

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., доцент Чернышева М.Г.

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ СВОЙСТВ И ПРИМЕНЕНИЙ НАНОАЛМАЗОВ ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1. Получение наноалмазов детонационного синтеза	13
1.2. Физические и химические характеристики наноалмазов детонационного синтеза.....	18
1.3. Актуальные и перспективные области применения наноалмазов	26
ГЛАВА 2. РАДИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ НАНОАЛМАЗОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	34
2.1. Получение меченных тритием соединений методом термической активация трития.....	34
2.2. Регистрация β -излучения меченых тритием соединений методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии (ЖСС).....	39
2.3. Применения меченых тритием соединений.....	53
ГЛАВА 3. МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ НАНОАЛМАЗОВ В КОМБИНАЦИИ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	55
3.1. Методы модификации поверхности наноалмазов	55
3.2. Нековалентная модификация поверхности наноалмазов.....	58
3.3. Ковалентная модификация поверхности наноалмазов.....	59
ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И ОБЩИЕ МЕТОДИКИ ЭКСПЕРЕМЕНТОВ .	62
4.1. Материалы.....	62
4.1.1. Антибиотики	62

4.1.2.	Хитозан	62
4.1.3.	Наноалмазы	63
4.1.4.	Коллагеновые матрицы бычьего перикарда и свиная аорта	63
4.1.5.	Другие материалы	63
4.2.	Общие методики анализа веществ и получения меченых соединений.....	64
4.2.1.	Измерение радиоактивности растворов и суспензий	64
4.2.2.	Анализ наноалмазов	64
4.2.3.	Получение меченных тритием веществ с помощью метода	65
4.2.4.	Анализ и очистка меченных тритием антибиотиков.....	66
4.3.	Применение меченных тритием антибиотиков при получении адсорбционных комплексов с наноалмазами.....	67
4.3.1.	Изучение адсорбции антибиотиков на наноалмазах	68
4.3.2.	Изучение десорбции антибиотиков с поверхности наноалмазов	69
4.4.	Получение и характеристика наноалмазных покрытий коллагеновой матрицы	69
4.4.1.	Методика получения наноалмазных покрытий.....	69
4.4.2.	Изучение механико-прочностных характеристик коллагеновых матриц	70
4.4.3.	Изучение антимикробных характеристик коллагеновых матриц	70
4.4.4.	Нанесение хитозанового покрытия на биологические материалы	70
4.4.5.	Изучение in vivo устойчивости наноалмазных покрытий....	71
4.4.6.	Определение состава наноалмазных покрытий после эксплуатации животными	71
4.4.7.	Определение кальцинирования образцов после эксплуатации животными.....	72

ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АДСОРБЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ НАНОАЛМАЗЫ-АНТИБИОТИКИ.....	74
5.1. Наноалмазы-амикацин	74
5.2. Наноалмазы-левофлоксацин	81
5.3. Наноалмазы-ванкомицин	86
5.3.1. Получение меченного тритием ванкомицина с помощью метода термической активации трития	87
5.3.2. Получение и анализ адсорбционных комплексов наноалмазов с ванкомицином	89
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИЦ С НАНОАЛМАЗНЫМ ПОКРЫТИЕМ	100
6.1. Определение количества наноалмазов в покрытии	100
6.2. Механические свойства материалов с покрытием наноалмазы-хитозан	102
6.3. Механические свойства материалов с покрытием наноалмазы-антибиотик-хитозан	104
ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ <i>IN VIVO</i> ПОКРЫТИЙ КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИЦ И ИХ КАЛЬЦИНИРОВАНИЯ В ПРОЦЕССЕ ЭКСПЛУАТАЦИИ	110
ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ НАНОАЛМАЗНЫХ ПОКРЫТИЙ В КРОВОТОКЕ	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

ВВЕДЕНИЕ

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 обычно получают из животных источников, например, 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 [2]. Материал, полученный из животного, должен быть тщательно очищен и подготовлен перед имплантацией. При этом ткань модифицируется таким образом, чтобы полученный материал протеза был максимально близок к естественному. В этом случае организм не распознает ее как чужеродную, материал не кальцифицируется и протез имеет максимально длительный срок службы [3]. На сегодняшний день существуют и успешно применяются на практике методы химической стабилизации биоматериала и устранения видоспецифичности, способной приводить к иммунному ответу организма человека. Для обеспечения долгосрочной работы протеза поверхность материала должна быть устойчивой к отложению

малорастворимых солей кальция и подавлять развитие бактериальных инфекций. 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 лекарственными веществами, что делает их перспективным материалом для создания покрытий биоматериала протезов для сердечно-сосудистой хирургии [4–6].

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. 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 многокомпонентных 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. 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 метод радиоактивных

индикаторов с применением меченных тритием соединений. На кафедре радиохимии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова на протяжении многих лет активно применяется метод термической активации трития для введения радиоактивной метки в различные вещества. Одним из достижений последних лет является введение трития в углеродные наноматериалы без существенной модификации поверхности. 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 радионуклидная диагностика антимикробных покрытий, улучшающих свойства материалов животного происхождения, 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 а поверхности коллагеновых матриц и свиной аорты;
- 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 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 спектрометрии 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 экспериментально показано, что при введении трития в наноалмазы тритиевая метка остается в СН-положении и не вступает в обменные процессы даже при кипячении в концентрированной азотной кислоте.

Впервые получены и охарактеризованы адсорбционные комплексы наноалмазов с левофлоксацином и ванкомицином. Проведено сравнение механизма образования комплекса наноалмазов с амикацином и левофлоксацином. Изучена кинетика образования комплекса с ванкомицином.

Впервые показано влияние заряда и количества наноалмазов на механико-прочностные характеристики коллагенового материал 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 адсорбционного комплекса наноалмазы-антибиотик.

Теоретическая и практическая значимость.

Получены, количественно охарактеризованы и предложены механизмы образования адсорбционных комплексов детонационных наноалмазов с антибиотиками широкого спектра действия: амикацином (аминогликозид III поколения), левофлоксацином (фторхинол III поколения) и ванкомицином (трициклический гликопептид). Показана антимикробная активность полученных комплексов, что позволило применить 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 меченому тритием компоненту и количества металлов, в частности, кальция.

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 Нанюуглерод 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ СВОЙСТВ И ПРИМЕНЕНИЙ НАНОАЛМАЗОВ ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Наноалмаз – новый материал с огромным потенциалом применения. Элементарная структура наноалмаза состоит из sp^3 -гибридизированных атомов углерода, связанных друг с другом. Первичный кристалл наноалмаза по своей микроструктуре представляет собой квазисферическую частицу. Для наноалмазов с разными диаметрами приняты следующие названия: наноалмазы диаметром 2-10 нм - «ультрадисперсные алмазы» (УДА, UDD, «ultradispersed diamonds»), а диаметром 10-50 нм - «монодисперсные алмазы» (МДА, SDND, «single-digit diamonds»), алмазы с диаметром частиц менее 100 нм также называются ультратонкими алмазами (УТА, UFD, «ultrafine diamonds»). В международной литературе наноалмазы, полученные детонационным способом принято называть «детонационными наноалмазами» (ДНА, ND, «detonation nanodiamonds»).

