использованием стандартных методик измерения, использованием современного оборудования и многократным повторением экспериментов.

Личный вклад автора.

Вклад автора состоял в обработке научной литературы и подготовке обзора, проведении экспериментов по получению адсорбционных комплексов наноалмазы-антибиотик, нанесению наноалмазов и их адсорбционных комплексов с антибиотиками на поверхность коллагеновых матриц бычьего перикарда. ИК-Фурье-спектры комплексов наноалмазов с антибиотиками получены на кафедре физической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова ведущим научным сотрудником, к.х.н. Поповым А.Г. Анализ ИСП-АЭС проводили на кафедре аналитической химии химического

факультета МГУ имени М.В.Ломоносова доцентом, к.х.н. Михеевым И.В. Эксперименты с животными проводили в виварии НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева и эксперименты по исследованию антимикробных свойств проводились сотрудниками центра совместно с к.ф.-м.н. Чащиным И.С.

Апробация работы.

Основные результаты данной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях в форме стендовых и устных докладов: Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2021, 2022, 2023), X Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2022» (2022), LXXII Международная конференция "Nucleus-2022: Fundamental problems and applications" (2022), Всероссийская конференция «Поверхностные явления в дисперсных системах» посвященная 125-летию со дня рождения П.А. Ребиндера (2023), Международная конференция Нанокристаллы и Алмаз (НиА2024).

Публикации

Основные материалы работы отражены в 5 печатных публикациях, в том числе в 5 статьях в журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и входящих в ядро РИНЦ.

Структура и объем работы.

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит 19 рисунков, 24 таблиц и список литературы из 304 наименований.

Во **введении** отражена актуальность работы, ее научная и практическая значимость, новизна, цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

Первая, вторая и третья главы посвящены обзору литературы. В них отражено современное состояние исследований наноалмазов, в том числе как носителей для различных лекарственных средств; показаны примеры использования метода радиоактивных индикаторов для характеристики модификации поверхности наноалмазов органическими соединениями; приведены свойства радиоактивного изотопа водорода – трития, способы его

регистрации, а также описан метод термической активации трития, как способ получения меченых веществ.

В **четвертой главе** представлены характеристики используемых веществ, приведены методики экспериментов.

Результаты работы и их анализ приведен **в пятой, шестой, седьмой и восьмой главах.**

1. Получение меченных тритием антибиотиков и исследование их адсорбции на наноалмазах

В работе получены многокомпонентные покрытия коллагеновых матриц бычьего перикарда, которые являются материалом для изготовления протеза сердечного клапана. Покрытия имеют следующий состав: наноалмазы – антибиотик – хитозан. Для количественной характеристики адсорбционной способности наноалмазов по отношению к антибиотикам, состава покрытия до и после эксплуатации в живом организме использовали меченные тритием вещества (амикацин, левофлоксацин, ванкомицин, наноалмазы и хитозан), которые получали с помощью метода термической активации трития. Одной из целей настоящей работы была разработка условий введения трития в ванкомицин. Использовали метод термической активации трития с условиями типичными для введения метки в остальные вещества (амикацин и ванкомицин): температура вольфрамовой проволоки 1820 К, время реакции 10 с, температура мишени 77 К, давление трития в системе 0,5 Па. В таких условиях доля трития в лабильных положениях составляет около 50%. Поскольку атомы трития взаимодействуют преимущественно с молекулами на поверхности мишени, уменьшение количества вещества в эксперименте приводит к увеличению удельной радиоактивности меченого соединения. Было показано, что величина удельной активности [³H]ванкомицина в указанных условиях возрастает от 0,48 ТБк/ммоль до 1,37 ТБк/ммоль при уменьшении массы мишени от 0,38 до 0,05 мг.

Попытка увеличения удельной активности ванкомицина за счет нанесения его на стенки сосуда с развитой поверхностью (шероховатые стенки) не увенчалась успехом: удельная радиоактивность [³H]ванкомицина уменьшилась

с 0,88 ТБк/ммоль (гладкие стенки) до 0,46 ТБк/ммоль (шероховатые стенки) при массе мишени 0,1 мг. Вероятно, это связано с тем, что межмолекулярные взаимодействия в ванкомицине предпочтительнее, чем взаимодействие ванкомицин-стекло [6]. В результате молекулы ванкомицина не создают равномерную пленку на поверхности стекла при подготовке мишени, а образуют агрегаты. На шероховатых стенках сосуда такие агрегаты прежде всего заполняют «углубления», и доступная атомам трития поверхность вещества становится меньше, чем для гладких стенок. Для гладких стенок реактора уменьшение массы мишени ниже 0,05 мг при геометрической площади стенок 200 см² представляется также нецелесообразным, так как будет невозможно обеспечить равномерное покрытие поверхности сосуда веществом.