Производство наноалмазов, особенно его применение, в последние годы является горячей темой исследований ученых из разных стран. Наноалмаз был разработан более 60 лет назад [7], В начале 1960-х годов в СССР группа под руководством академика Е.И. Забабахина [8] обнаружил мельчайшие примеси алмаза в продуктах ударного сжатия графита и сажи и представил полный набор научно-технических результатов по получению алмазов диаметром порядка нанометров. Так впервые были получены наноалмазы. Однако, ввиду ограничений требованиями научно-технической секретности наноалмазы стали изучаться только в 1988 году [9]. В том же году Грейнер Н.Р. и другие совместно опубликовали аналогичные результаты научных исследований, которые получили широкое цитирование и отметили, что наноалмазы официально стали передовым рубежом современной науки [10]. Развитие технологии

производства привело к большому объему исследовательских работ по наноалмазам, но его применение было ограничено областью поликристаллических материалов, полирующих средств и других абразивов [11]. Наноалмаз имеет уникальные механические, фотоэлектрические, термические и магнитные свойства и широко используется в машиностроении, электронике, химической инженерии и, потенциально может использоваться в медицине.

1.1. Получение наноалмазов детонационного синтеза

Поскольку природные алмазы очень редки и ценны, они не могут удовлетворить растущий промышленный спрос. Благодаря непрерывным усилиям годовой объем производства искусственных алмазов, полученных с помощью зрелой технологии синтеза, намного превысил объем производства природных алмазов. В настоящее время в промышленности алмазы с высокими твердыми свойствами используются в основном в качестве абразивов и сверхтвердых материалов. Большинство из них применяется в шлифовальных инструментах, режущих инструментах, сверлильных, режущих, полирующих и других инструментальных материалах. твердость, алмаз, другие свойства, такие как свет, электричество, катализ, смазка и биосовместимость, также очень превосходны, что делает его очень подходящим для использования в функциональных материалах.

Существует три основных метода синтеза искусственных наноалмазов: (1) каталитический метод синтеза, который используют для синтеза монокристалла алмаза при сверхвысоком давлении и высокой температуре [12,13]; (2) химическое осаждение из газовой фазы (CVD) применяют для получения наноалмазов высокой чистоты [14,15]; (3) детонационный (взрывной) метод, который используется для синтеза наноразмерного ультрамелкого алмазного порошка. Крупнозернистые монокристаллы, крупнозернистые, наноразмерные ультрамелкие порошки и т. д. являются

наиболее перспективными формами материалов при применении алмаза в качестве функционального материала и представляют текущую тенденцию развития. В этой работе мы фокусируемся на наноалмазах, синтезированных взрывным способом, и вся дополнительная информация будет конкретно связана с ними.

В 1980-е годы советские учёные Г.В. Сакович, А.М. Ставер и В.М. Титов внесли выдающийся вклад в получение и разработку наноалмазов и сформировали систему получения с использованием углеродсодержащего взрывчатого вещества [16,17]. В 1992 году китайский ученый Сюй К. и другие также начали исследовательскую работу по получению, разделению, диспергированию и применению наноалмазов [18].

Поиск лучшего способа синтеза наноалмазов отнимает у ученых много времени и энергии. На синтез наноалмазов влияют три основных фактора [19]:

(1) Подбор синтетического сырья. Советские ученые провели десятки экспериментов по взрыву смесей и основных взрывчатых веществах и получили наноалмазы. При прочих равных условиях количество образующегося алмаза зависит от особенностей исходных веществ взрывной смеси. Когда в молекулярной структуре присутствуют активные центры, соотношение алмаза и конденсированного углерода увеличивается. Для достижения наилучшего эффекта исходное сырье должно отвечать двум условиям: позволять получение достаточно свободного углерода при разложении, а также молекулярная структура должна иметь активные атомные группы.

(2) Форма загрузки взрывчатого вещества. Форма загрузки взрывчатого вещества определяют однородность протекания реакции. Китайские ученые Ло Лицунь и др. [20] использовали таблетки разного диаметра и веса для детонации с поверхности и центра. Исследования показали, что гранулометрический состав наноалмазов не имеет отношения

с размером таблетки, но выход алмазов у взрывных столбов с удлинением более 1,4 выше, чем у других форм.

(3) Теплоемкость защитной среды и контейнерной среды. Важными условиями сохранения кристаллической формы при расширении продуктов детонации являются: быстрое охлаждение, выдерживание давления и защита. Из диаграммы состояния углерода на рисунке 1 видно, что путь 1 имеет более длительный опыт работы в зоне стабильности алмаза и меньшую графитизацию, тогда как путь 2 имеет более высокую температуру при входе в зону стабильности графита и склонен к графитизации; Причем давление на пути 2 очень быстро снижается. Образующиеся трехмерные кристаллы углерода разрушаются из-за быстрого сброса давления в процессе рассеяния продуктов детонации, а квазикристаллы на поверхности преобразуются в хрупкие структуры и становятся хрупкими, рыхлыми конструкциями. Видно, что расширение продукта может привести к графитизации алмаза, снижению выхода, агломерации частиц, поверхностным дефектам и т. д., которые связаны с защитной средой и объемом расширения.

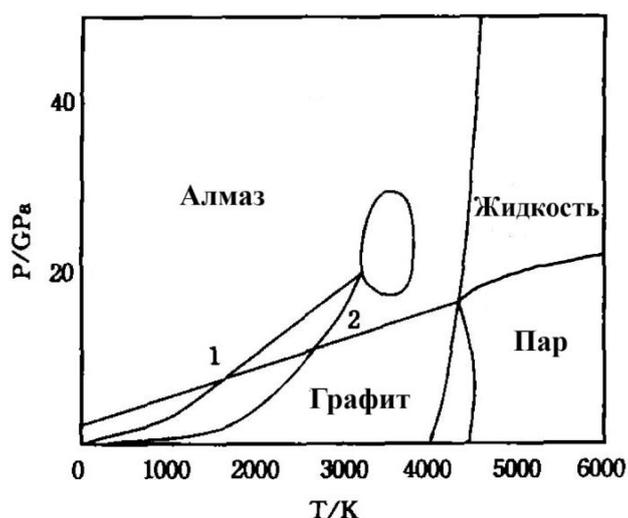


Рисунок. 1. Отражение различных путей расширения продуктов детонации на фазовой диаграмме давление-температура углерода [21]. Цифрами отмечены пути реакции (см. текст).

Дополнительные эксперименты сосредоточены на заполнении заряда инертными газами CO, CO₂ и N₂. Его осуществляют с внешней конденсационной средой - водой, льдом и т. д., а при использовании инертных газов, таких как аргон и гелий, или при взрыве в вакууме алмаз практически не образуется. Теплоемкость внешней среды, способ теплопередачи между продуктом детонации и средой, скорость теплопроводности, эффективная масса теплопоглощающей среды и др. определяют скорость охлаждения алмаза в зоне графитовой фазы, а таким образом определяют степень графитации. Удельная теплоемкость воды выше, чем у инертного газа и солевых сред. При расширении продукта детонации образуются пульсирующие пузырьки, которые лучше контактируют с водой и обладают хорошим охлаждающим эффектом, поэтому выход алмазов является самым высоким.

Что касается механизма образования алмаза, то обычно считается, что при достаточно высоком давлении и температуре молекулы органических взрывчатых веществ могут полностью диссоциировать на атомы углерода или атомные группы, а также соединяться друг с другом под высоким давлением с образованием алмазных зерен. Поскольку продолжительность воздействия продуктов детонации под высоким давлением очень мала, а диффузия материалов под высоким давлением затруднена, алмазные зерна не могут вырасти в крупные цельные зерна. Поскольку такие алмазные частицы производятся из атомов углерода, они имеют тенденцию образовывать сферические частицы, чтобы поддерживать низкую поверхностную энергию. В таких условиях частицы размером около 5 нм имеют наименьшую поверхностную энергию и, следовательно, являются наиболее стабильными [22,23]. Однако наночастицы могут легко агломерироваться вместе, образуя частицы размером в несколько сотен нанометров, а поскольку частицы алмаза случайным образом сталкиваются

друг с другом и связываются друг с другом, образующиеся частицы имеют фрактальную структуру, образуя рыхлые и пористые частицы.

Конкретный эксперимент детонационного синтеза наноалмазов заключается в сочетании тринитротолуола с гексогеном (1,3,5-тринитро-1,3,5-триазациклогексан) или октогеном (1,3,5,7-тетранитро-1,3,5,7-тетраазациклооктан). Взрыв проводят в специальной камере из нержавеющей стали в бескислородной атмосфере. Непосредственно в ударной волне давление достигает 20-30 ГПа, температура — 3000–4000 К [24]. В течение нескольких наносекунд благодаря термодинамическим факторам образовавшийся серый порошок наноалмаза становится более стабильным, чем аморфный или другие виды углерода [25]. Во время детонации, поскольку кислорода в молекулах взрывчатого вещества недостаточно для окисления всего углерода в СО или СО₂, в зоне детонации имеется свободный углерод. Под действием высокого давления и высокой температуры в зоне детонации этот свободный углерод может образовываться, частично конвертироваться в алмаз. Теоретические расчеты показали, что оптимальными условиями для получения наноалмазов являются относительно высокие давления и низкие температуры продуктов детонации в точке Чепмена-Жуге [26].

Таким образом, чтобы увеличить количество получаемых наноалмазов, необходимо подобрать подходящий теплоноситель: инертный газ (СО, N₂, СО₂), воду или лед, чтобы обеспечить оптимальную скорость охлаждения 3000-4000 К·мин⁻¹. После взрыва может собираться черный твердый продукт, который помимо алмазного порошка (4-20 мас.%) состоит в основном из графита и аморфного углерода. Частицы первичных наноалмазов имеют средний диаметр 4-5 нм, при этом большинство диаметров находится в диапазоне от 2-20 нм [27,28]. Полученную твердую смесь обрабатывают сильной окислительной кислотой (для этого используют смеси на основе НСlO₄, НNO₃, оксидов азота, Н₂O₂, O₃, CrO₃,

$K_2Cr_2O_7$, и так далее), которая удаляет неалмазный углерод и дает серый порошок.

Спектр рентгеновской дифракции (XRD) имеет только дифракционные пики, которые можно отнести к кристаллическим плоскостям алмаза (111), (002) и (310), что указывает на то, что этот продукт представляет собой алмаз с чистотой более 95%. Самый высокий выход алмазов, о котором сообщается в литературе, составляет от 8% до 10% (в зависимости от количества использованной взрывчатки). Результаты просвечивающей электронной микроскопии показывают, что основными частицами этого алмазного порошка являются сферические частицы диаметром от 5 до 15 нм, однако большая часть из них агрегирована в частицы субмикронного или микронного размера. Результаты элементного анализа: углерод-85%, водород-1%, азот-2%, кислород-10%. Это указывает на то, что это алмазоид, содержащий значительное количество кислородсодержащих функциональных групп. Результаты инфракрасной спектроскопии также подтвердили это [29,30].

1.2. Физические и химические характеристики наноалмазов детонационного синтеза

Детонационный наноалмаз – это сложное вещество, которое необходимо охарактеризовать, контролируя различные параметры и разрабатывая методы их измерения. Существует множество физических свойств. Наиболее используемые учеными спектральные методы: инфракрасная спектроскопия (ИК) и ультрафиолетово-видимая спектроскопия (УФ), рамановская спектроскопия; флуориметрия, ядерный магнитный резонанс (ЯМР); электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), Рентгеновская дифрактометрия, атомная спектроскопия: рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС), атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС), атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС), динамическое светорассеяние (ДСР), малоугловое рассеяние нейтронов

(МУРН), метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и термолинзовая микроспектрометрия (ТЛМ). Также используются анализ ζ -потенциала, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), метод Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ), метод Барретта-Джойнера-Халенда (БДХ), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), термогравиметрический анализ (ТГА) и масс-спектрометрия (МС).

На рисунке 2 ниже схематически показаны различные используемые методы и информация, которую они предоставляют о структурных слоях наноалмаза. Подавляющее большинство исследовательских испытаний проведено на порошках наноалмазов, меньшая часть — на суспензиях. Как и любой наноразмерный сверхтонкий порошок, наноалмаз состоит из агрегатов микронного размера. Высокая поверхностная энергия отдельных частиц делает систему термодинамически нестабильной, что приводит к агрегации. В водных суспензиях размер агрегатов наноалмазов составляет от десятков нанометров до десятков микрометров в зависимости от pH раствора и типа электролита [31,32]. Размер агрегатов в высушенном порошке составляет порядка сотен нанометров. Следовательно, для изучения наноалмазов можно использовать методы, позволяющие охарактеризовать все нанокластеры.