При получении изотерм адсорбции антибиотиков на наноалмазах а также при получении слоев на поверхности коллагеновых матриц меченный тритием препарат смешивали с немеченым веществом для получения нужной концентрации. На рисунке 1 приведены изотермы адсорбции амикацина, левофлоксацина и ванкомицина на наноалмазах. Для сравнения адсорбционных характеристик наноалмазов по отношению к антибиотикам использовали модели адсорбции Ленгмюра и Фрейндлиха, для определения механизма связывания антибиотика с поверхностью – модель Дубинина-Радушкевича (уравнения 1,2 и 3 соответственно). Полученные параметры приведены в Таблице 1.

$$\Gamma = \Gamma_{\text{макс}} \frac{K_L c}{1 + K_L c} \quad (1)$$

$$\Gamma = K_F c^{1/n} \quad (2)$$

$$\Gamma = \Gamma_{\text{макс}} e^{-\beta \varepsilon^2} \quad (3)$$

$$E = (2\beta)^{-\frac{1}{2}}$$

$$\varepsilon = RT \ln \left(1 + \frac{1}{c} \right)$$

Здесь $\Gamma_{\text{макс}}$ – значение максимальной адсорбции, c – равновесная концентрация амикацина, K_L , K_F и n – константы в уравнениях адсорбции Ленгмюра и Фрейндлиха, β – константа в уравнении Дубинина-Радушкевича, ε – потенциал Поляни, отражающий изотермическую работу переноса моля

вещества из раствора к поверхности сорбента

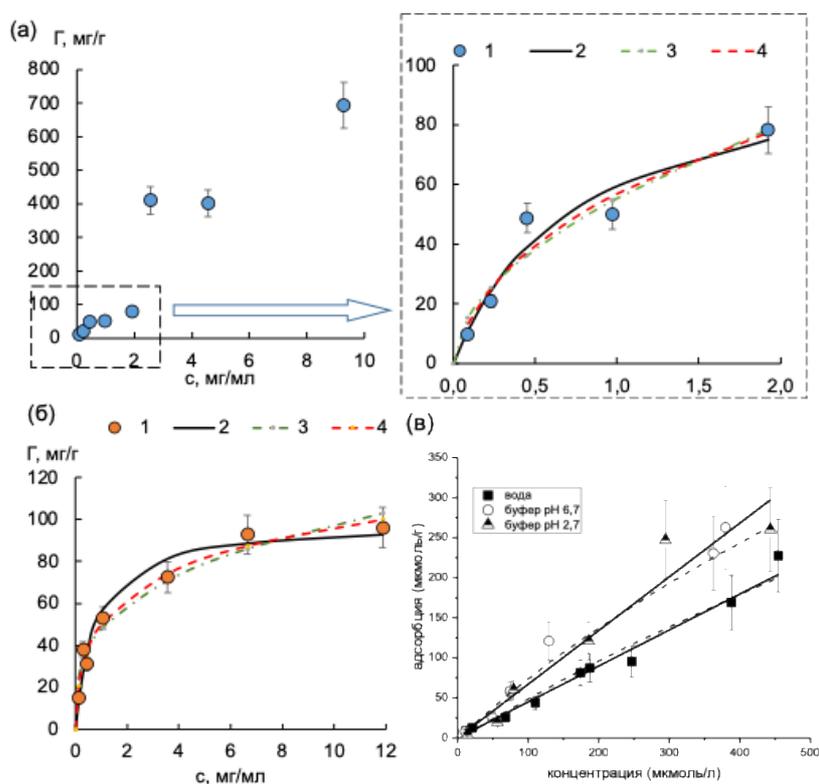


Рисунок 1. – Изотермы адсорбции левофлоксацина (а), амикацина (б) и ванкомицина (в) на наноалмазах. Точками (1) показаны экспериментальными данные. Линии показывают аппроксимацию по уравнениям Ленгмюра (2), Фрейндлиха (3) и Дубинина-Радушкевича (4).

Таблица 1. Параметры уравнений (1-3) для адсорбции антибиотиков на наноалмазах из воды

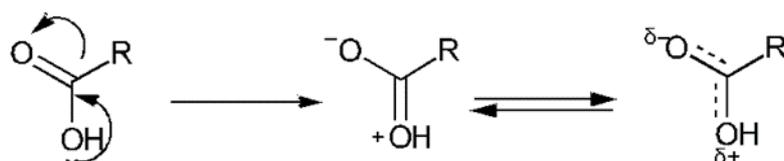
Антибиотик	Модель Ленгмюра			Модель Фрейндлиха			Модель Дубинина-Радушкевича			
	Γ_{\max}	K_L	R	K_F	N	R	B	Γ_{\max}	E	R
Левифлоксацин	105	1,3	0,966	55	1,9	0,961	0,007	247	8,5	0,965
Амикацин	99	1,3	0,979	48	3,2	0,978	$5 \cdot 10^{-3}$	159	11	0,987
Ванкомицин	220	1,74	0,973	-	-	-	0.009	72,5	7,47	0,925

Примечание: Γ_{\max} (мг/г), K_L (л/г), K_F (мг/г), B (моль²/кДж²), E (кДж/моль)

Из полученных значений свободной энергии в модели адсорбции Дубинина-Радушкевича предположили физический характер адсорбции

левофлоксацина и ванкомицина на наноалмазах, и хемосорбцию для амикацина.

В ИК-спектре комплекса наноалмазы-левофлоксацин присутствовала полоса 1621 см^{-1} , которая может быть обусловлена наличием конденсированной ароматической группы, а также AgCO_2^- . Уширение этой полосы в область более высоких волновых чисел (1745 см^{-1}) может быть обусловлено образованием связи между $\text{C}=\text{O}$ карбоксильной группы левофлоксацина и поверхностью наноалмаза, при которой происходит делокализация электронной плотности:



На примере ванкомицина показали, что адсорбция определяется ионной силой раствора и слабо зависит от pH (отрицательные наноалмазы, для которых заряд поверхности не зависит от pH в диапазоне от 2 до 10).

Устойчивость адсорбционных комплексов изучили в различных средах, в том числе содержащих альбумин (БСА) – как основной белок и связывающий агент крови. Эксперименты по десорбции проводили при 37°C . Результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Десорбция антибиотиков с поверхности наноалмазов

Антибиотик	Начальное значение поверхностной концентрации, мг/г	Значение поверхностной концентрации после десорбции в 0.9% NaCl, мг/г	Значение поверхностной концентрации после десорбции в растворе 40 г/л БСА в 0.9% NaCl, мг/г
Амикацин	73 ± 13	58 ± 15	30 ± 8
Левифлоксацин	132 ± 23	34 ± 6	17 ± 3
Ванкомицин	97 ± 24	10 ± 4	3 ± 1
	35 ± 6 *	33 ± 6 *	22 ± 4 *

(*) ДНА – положительно заряженные наноалмазы

Для комплексов с наибольшим насыщением поверхности алмаза антибиотиком были сняты ИК-спектры, показывающие наличие антибиотика на поверхности наноалмазов, в качестве контроля сняты ИК-спектры наноалмазов и ванкомицина.

Проверена антимикробная способность по отношению к золотистому стафилококку, как основному возбудителю заболеваний в послеоперационный период (Таблица 3). Показано, что немодифицированные отрицательно заряженные наноалмазы, стабильные в водной суспензии, сами по себе проявляют антимикробные свойства, которые усиливаются для комплекса с антибиотиком.

Таблица 3. Значения индексов адгезии и выживания *Staphylococcus aureus* для исследуемых покрытий.

Состав покрытия	Нет покрытий	SDND	SDND-амикацин	SDND-левофлоксацин	SDND-ванкомицин
Индекс адгезии (lg (КОЕ))	~5	~3.0	~2.5	~2.9	~2,4
Индекс выживаемости (lg (КОЕ))	~5	~1.5	~0.9	~1.1	~2,2

2. Получение и характеристика наноалмаз содержащих покрытий на поверхности коллагеновых матриц

Известно свойство детонационных наноалмазов образовывать прочные агрегаты в солевых растворах. На этом свойстве основана и разработана методика нанесения покрытий на поверхность материалов. Исследуемый материал помещали в водную суспензию наноалмазов (или комплексов наноалмазов с антибиотиком) и перемешивали в течении 1 суток. Затем образец материала помещали в 0,9% раствор хлорида натрия. В таком виде матрицы с нанесенным слоем хранили до проведения следующих экспериментов.

Известно, что хитозановые покрытия коллагеновых матриц предотвращают отложение на их поверхности солей кальция при эксплуатации [7]. Хитозан наносили на поверхность матриц с алмазным покрытием из раствора в условиях сверхкритического диоксида углерода [8]. Для определения количества наноалмазов и хитозана на поверхности материала использовали меченные тритием наноалмазы и хитозан, полученные с помощью метода термической активации трития. В этих экспериментах проверили влияние заряда поверхности наноалмазов на их количество в матрице. Использовали наноалмазы, поставляемые производителем в форме