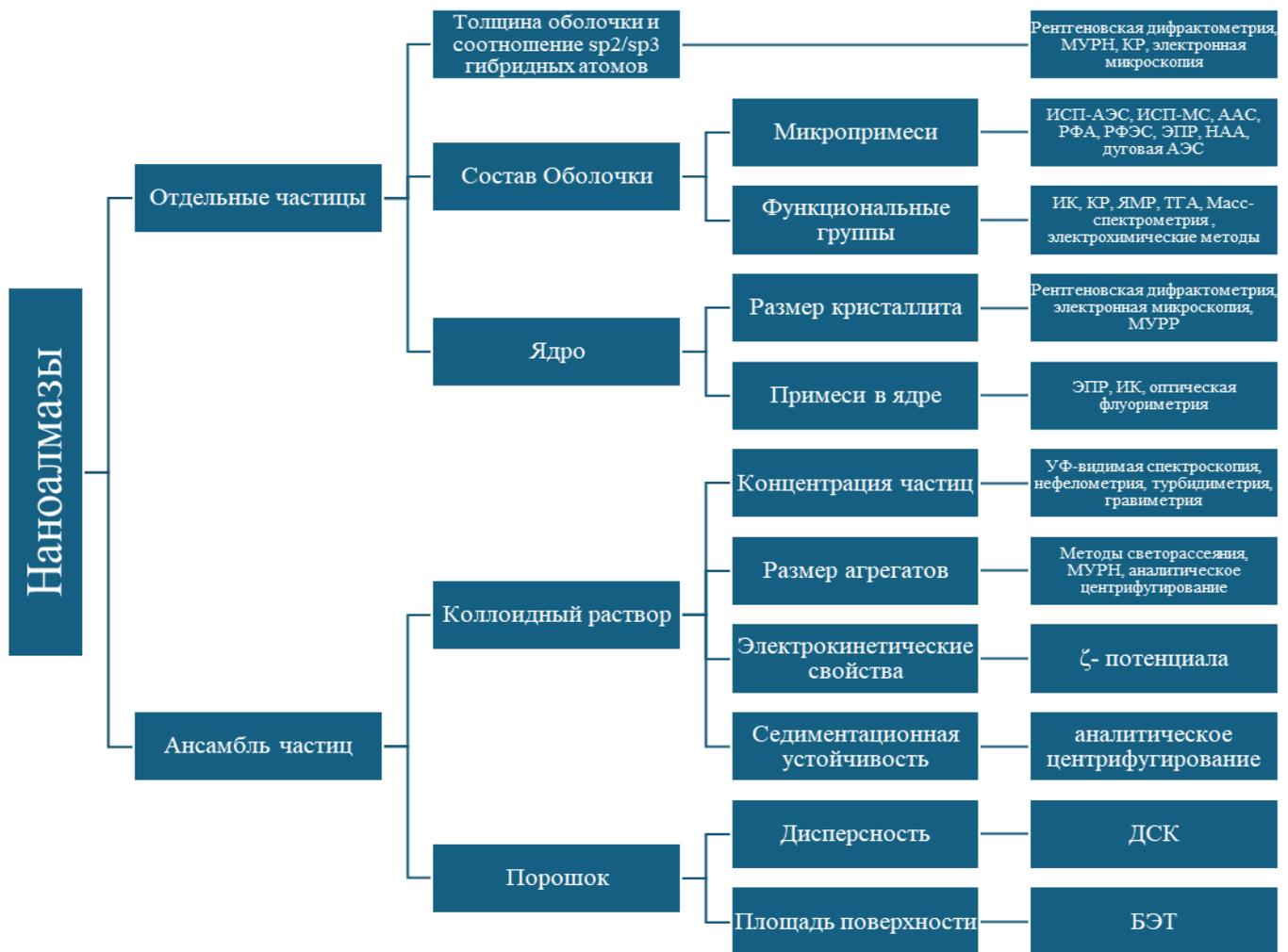


Рисунок. 2. Схема методов характеристик наноалмаза детонационного синтеза.
 (1) Структура и строение наноалмазной частицы.

На основе структурных исследований дифракции рентгеновских лучей и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей предложена разумная структурная модель наноалмаза. Основные компоненты наноалмазной частицы – кристаллическое алмазное ядро, размер составляет от нескольких нанометров до десятков нанометров [33] и поверхностные слои содержащие аморфный углерод толщиной 3-4 атомных слоя [34].

Рамановские спектры не показывают расширенного графитового содержания; любой присутствующий sp^2 -углерод локализован и связан со специфическими дефектами поверхности [35,36].

Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) показал, что алмазные кластеры содержат 85-87% углерода, 0.1–2.5% азота, 0.5–2.5% водорода, 0.5–8% несгораемого остатка, до 10% кислорода. Углерод находится в виде алмазной (90-97%) и неалмазной (3-10%) форм [37–39]. Все кислородные и водородные атомы сосредоточены на поверхности частиц. Азот входит в состав нитро–групп, амидных групп, а также внедряется в саму структуру алмаза [40,41].

Таким образом, видно, что поверхностные функциональные группы составляют около 10% всех наноалмазов, а поверхностные атомы углерода каждой частицы наноалмаза образуют связи как минимум с одним гетероатомом (H, O, N). Поэтому алмазное ядро каждой частицы покрыто плотной оболочкой из функциональных групп.

(2) Изучения поверхности наноалмазов.

Поверхностные группы наноалмаза служат отправной точкой для направленной функционализации его поверхности. Но в отличие от макроскопического алмаза, в частицах наноалмазов влияние структуры поверхности на физико-химические свойства становится определяющим из-за высокого отношения числа атомов углерода на поверхности к числу атомов в объеме. Это важно для различных новых приложений, таких как биомедицина.

ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье показывает, что поверхность наноалмазов заканчивается кислородсодержащими фрагментами, в основн была впервые использована для изучения функциональных групп на поверхности наноалмазов. Благодаря простоте эксплуатации и анализа она до сих пор остается наиболее распространенным методом изучения структуры его поверхности. В чистом природном алмазе в инфракрасной области наблюдается только

двухфононное поглощение (широкая полоса около 2000 см^{-1}), но наличие примесей, таких как азот или дефекты решетки, приводит к запрещенным однофононным колебаниям в инфракрасной области. Диапазон $2500\text{--}1100\text{ см}^{-1}$. К сожалению, большинство пиков ИК-спектров наноалмазов находится в области отпечатков пальцев ($2000\text{--}700\text{ см}^{-1}$), в которой возможно поглощение практически любых групп. Это создает трудности при анализе.

ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье показывает, что поверхность наноалмазов заканчивается кислородсодержащими фрагментами, в основном в более высоких степенях окисления (например, C=O) [42]. В работе впервые проведено квантово-химическое моделирование внутреннего строения и поверхностных групп наноалмазной частицы на основе теории функционала плотности [43].

Изменяя состав групп, можно полностью изменить свойства наноалмаза, изменив поверхность наноалмаза с гидрофильной на гидрофобную, что позволяет получать стабильные коллоидные растворы в любой желаемой среде [44,45]. В зависимости от состава групп и условий окружающей среды изменяются также их поверхностные электрические и электрохимические свойства [46]. Может адсорбироваться или реагировать с различными молекулами. Изучается возможность использования наноалмазов в качестве сорбентов в хроматографии [47].

(3) Формирование и стабильность коллоидно-дисперсионной системы наноалмазов.

Интересным свойством наноалмаза, отличающим его от макроскопических и микроскопических кристаллов алмаза, является способность образовывать коллоидные системы. В последнее десятилетие большой объем исследовательских работ был направлен на получение наноалмазных порошков или коллоидных растворов с возможно более

мелкими и однородными частицами (в идеале диаметром частиц 4-5 нм) с максимально узким распределением размеров.

В коллоидных растворах нанодиазмы легко самоорганизуются образованием вторичных структур [48,49]. Силы Ван-дер-Ваальса и/или электростатические силы связывают первичные частицы вместе, агломерируют в растворах и образуют вторичные пористые структуры в гелях и порошках. Изменение размеров первичных агрегатов практически не происходит, поэтому наиболее очевидным способом добиться деполимеризации является разрушение всех агрегатов на первичные кристаллы (например, нагрев и поддержание температуры выше 1000°C). Однако полностью уничтожить все агрегаты очень сложно. Существует два основных метода решения проблемы агрегации нанодиазмов: физическое дезагрегирование и химическое дезагрегирование.