порошка (ДНА), проводили их отжиг на воздухе (ДНА-О₂) при 450°С для получения отрицательного заряда на поверхности [9]. Далее порошки диспергировали в воде и помещали в них образцы коллагеновых матриц. При определении количества наноалмазов добавляли индикаторное количество соответствующего наноалмаза, меченного тритием. Найдено, что содержание положительных наноалмазов на поверхности матрицы составляет 4,0±1,2 мг/г, а отрицательных – 1,5±1,0 мг/г. Показано, что наличие наноалмазного покрытия как положительного, так и отрицательного, не влияло на количество адсорбированного хитозана из сверхкритического Н₂О/СО₂, которое составило 20±2 мг/г. Также с использованием меченных тритием наноалмазов было показано, что при нанесении слоя хитозана на матрицы с наноалмазами содержание последних не изменяется. Равномерность покрытия на обеих сторонах коллагеновых матриц определена с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Нанесение на поверхность коллагеновых матриц слоев наноалмазов улучшило механико-прочностные характеристики коллагеновых матриц. Механические свойства коллагенового материала являются одним из важных факторов определяющим долгосрочность их службы в качестве биологических протезов клапанов сердца. В работе исследованы механико-прочностные характеристики образцов коллагеновой ткани с покрытием, содержащим наноалмазы и хитозан. Проанализировали влияние заряда поверхности наноалмаза (положительный – неокисленный, отрицательный – окисленный). Поскольку результат измерения механических характеристик коллагеновой ткани зависит от способа нарезания полосок для анализа (вдоль или поперек коллагеновых фибрилл), то в настоящей работе проанализированы оба типа образцов, отмеченные значками «П» и «Л» для образцов, нарезанных вдоль или поперек коллагеновых фибрилл соответственно.

Получали зависимости приложенной силы от удлинения, из которых определяли механико-прочностные характеристики образцов: σ – напряжение при растяжении, МПа; ε - относительное удлинение при разрыве, %; E – модуль

упругости (Модуль Юнга), МПа. Значения напряжения при разрыве (σ), относительного удлинения при разрыве (ϵ) и модуля упругости (Модуль Юнга) (E) приведены в таблице 4.

Таблица 4. Механические характеристики коллагеновых образцов с наноалмазным и хитозановым покрытием.

Количество образцов	σ , МПа	ϵ , %	E , МПа
Бычий перикард с нанесенным наноалмазным (ДНА) и хитозановым покрытием			
5 II	11±1	47±2	40±5
5 I	3,5±0,5	45±5	12±2
Бычий перикард с нанесенным наноалмазным (ДНА-О ₂) и хитозановым покрытием			
5 II	12±1	45±5	57±7
5 I	5,0±0,5	45±5	22±5
Бычий перикард, стабилизированный глутаровым альдегидом			
5 II	11±1	42±1	35±5
5 I	4,0±0,5	41±1	17±3

Образцы с нанесенным покрытием из ДНА по свойствам в целом сходны с контрольными, однако более эластичные ~ 30%. Образцы с ДНА-О₂ прочнее (на ~10% для II и на ~25% для I) и значительно жестче (на ~50% для II и на ~25% для I по сравнению с контролем и на для I ~ 400% по сравнению с ДНА). Исходя из результатов, можно заключить, что несмотря на общее меньшее количество частицы ДНА-О₂ оказывают сильное влияние на механические свойства матриц.

Отметим, что наноалмазы (SDND, PlasmaChem), которые поставляются продавцом в форме суспензии и имеют отрицательный заряд поверхности, не оказывают такого сильного влияния на механические прочностные характеристики коллагеновой ткани, как это наблюдалось ранее для наноалмазов, поставляемых продавцами в виде порошков. Наибольшее увеличение максимальной деформации наблюдалось для образцов, содержащих покрытие с наноалмазами, модифицированными амикацином. Важно отметить, что при модификации поверхности биологической ткани наноалмазами сохраняется J-образная форма кривой напряжение-деформация, что делает ее похожей на человеческую ткань.

3. *Исследование стабильности наноалмаз содержащих покрытий in vivo¹*

Для определения устойчивости всех тех компонентов покрытия (наноалмазы-антибиотик-хитозан) при эксплуатации в живом организме были выбраны наноалмазы SDND, хитозан, антибиотики – амикацин и левофлоксацин. При получении покрытий тритиевая метка находилась в одном из компонентов покрытия, остальные компоненты оставались немечеными, что позволило определить каждый компонент, оставшийся в составе покрытия после 4 месяцев эксплуатации их крысами под кожей. В таблице 5 приведен состав покрытий до и после эксплуатации материала.

Таблица 5. Состав покрытий наноалмазы-антибиотик-хитозан коллагеновых матриц до и после их ношения крысами.