Физические методы (смеси нанодиазмов с твердыми частицами, например, длительное измельчение микросфер ZrO_2) или ультразвук или облучение [50,51]. Химические методы работают за счет окисления одинарной углерод-углеродной связи между sp^2 -оболочкой и первичным кристаллом с последующей стабилизацией частиц с помощью сильных окисляющих кислот или нагреванием при высоких температурах на воздухе [52].

Важнейшим свойством коллоидных растворов нанодиазмов для медицинского применения является их стабильность (устойчивость). Стабильность коллоидов нанодиазмов зависит от нескольких факторов: размер и плотность частиц дисперсной фазы, способность участвовать в броуновском движении; вязкость и плотность дисперсионной среды. При постоянстве дисперсионной среды, наибольшее значение играет размер частиц, поэтому золи (с размерами частиц 100 нм) как правило, седиментационно устойчивы, а суспензии (с размером частиц более 1 мкм) седиментационно неустойчивы.

Стабильность гарантируется двумя основными факторами: электростатический и адсорбционно-сольватный. Адсорбционно-сольватный барьер защиты определяется наличием на поверхности противоионов диффузного слоя гидратных оболочек ориентированных диполей воды с большой плотностью, вязкостью и упругостью. Электростатический фактор защиты обусловлен наличием двойного электрического слоя на поверхности частиц дисперсной фазы и определяется величиной ζ -потенциала (создает электростатические силы отталкивания) и, таким образом, ζ -потенциал может служить мерой агрегативной устойчивости. Тогда в зависимости от значения ζ -потенциала можно условно оценить агрегативную устойчивость коллоидной системы (табл. 1) [53].

Таблица 1. Стабильность коллоидных растворов зависимости от величины ζ -потенциала. [54]

ζ-потенциал, мВ	Стабильность коллоидного раствора
от 0 до ± 5 ,	Быстрая коагуляция
от ± 10 до ± 30	Низкая стабильность
от ± 30 до ± 40	Умеренная стабильность
от ± 40 до ± 60	Высокая стабильность
Более ± 61	Превосходная стабильность

(4) Адсорбционные свойства наноалмазов. Адсорбция на наноалмазе - это процесс массопереноса, при котором адсорбенты накапливаются на поверхности наноалмаза на границе раздела под действием физических сил (силы электрического поля, силы Ван-дер-Ваальса) или слабых химических сил (водородная связь, ионная связь). Адсорбция растворенных веществ наноалмазами обусловлена движущей силой, создаваемой лиофобными свойствами растворенного вещества или высоким сродством твердого

вещества к растворенному веществу. Процесс адсорбции зависит от равновесия твердого тела и жидкости, и скорости массопереноса.

Термодинамические исследования являются мощным инструментом для определения природы и возможности реакций адсорбции, а также изучения управления механизмами адсорбции при изменении температуры раствора. Изотерму адсорбции получают с помощью термодинамических экспериментов, при этом можно получить такую информацию, как максимальная адсорбционная емкость адсорбента, механизм адсорбции и поверхностные свойства адсорбента.

Процесс адсорбции зависит от равновесия твердого тела и жидкости и скорости массопереноса. Адсорбционные операции могут быть периодическими, полупериодическими и непрерывными. В ходе этого процесса изменений достигается состояние равновесия, когда концентрации адсорбатов в твердой фазе, растворе или газе становятся постоянными. В этом равновесном состоянии соотношение между количеством адсорбции твердой фазы и количеством адсорбции твердой фазы в растворе называется изотермой адсорбции.

Общие модели адсорбции включают модель Ленгмюра [55,56], модель Фрейндлиха [57], модель Дубинина-Радушкевича [58], модель Темкина [59], модель Сипса [60], модель Тота [61], модель Редлиха-Петерсона [62], модель Радке-Праусница [63] и т. д. Это различные хорошо известные модели, используемые для объяснения эффектов исследований адсорбции, но различия в методах невелики. Конкретные формулы приведены в табл. 2.

Таблица 2. Модели изотермы и уравнение изотермы.

Модели изотермы	Уравнение изотермы
модель Ленгмюра	$\Gamma = \frac{\Gamma_m b C_e}{1 + b C_e}$
модель Фрейндлиха	$\Gamma = K C_e^{\frac{1}{n}}$
модель Дубинина- Радушкевича	$\Gamma = \Gamma_D e^{-2B_D R T \ln\left(1 + \frac{1}{C_e}\right)}$
модель Темкина	$\Gamma = \frac{RT}{b} \ln(a C_e)$
модель Сипса	$\Gamma = \frac{b r C_e}{b + r C_e^{n-1}}$
модель Тота	$\Gamma = \frac{q_m b C_e}{(C_s - C_e) \left[1 + (b - 1) \frac{C_e}{C_s}\right]}$
модель Редлиха-Петерсона	$\Gamma = \frac{a^n \sqrt{C_e}}{1 + b C_e^n}$
Модел Радке-Праусница	$\Gamma = \frac{\Gamma_m b C_e}{(1 + b C_e)^n}$

Среди них наиболее часто используемыми изотермами адсорбции являются модель Ленгмюра и модель Фрейндлиха. В целом модель Ленгмюра хорошо описывает поведение адсорбции малых молекул, доказывая, что адсорбция ограничивается однослойным покрытием и что все центры адсорбции одинаковы и равны по энергии. Модель Фрейндлиха — это эмпирическая формула, которая широко используется при адсорбции растворов. Кроме того, если средняя свободная энергия (E), полученная на основе подбора модели Дубинина-Радушкевича, превышает 8 кДж/моль, это указывает на то, что процесс адсорбции в основном включает механизм химической адсорбции[58].

1.3. Актуальные и перспективные области применения наноалмазов

Наноалмаз обладает как высокой твердостью и стабильностью алмаза, так и особыми свойствами на наноуровне. Поэтому наноалмазы в основном имеют следующие конкретные применения.

(1) Применение в шлифовальных и полирующих материалах.

В некоторых статьях и патентах [64,65] сообщается, что шлифовальные жидкости или шлифовальные блоки, изготовленные из такого типа алмазного порошка, дали хорошие результаты и обеспечили высокую гладкость. В том числе и производство чрезвычайно требовательных рентгеновских зеркал. Другие использовали этот алмазный порошок и углеродсодержащие материалы для изготовления композиционных материалов, которые можно использовать в качестве высокоточных шлифовальных материалов [39,66]. Харбинский технологический институт использовал магнитную жидкость, приготовленную с этим алмазным порошком, для шлифования керамических шариков, достигая чрезвычайно низкой шероховатости поверхности ($0.01 \mu\text{m}$) и чрезвычайно высокой гладкости [67].

(2) Применение в качестве присадки к смазочным материалам.

В литературе [68] отмечается, что смазывающие и противоизносные свойства смазочных масел с добавлением алмаза значительно улучшаются, и были проведены испытания на двигателях с хорошими результатами. Мы также провели некоторые исследования по этому поводу и обнаружили, что при добавлении алмазного порошка в парафиновое масло износ в процессе трения значительно снижается. В литературе также отмечается, что разница между статическим и динамическим коэффициентами трения смазочного масла с алмазным порошком значительно уменьшается, что является хорошим показателем для узлов трения, которые часто открываются и останавливаются [69,70]. Однако удельный вес алмазного порошка велик, при использовании в качестве смазочной добавки необходимо решить проблемы долгосрочной суспензии или стабильности геля, иначе трудно

получить практическое применение в производстве. Это может быть важной причиной большого количества алмазных порошков, используемых в качестве смазочных добавок.