Состав покрытия	Содержание меченного тритием компонента, мг/г ^(*)	
	до эксплуатации	после эксплуатации
[³ H]наноалмазы-амикацин-хитозан	3,3±0,6	2,1±0,4
наноалмазы-амикацин-[³ H]хитозан	23±6	3,5±0,4
наноалмазы-[³ H]амикацин-хитозан	0,28±0,02	0,20±0,07
[³ H]наноалмазы-левофлоксацин-хитозан	1,8±0,4	0,08±0,04
наноалмазы-левофлоксацин-[³ H]хитозан	21±4	14,7±0,7
наноалмазы-[³ H]левофлоксацин-хитозан	0,19±0,02	0,10±0,06

(*) Приведены средние значения по 6 матрицам ± доверительный интервал (P = 95 %).

Показано, что покрытия, содержащие амикацин, лучше удерживаются на поверхности коллагеновых матриц при эксплуатации. Амикацин как лекарственное средство также показал хорошую стойкость на поверхности, при том, что его антимикробная активность по отношению к золотистому стафилококку сохраняется. Уменьшение слоя хитозана связано с удалением слоев, которые слабо связаны с поверхностью. Это предположение

¹ Эксперименты с животными проводили сотрудники Центра сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева в рамках этических норм ЦССХ им. А.Н. Бакулева на основании директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях

подтверждается результатами, полученными для серии левофлоксацина. В этом случае сохранилось около 70% хитозана, вероятно, из-за электростатических взаимодействий. Для матриц без наноалмазного покрытия содержание хитозана, осажденного из раствора в условиях сверхкритического диоксида углерода, составляет около 10 мг на г матриц. Слой наноалмазов с левофлоксацином оказался менее стабильным по сравнению с образцом с амикацином, в котором слой сохранился на 60%. Таким образом, наши результаты показали, что стабильность покрытия, содержащего наноалмазы, определяется функциональным составом поверхности наночастиц, который, в свою очередь, зависит от антибиотического модификатора наноалмазов.

Достоинством разработанного подхода определения состава покрытия является получение азотнокислого раствора матрицы, который можно проанализировать на содержание металлов методом ИСП-АЭС. Тем самым уменьшить в два раза количество используемых в работе животных. Поскольку отложения кальция на протезах являются одной из наиболее важных проблем при их использовании, раствор азотной кислоты был проанализирован методом ИСП-АЭС на наличие металлов, в частности кальция. Анализ ANOVA результатов измерения проводили с использованием программного обеспечения Statistica10. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Содержание металлов в матрицах после 4 месяцев эксплуатации животными.

Состав покрытия	Содержание металла на г матрицы, мг/г				
	Ca	Fe	Zn	Na	K
наноалмазы-амикацин-хитозан	1,58±0,42	1,39±0,59	0,11±0,05	11,0±6,9	11,33±0,65
наноалмазы-левофлоксацин-хитозан	1,45±0,48	0,89±0,15	0,10±0,08	16,0±7,5	9,33±3,46
контроль (матрица без покрытий)	11,3±0,9	0,54±0,05	0,07±0,01	13±3	9±2

Показано снижение концентрации кальция на матрицах, содержащих покрытия по сравнению к с контрольным образцом. Таким образом, были

впервые получены и проанализированы с разных точек зрения многокомпонентные покрытия коллагеновых матриц бычьего перикарда. Исследования *in vivo* показали сохранение слоев, состоящих из наноалмазов, антимикробных агентов и хитозана, на поверхности материала и предотвращение отложения на нем кальция.

Для исследования устойчивости наноалмазных покрытий в кровотоке по описанной выше методике нанесли покрытия из меченных тритием наноалмазов положительных и отрицательных (отожженных на воздухе порошка и предоставленных в виде суспензий) на кусочки свиной аорты, на которую затем нанесли слой хитозана в условия сверхкритического $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$. После этого кусочки аорты хирурги центра сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева вшивали в конduit из свиной аорты хирургически под общим наркозом подшивали к аорте свиньи. Эксперимент с нахождением кондуита в аорте животного проходил в течение 4,5 месяцев. На протяжении всего срока все показатели у животного были в норме. После проведения эксперимента и эвтаназии животного, конduit извлекли и проводили гистологическое исследование ткани всех образцов: подшитых образцов с покрытиями, контрольного подшитого в конduit образца, кондуита носителя, а также нативной аорты на кальциноз, остаточного содержания наноалмазов в составе покрытия. Затем образцы были возвращены в МГУ для измерения количества наноалмазов и кальция на поверхности.

Из гистологического анализа образцов следует, что все образцы с покрытием, которые были подшиты в конduit-носитель были устойчивы к кальцинозу, далее содержание кальция в образцах определили методом ИСП-АЭС. Просто модификация путем девитализации без дополнительного антикальциевого покрытия не так эффективна в плане подавления этого деструктивного явления. Более того, композитное покрытие с наличием наноалмазов SDND устойчиво не только к кальцинозу, но и воспалениям и фиброзу, что говорит о выраженном антимикробном эффекте такого покрытия.

Все образцы, включая контрольные, были высушены до постоянной массы, растворены в азотной кислоте и проанализированы на содержание в них наноалмазов (по радиоактивности) и на наличие металлов методом ИСП-АЭС. В таблице 7 приведены количества разных типов наноалмазов на аорте после нанесения покрытия и после ношения животным. В таблице 8 приведено содержание металлов в образцах.

Таблица 7. Количество наноалмазов на поверхности аорты до и после эксплуатации животным.

Тип наноалмазов	Содержание наноалмазов, мг наноалмазов на 1 г аорты	
	После нанесения	После извлечения из тела животного
ДНА	2,00 ± 0,14	0,13 ± 0,05
ДНА-O ₂	3,00 ± 0,20	0,40 ± 0,10
SDND	5,50 ± 0,25	0,80 ± 0,20

Таблица 8. Содержание металлов в разных образцах аорты после извлечения из тела животного.

Образец	Количество металла, мг на 1 г аорты				
	Ca	K	Mg	Na	Fe
Контрольный образец нативной аорты свиньи, взятый далеко от кондуита	0,03	0,004	0,01	1,66	9·10 ⁻⁴
Контрольный образец нативной аорты свиньи, взятый рядом с кондуитом	0,39	0,23	0,13	22	0,02
Контрольный образец донорской аорты, вшитый в конduit	246	0,22	2,57	36	0,13
Контрольный образец аорты кондуита	249	0,24	4,53	36	0,04
ДНА	123	0,30	1,13	36	0,13
ДНА-O ₂	212	0,22	3,11	39	0,11
SDND	182	0,28	1,86	42	0,15

Полученные данные свидетельствуют о стабильности наночастиц в составе покрытия при эксплуатации свиньей в течение четырех месяцев (Таблица 7). По

результатам, полученным с помощью метода радиоактивных индикаторов, показано наличие в покрытии наноалмазов всех типов. Доля остаточного количества отрицательно заряженных наноалмазов была несколько выше, чем положительно заряженных. Поскольку после разложения биологической ткани в азотной кислоте на наноалмазной фазе оставалась радиоактивная метка, это позволило нам проанализировать раствор азотной кислоты на содержание кальция. Это является несомненным преимуществом разработанной методики, поскольку позволяет получить полную информацию о материале после его обработки.

Отрицательно заряженные наноалмазы обладают высокой способностью предотвращать развитие инфекции. Отметим, что их эффективность может быть значительно повышена за счет применения антибиотиков, которые могут адсорбироваться на разработанной высокофункциональной поверхности наноалмазов. SDND обладают более высокой антибактериальной эффективностью, чем другие исследованные здесь наноалмазы. Причина заключается в карбоксилированной поверхности наноалмазов SDND, которые способствуют прикреплению к поверхности клеточной стенки бактерий [10]. Таким образом, мы можем предположить, что карбоксилированные наноалмазы могут быть использованы в качестве отдельного покрытия для биоматериалов для изготовления протезов, в то время как положительно заряженные наноалмазы требуют адсорбции химически связанных лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью меченных тритием антибиотиков охарактеризованы комплексы наноалмазов с амикацином, левофлоксацином и ванкомицином. На основании результатов, полученных с помощью метода радиоактивных индикаторов и ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием предложены механизмы образования адсорбционных комплексов наноалмазы-антибиотик. Получены адсорбционные комплексы наноалмазов с амикацином и левофлоксацином в условиях максимального насыщения лекарственным

средством для получения многокомпонентных антимикробных покрытий коллагеновой матрицы бычьего перикарда.

Разработана методика нанесения наноалмазов и их комплексов с антибиотиками на поверхность коллагеновых матриц перикарда и аорты. По данным сканирующей электронной микроскопии наночастицы покрывают матрицы равномерным слоем как с гладкой, так и с ворсистой сторон. При этом улучшаются механико-прочностные характеристики материала независимо от количества нанесенных наноалмазов.

Показано, что наноалмазы в покрытии прочно удерживают антибиотики, которые сохраняют антимикробные свойства. Применение наноалмазов позволяет использовать меньшее количество антибиотика для подавления роста золотистого стафилококка – основного возбудителя инфекции в постоперационный период. При сравнении антимикробных характеристик покрытий, содержащих амикацин, левофлоксацин и ванкомицин, оказалось, что антимикробные свойства покрытий с амикацином и левофлоксацином на порядок выше, чем в случае ванкомицина.