(3) Применение в химической промышленности.

Наноалмазы можно использовать в качестве добавок для изготовления армированной резины, армированных пластиков и армированных смол. В настоящее время большинство добавок, используемых в резине, представляют собой наноразмерную углеродную сажу. Если использовать углеродсодержащий наноразмерный алмаз, синтезированный методом детонации, прочность можно увеличить в 1–4 раза, а его износостойкость и герметизирующие свойства можно значительно улучшить. Добавление наноалмаза позволяет также повысить устойчивость шин к разрыву (с 53 МПа до 154 МПа) повысить эластичность резиновых изделий в 2 раза и повысить износостойкость в 2-5 раз, добавлять его во фторкаучук для изготовления резиновых деталей двигателей, и добавить его к нитрилу. Изготовление уплотнительных колец на основе резины позволяет значительно улучшить эластичность при низких температурах. Добавление его к полимерам на основе эпоксидных смол позволяет повысить прочность соединения в 2-2,5 раза[71,72].

(4) Применение в катализе.

Наноалмаз имеет большую удельную поверхность. Состояние связей и электронное состояние на поверхности отличаются от таковых внутри частицы. Неполная координация атомов на поверхности приводит к увеличению количества активных центров на поверхности, что делает его более основными условиями для того, чтобы стать катализатором. Поверхность наноалмаза содержит различные поверхностные функциональные группы и очень активна. Использование его в качестве катализатора может повысить активность реакции и способствовать взаимодействию органических соединений[73,74].

Недавние исследования морфологии поверхности наночастиц показали, что по мере уменьшения размера частиц гладкость поверхности становится хуже, образуя неровные атомные ступеньки, что увеличивает поверхность контакта для химических реакций [75]. Некоторые люди предсказывают, что катализаторы из сверхмелкозернистых частиц, вероятно, будут играть важную роль в каталитических реакциях в 21 веке. Используя такие характеристики наноалмаза, как его большая удельная поверхность, высокая поверхностная энергия и высокая пористость, можно изготовить малообъемное и недорогое каталитическое устройство для замены исходного громоздкого и дорогого оборудования, а также использовать его в качестве экологически чистого устройства для хранения водорода в виде солнечных батарей.

(5) Применение в составе композиционных покрытий.

Благодаря уникальным свойствам наночастиц огромная площадь поверхности наноалмазов ($250\text{--}420\text{ м}^2/\text{г}$) также обеспечивает возможность получения композитов металлов и полимеров [76,77].

Композитное покрытие может эффективно улучшить прочность связи между покрытием и подложкой. Чем лучше дисперсия частиц в композитном покрытии, тем более очевиден упрочняющий эффект покрытия. Таким образом, наноалмаз не только обладает сверхтвердостью, высокой износостойкостью, термостойкостью и антикоррозионными свойствами алмаза, но также имеет большое количество функциональных групп, таких как гидроксильные, карбоксильные и карбонильные группы, на поверхности частиц, что имеет сильная сила сцепления с покрытой поверхностью. Дозировка небольшая, а производительность улучшается. Примечательно, что он очень подходит для композитного покрытия и может использоваться для покрытия металлических поверхностей, резины, пластика, стекла и других поверхностей. Если поверхность подложки диска с химическим покрытием Ti-P покрыть наноалмазным композитом, износ

можно снизить на 50%. Наноалмаз добавляется в раствор Со-Р химического нанесения, используемый для изготовления магнитных пленок для магнитных головок и накопителей магнитной памяти, для формирования композиционного покрытия, при этом его износостойкость увеличивается в 2-3 раза. Композитное покрытие наноалмазов, используемое для хромирования форм, позволяет продлить срок службы, сохранить точность и сделать покрытие гладким и без трещин. Теплопроводность алмаза намного выше, чем у золота и серебра. Наноалмазы, а также золото и серебро образуют композитное покрытие, которое может значительно повысить прочность, износостойкость и теплопроводность покрытия, сохраняя при этом хорошую электропроводность золота и серебра, а также может сделать материал электрических контактов более долговечным. Срок службы увеличивается более чем в 2 раза [78–80].

(6) Применение в стелс-технологии.

Поскольку размер наночастиц намного меньше длины волны инфракрасных и радиолокационных волн, коэффициент пропускания материалов наночастиц на эту длину волны намного сильнее, чем у обычных материалов, что значительно снижает отражательную способность волн, делая отражения, принимаемые инфракрасными детекторами, гораздо сильнее, чем у обычных материалов. и радаров. Сигнал становится очень слабым, за счет чего достигается стелс-эффект. С другой стороны, удельная поверхность наночастичных материалов на 3-4 порядка больше, чем у обычного крупнозернистого порошка, а скорость поглощения инфракрасного света; и электромагнитных волн также намного больше, чем у обычных материалов. Это значительно снижает интенсивность отраженных сигналов, получаемых инфракрасными детекторами и радаром, что затрудняет обнаружение обнаруженной цели и играет скрытую роль. Одним из требований к материалам для неба является легкий вес. В этом отношении у наноматериалов есть

преимущества. В частности, наноматериалы, состоящие из легких элементов, широко используются в авиационной малозаметности [81,82].

(7) Применение для создания биосенсоров.

Важным свойством наноалмазов является их стабильность и высокая биосовместимость, а также способность образовывать комплексы с биомолекулами (биоконъюгаты) [83], например, белки [84] и нуклеиновые кислоты [85,86] способны ковалентно [87] и нековалентно [88,89] связываться с модифицированными наноалмазами и сохранять свою активность. В сочетании с электрическими свойствами самого наноалмаза это может позволить использовать наноалмаз в качестве новых биосенсоров [90]. Придумали прототипы биочипов на основе комплексов наноалмаз-дезоксирибонуклеиновая кислота-бактериальная люцифераза [91].

(8) Применение в современной медицине.

Размер наночастиц, как правило, намного меньше, чем у эритроцитов и эритроцитов в живых организмах. Это обеспечивает новый исследовательский подход к биологическим исследованиям, то есть использование наночастиц для разделения клеток, их окрашивания и использования наночастиц для изготовления специальных лекарств или препаратов. Новые типы лекарств могут быть использованы для местного лечения. Исследования в этой области сейчас находятся в зачаточном состоянии, но имеют широкие перспективы применения [92,93].

Важный вопрос в данном контексте — биологическое действие наноалмазов [94]. Исследования последних лет показывают, что наноалмазы обладают низкой токсичностью для клеток млекопитающих (нейронов, фибробластов [95,96], легочного эпителия [97,98], клеток крови [99,100], тканей яичников китайского хомячка [101], других типов клеток [102–104]). Наноалмаз также обладает хорошей биосовместимостью и чрезвычайно высокой адсорбционной способностью. Он имеет большое количество свободных электронов (большое количество атомных доноров)

на поверхности, большое количество кислородсодержащих функциональных групп на поверхности. нанокристалл и размер частиц. Химическая инертность и гидрофильный характер поверхности важны для его возможного использования в терапевтических средствах. Наноалмазы могут быть использованы в диагностике и лечении онкологии [105], гастроэнтерологии [106], кардиологии [4], сосудистых заболеваний [6], заболеваний кожи [107] и т.д.