Определена стабильность наноалмазных покрытий *in vivo*: для покрытий наноалмазы-антибиотик-хитозан определено количество каждого компонента в составе покрытия после четырех месяцев эксплуатации материала под кожей у крыс. Для покрытий наноалмаз-хитозан (3 типа наноалмазов) определено количество наноалмазов каждого типа после четырех месяцев эксплуатации в кровотоке свиньи.

Стабильность покрытия, содержащего наноалмазы, зависела от функционального состава поверхности наночастиц, в том числе от модификатора-антибиотика. Показано, что покрытия, содержащие амикацин, лучше удерживался в матрице в процессе эксплуатации и сохраняют антимикробную активность. Увеличение содержание хитозана в алмазосодержащей матрице приводило к тому, что часть полисахарида удалялась в процессе эксплуатации. Однако для комплекса наноалмазы-

левофлоксацин эффект был менее выраженным, вероятно, из-за электростатических взаимодействий.

Необходимо отметить, что разработанный подход позволяет в два раза уменьшить количество животных, задействованных в эксперименте, поскольку стало возможно определить состав покрытия и его кальцинирование из одного и того же раствора.

Анализ ИСП-АЭС показал, что для обоих типов покрытий наноалмаз-амикацин-хитозан и наноалмаз-левофлоксацин-хитозан содержание кальция существенно не отличается и составлял $1,5 \pm 0,4$ мг/г, в то время как в образце без покрытия содержание кальция почти на порядок выше ($11,3 \pm 0,9$ мг/г). Полученный результат подчеркивает роль хитозана в предотвращении кальциноза, а также подтверждает, что наноалмазное покрытие не способствует отложению нерастворимых солей кальция.

Когда наноалмазное покрытие было нанесено на аорту и подшито в аорту свиньи, покрытия сохранялись в течение 4 месяцев эксплуатации. Уже тот результат, с учётом быстрого метаболизма свиньи, что животное выжило и, более того, прекрасно себя чувствовало с кондуитом с исследуемыми образцами, является положительным с точки зрения достаточного подавления кальциноза и устойчивости к воспалению модифицированных образцов ткани аорты. По результатам, полученным с помощью метода радиоактивных индикаторов, показано наличие в покрытии наноалмазов всех типов. Доля остаточного количества отрицательно заряженных наноалмазов была несколько выше, чем положительно заряженных. Анализ тканей показал, что отрицательно заряженные наноалмазы сами по себе обладают высокой способностью предотвращать развитие инфекции, а как мы показали ранее их эффективность может быть значительно повышена за счет применения антибиотиков. Также как и в экспериментах на крысах, здесь было отмечено невысокое кальцинирование материала с покрытием. Таким образом, мы можем рекомендовать карбоксилированные наноалмазы в качестве самостоятельных компонентов покрытий для изготовления протезов из

биоматериалов, в то время как положительно заряженные наноалмазы требуют предварительной адсорбционной модификации антибиотиками, например, амикацином.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны способы введения трития в антибиотики (левофлоксацин, амикацин, ванкомицин), наноалмазы и хитозан с помощью метода термической активации. Комплексное использование меченых соединений позволило определить состав адсорбционных комплексов наноалмаз-антибиотик и охарактеризовать трехкомпонентные покрытия наноалмаз-антибиотик-хитозан, в том числе в экспериментах *in vivo*.
2. Разработана методика получения покрытий наноалмазы-антибиотик-хитозан на поверхности материалов животного происхождения (коллагеновая матрица бычьего перикарда, свиная аорта). Найдено, что полученные покрытия улучшают механико-прочностные характеристики материала и сохраняются длительное время.
3. Показаны антимикробные свойства покрытий наноалмаз-антибиотик-хитозан по отношению к золотистому стафилококку. Сравнение антимикробных характеристик покрытий, содержащих исследуемые антибиотики, показало лучшие характеристики для покрытий с амикацином и левофлоксацином, чем в случае ванкомицина.
4. Разработана методика одновременного определения состава покрытия и его кальцинирования с использованием методов радиоактивных индикаторов и ИСП-АЭС соответственно. Это позволило в два раза уменьшить количество животных, задействованных в исследовании.
5. Показано, что содержащие наноалмазы покрытия устойчивы, в том числе в кровотоке, и не подвергаются сильному кальцинированию.
6. Совокупность полученных результатов, включая гистологическое исследование образцов свиной аорты показало, что отрицательно заряженные наноалмазы могут быть использованы в качестве отдельного покрытия для биоматериалов для изготовления протезов, в то время как положительно заряженные наноалмазы требуют адсорбции дополнительных лекарственных препаратов.