Метаболизм наноалмазов в живых организмах также является актуальным вопросом в современных исследованиях. Исследования *in vivo* на мышцах [108–110] показывают, что наноалмазы накапливаются в печени, легких, костях, селезенке и сердце, а затем медленно выводятся из организма. К сожалению, в настоящее время нет четких данных о токсическом действии наноалмазов на эти органы.

Наноалмазы проявляют определенную токсичность по отношению к болезнетворным вирусам, микроорганизмам и бактериям [111]. Благодаря высокой адсорбционной способности и другим уникальным характеристикам они прочно адсорбируются, являются активными адсорбентами, биологически снижают подвижность действующих веществ, являются средством резкого усиления лекарственных реагентов [112]. Применение наноалмазов способствует нормализации артериального давления. Кроме того, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, различных заболеваниях кожи, отравлениях внутренних органов применение наноалмазов эффективно [113] и наноалмаз является лучшим средством профилактики ожогов [114].

Применение наноалмазов в водных и масляных суспензиях благотворно влияет на усиление опухолевых лекарственных реагентов, а также оказывает эффект уменьшения и устранения боли, нормализации перистальтики кишечника, улучшения показателей крови, повышения

активности иммунной системы, устранения вирусов. из организма [115] и т. д.

Использование наноалмазов в сочетании с химической и лучевой терапией показывает большие перспективы. Его используют для предотвращения мутагенности эффективных препаратов при лечении злокачественных новообразований, а наноалмазы не снизят их эффективность. Он также может предотвратить возникновение мутаций, индуцированных в нормальных клетках и вторичных опухолях под действием противораковых агентов [116–118].

(9) Применение в качестве носителей лекарств.

Наноалмаз обладает адсорбционными свойствами, а его поверхность способна адсорбировать различные лекарственные препараты. На основе этой характеристики можно разработать систему доставки лекарств, направленную на поражение, с длительным терапевтическим эффектом. Эта система повышает эффективность препарата за счет пролонгации фармакологического эффекта и соответственно снижения дозы препарата [119–121].

В последние годы достигнут значительный прогресс в изучении адсорбции веществ наноалмазами. К поверхности наноалмаза могут быть привиты различные вещества включая антибиотики (амикацин, левофлоксацин [111], ванкомицин [112], дексаметазон [122] адриамицин [123]), биологические ферменты [124], инсулин [125], цитохромы [89], гормоны роста [126], а также вирусные антигены [127]. При этом способ пришивки может включать образование ковалентных связей, а также физическую адсорбцию.

ГЛАВА 2. РАДИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ НАНОАЛМАЗОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

2.1. Получение меченных тритием соединений методом термической активации трития

В конце 1940-х годов, благодаря появлению реакторов и ускорителей, было налажено крупномасштабное производство искусственных радионуклидов, что обеспечило условия для получения изотопно-меченных соединений. Крупномасштабное производство изотопов в СССР зародилось в 1950-х годах и было одной из первых стран в мире, начавших массовое производство и поставку изотопной продукции. Сейчас она превратилась в самостоятельную промышленную систему [128,129].

Использование изотопно-меченных соединений, содержащих радиоактивную метку, для отслеживания их поведения в сложных системах, легло в основу метода радиоактивных индикаторов, который характеризуется высокой чувствительностью и низким пределом обнаружения. Поэтому оно все еще занимает доминирующее положение в научных исследованиях.

Преимуществами использования трития являются длительный период полураспада (12,3 года), низкая энергия бета-частиц (максимальная энергия 18,6 кэВ, средняя энергия 6,5 кэВ) и высокая удельная активность получаемого препарата. Более длительный период полураспада позволяет проводить значительно более длительные эксперименты без необходимости внесения поправок на распад. Низкая энергия бета-частиц трития обеспечивает радиохимическую стабильность и позволяет проводить исследования без специальных мер радиационной защиты. Основными недостатками использования трития являются необходимость уделять внимание эффектам изотопов водорода, автордиоактивному разложению и стабильности меченных тритием соединений в экспериментальных условиях.

(1) Получение меченных тритием наноалмазов

Для получения меченных тритием соединений разработано большое число методов. Существуют разные способы их классификации в зависимости от приоритетов и предпочтений составителей. Все методы получения разделяются на 5 основных групп: химический синтез [130–132]; биохимический (ферментативный) синтез [133–135]; реакции изотопного обмена [136–138]; ядерно-химические способы получения меченых соединений [139]; физико-химических методы [112,139–143].

Одним из самых удобных способов генерации реакционных атомов трития является метод термической активации трития (ТАТ). Тритий может быть введена практически в любое соединение содержащие водорода с помощью метода термической активации трития [144]. Уникальное свойство водорода диссоциировать на атомы на горячей вольфрамовой нити впервые было отмечено Ленгмюром в 1912 году [74,145]. Он наблюдал атомизацию водорода на вольфрамовой проволоке, нагретой до температуры выше 1300 К при очень низком давлении газа от 0,13 до 2,6 Па. Затем активированные атомы водорода наблюдались даже при высоком давлении от 0,07 до 13,3 кПа [146]. Таким образом, сделан вывод, что при нагревании электрическим током до высоких температур (1500-2200 К) молекулы трития на вольфрамовой нити диссоциируют. Вольфрам выступает не только как поставщик энергии для диссоциации молекул водорода, но и как катализатор. При использовании изотопов водорода – дейтерия и трития также будет происходить их диссоциация на атомы.

Процесс образования атомарного водорода можно описать в терминах реакции:



Скорость генерации атомов v ($\text{мм}^3/\text{см}^2 \cdot \text{мин}$) можно описать уравнением, предложенным Ленгмюром:

$$v = 8,3 \times 10^5 \sqrt{kP} \cdot T^{\frac{1}{4}} \quad (2)$$

где k - константа равновесия реакции образования атомарного водорода, P - давление газа (Па).

Степень диссоциации водорода связана с температурой и давлением газа в системе соотношением:

$$\alpha = \sqrt{\frac{K_p}{(4p + K_p)}} \quad (3)$$

где p - давление газа в системе, а $\log K_p = -2,37 \times 10^4/T + 6,35$ [147].

Далее нам необходимо определить зависимость скорости образования атомов водорода от давления газа в системе. Водород сталкивается с вольфрамовой проволокой с определенной вероятностью столкновения $S(T)$, при этом возникает адсорбция или проходя через слабо связанное переходное состояние. S является функцией распределения падающих молекул H_2 по энергии и фракционного покрытия поверхности (θ). С поверхности вольфрамовой проволокой может десорбироваться в виде атомов H проходя через потенциальный барьер $E_{\text{w-H}}$, или в виде молекул H_2 проходя через низкий потенциальный барьером $E_{\text{w-H}_2}$. Следовательно, вероятность диссоциации ($P_{\text{дисс}}$) при столкновениях H_2 -металла определяется следующим уравнением:

$$P_{\text{дисс}} = S(T) \cdot f_{\text{H}/\text{H}_2} \quad (4)$$

где f_{H/H_2} - количество адсорбированного атомарного водорода, который десорбируется в виде H (без рекомбинации).