Публикации автора с соавторами по теме диссертации:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science, RSCI:

1. Chernysheva M.G., Tritium-Labeled Nanodiamonds as an Instrument to Analyze Bioprosthetic Valve Coatings: A Case of Using a Nanodiamond Containing Coating on a Pork Aorta / Chernysheva M.G., **Shen T.**, Badun G.A., Mikheev I.V.,

- Chaschin I.S., Tsygankov Y.M., Britikov D.V., Hugaev G.A., Bakuleva N.P. // *Molecules*. - 2024. - V. 29. - № 13. – P. 3078-3090. DOI: 10.3390/molecules29133078 (WoS, JIF 4.2, **Q1**, 1.5 п.л./11%)
2. Chernysheva M.G., Nanodiamond–drug conjugates for coating xenogenic heart valve prostheses / Chernysheva M.G., **Shen T.**, Chaschin I.S., Badun G.A., Vasil’ev V.G., Mikheev I.V., Bakuleva N.P. // *Mendeleev Communications*. - 2024. - V. 34. - № 1. - P. 104–106. DOI: 10.1016/j.mencom.2024.01.031 (WoS, JIF 1.8, **Q3**, 0.25 п.л./25%)
3. **Шэнь Т.**, Получение меченного тритием ванкомицина и исследование его адсорбции на нанодиамазах / Шэнь Т., Чернышева М.Г., Бадун Г.А. // *Радиохимия*. - 2023. - Т. 65. - № 6. - С. 575–583. (РИНЦ, ИФ 0.739, 1.125 п.л./33%). **Shen, T.** Vancomycin and studying its adsorption on nanodiamonds / Shen T., Chernysheva M.G. Badun G.A. Tritium Labeling. // *Radiochemistry*. - 2023. - V.65. - P. 690–698. DOI: 10.1134/S1066362223060103 (Scopus, SJR 0.9, **Q3**, 1.125 п.л./33%)
4. Chernysheva M.G., Novel nanodiamond coatings for durable xenogenic heart valve prostheses: Mechanical properties and in vivo stability / Chernysheva M.G., Chaschin I.S., Badun G.A., Vasil’ev V.G., Mikheev I. V., **Shen T.**, Sinolits M.A., Bakuleva N.P. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. - 2023. - V. 656 - № PA. – Art#. 130373. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2022.130373 (WoS, JIF 4.9, **Q2**, 1 п.л./20%)
5. **Shen T.**, Levofloxacin and Amikacin Adsorption on Nanodiamonds: Mechanism and Application Prospects / Shen T. Chernysheva M.G., Badun G.A., Popov A.G., Egorov A.V., Anuchina N.M., Chaschin I.S., Bakuleva N.P. // *Colloids and Interfaces*. - 2022. - V. 6. - № 2. - P. 1–15. DOI: 10.3390/colloids6020035 (WoS, JIF 2.5, **Q2**, 2 п.л./20%)

Список цитируемой в автореферате литературы

1. Manji R.A., Lee W., Cooper D.K.C. Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future // *Int. J. Surg.* 2015. Vol. 23, № PB.
2. Manji R.A. et al. Porcine bioprosthetic heart valves: The next generation // *Am. Heart J.* 2012. Vol. 164, № 2. P. 177–185.
3. Xu J., Chow E.K.-H. Biomedical applications of nanodiamonds: From drug-delivery to diagnostics // *SLAS Technol.* 2023. Vol. 28, № 4. P. 214–222.
4. Chernysheva M.G. et al. Chitosan-nanodiamond composites for improving heart valve biological prostheses materials: preparation and mechanical trial // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2019. V. 28. №4. P. 256–261.
5. Chernysheva M.G. et al. Reduction of cytotoxicity of myramistin by adsorption on nanodiamonds // *Mendeleev Communications*. 2017. V. 27. № 4. P. 421–423.
6. Schäfer M. et al. Crystal structure of vancomycin // *Structure* 1996. V. 4. № 12. P. 1509-1515

7. Gallyamov M.O. et al. Chitosan coatings with enhanced biostability in vivo // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2018. Vol. 106, № 1. P. 270–277.
8. Chaschin I.S. et al. Collagen tissue treated with chitosan solution in H₂O/CO₂ mixtures: Influence of clathrates hydrates on the structure and mechanical properties // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2017. Vol. 67. P. 10–18.
9. G.A. Badun et al. Adsorption of alkyltrimethylammonium bromides on nanodiamonds // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2020. Vol. 28. P. 361–367
10. Chatterjee A. et al. Antibacterial effect of ultrafine nanodiamond against gram-negative bacteria *Escherichia coli* // *J. Biomed. Opt. SPIE*, 2014. Vol. 20, № 5. P. 51014