При температуре $T > 1200 \text{ K}$ водород десорбируется с поверхности металла преимущественно в виде атомов и $f_{\text{H}/\text{H}_2} \approx 1$. При этой

температуре десорбция атомарного водорода происходит очень быстро $\theta \ll 1$. С помощью измерения плотности паров (n_H) в реакторе была получена энергия диссоциации $E_{\text{дисс}} = 2,48$ эВ и $n_H \sim p^{1/2}$, где p - давление молекулярного водорода [148].

Поток F , полученных при диссоциации атомов определяется следующим уравнением:

$$F = n_H \cdot V_{\text{дисс}} \quad (5)$$

где $V_{\text{дисс}}$ - скорость диффузии атомов к поверхности стенок реактора.

Поскольку $V_{\text{дисс}} \sim p^{1/2}$, то $F \propto p^{1/2}$. Величины энергий активации диссоциации водорода на вольфраме, приведенные в литературе [149–151], изменяются от 0,24 до 2,48 эВ. Это значение в основном определяется каталитическими свойствами вольфрама и связано с подготовкой и свойствами поверхности вольфрамовой проволоки.

Аналогичные уравнения справедливы для изотопов водорода. На диссоциации трития на вольфрамовом катализаторе при низком давлении и температурах вольфрама около 2000 К основан метод введения тритиевой метки, который называется метод термической активации трития (ТАТ). С помощью метода ТАТ можно ввести тритиевую метку практически в любые органические молекулы. Особенно эффективен метод для сложных высокомолекулярных биологически активных соединений. Ограничения других методов здесь могут быть успешно преодолены подбором условий проведения процесса мечения. Основы метода ТАТ были заложены в лаборатории радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. В настоящее время данный метод широко используется в научных исследованиях, проводимых в лаборатории радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии

в сотрудничестве со многими кафедрами химического факультета и рядом научных центров в России и за рубежом.

(2) Очистка и хранение полученных тритиевых меченных соединений

Независимо от используемого метода получения, для получения квалифицированных меченых соединений реагенты необходимо тщательно разделить и очистить. Некоторые меченые соединения часто образуют примеси после хранения в течение определенного периода времени и требуют повторной очистки. Обычные методы, такие как перекристаллизация, дистилляция и экстракция, можно использовать для приготовления маркеров с низкой удельной активностью и большими химическими количествами. Более точные методы очистки обычно требуют технологии микросепарации, а более удобными являются хроматография, ионный обмен, гель-фильтрация и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Метод гель-фильтрации часто используется серия Sephadex G, также доступна серия Biogel-P. При отделении меченых белков от неорганических тритиевых соединений обычно используют сефадекс G-25 или G-50, а затем для дальнейшей очистки используют G-100. Метод ионного обмена обычно заключается в использовании колонки ионообменной хроматографии, которая используется для разделения и очистки коротких пептидных маркеров. Метод диализа позволяет хорошо разделять меченые белки и низкомолекулярные соединения. Электрофорез можно использовать для разделения монотритиированных, политритиевых и поврежденных белков. Колоночную хроматографию также часто используют для разделения меченых малых органических молекул [152]. Аффинная хроматография использует связывание белков с их специфическими антителами или рецепторами для разделения и очистки меченых белков. Этот метод обладает высокой специфичностью и хорошей биологической активностью,

но операция сравнительно сложна. ВЭЖХ позволяет разделять и количественно обнаруживать органические соединения, неорганические соединения, биологические макромолекулы и т. д. Преимуществом этого метода является то, что эффект разделения хороший и быстрый, но он требует специального оборудования и высоких затрат.

Меченые тритием соединения, используемые в качестве индикаторов или аналитических реагентов, предъявляют более высокие требования к качеству, чем обычные соединения. К показателям качества меченных тритием соединений относятся: радиоактивная ядерная чистота, радиохимическая чистота, радиоактивная удельная активность, биологическая активность и иммунная активность, а также положение маркировки и количественное распределение.

2.2. Регистрация β -излучения меченых тритием соединений методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии (ЖСС)

Исследование и разработка технологии регистрации и анализа трития, а также точный анализ и измерение трития в твердой, жидкой и газовой фазах являются основными требованиями развития современной радиохимии. Вообще говоря, технологии анализа и измерения трития можно просто разделить на три категории с точки зрения применения: анализ трития в твердых материалах, анализ трития в газах и анализ трития в жидкостях.

Современные методы анализа трития в твердых телах в основном включают рентгеновскую спектроскопию, индуцированную β -излучениями (BIXS) [153,154], визуализационную пластину [155–157], калориметрию [158–160], ионно-лучевой анализ [161,162] и т. д. В 1979 году ранний метод BIXS был впервые предложен для анализа информации о содержании и распределении трития по глубине в материале посредством β -излучений, испускаемых при распаде трития, и тормозного излучения, генерируемого взаимодействием вещества, и успешно измерил содержание трития в

пленка тритированного эрбия [163,164]. Для распределения трития в материалах большой площади эффективным методом измерения являются визуализирующие пластины. Калориметрия также является методом неразрушающего измерения, который эффективно измеряет общее содержание трития в материалах и широко используется для измерения количества трития в контейнерах для хранения трития. Методы ионного анализа, включая ускорительную масс-спектрометрию (AMS) [165,166] и анализ обратного резерфордского рассеяния (RBS) [167,168] широко используются во многих лабораториях твердых материалов и стали мощным инструментом для анализа трития на поверхности материалов.

Обычно используемые методы анализа трития в газе включают масс-спектрометрию [169,170], газовую хроматографию [171,172], метод лазерного комбинационного рассеяния [173,174], метод ионизационной камеры [175,176] и т. д. Масс-спектрометры широко используются при анализе органических веществ и остаточных газов благодаря их высокой скорости анализа и широкому диапазону масс. Газовая хроматография позволяет быстро определить состав и содержание примесных газов в изотопах водорода. Технология низкотемпературного хроматографического анализа позволяет точно и быстро определить содержание каждого компонента в изотопах водорода. Лазерный рамановский метод подходит для неразрушающего онлайн-анализа, но на ранней стадии необходимо построить калибровочную кривую, чтобы определить взаимосвязь между пиковой интенсивностью и содержанием. Для измерения большого количества трития в системе традиционный метод измерения заключается в использовании ионизационной камеры небольшого объема и подключении ионизационной камеры с высокой степенью герметичности к технологической системе для достижения измерения. В последние десятилетия разработана технология измерения концентрации трития в газах путем измерения тормозного излучения,

испускаемого при взаимодействии трития с веществом, и получены хорошие результаты [177,178].

Анализ трития в растворе в основном осуществляется с помощью метода ЖСС, который будет подробно описан ниже.

(1) Основные понятия метода ЖСС

Технология измерения методом ЖСС возникла в 1950-х годах [179,180]. Это наиболее эффективный метод измерения низкоэнергетического бета-излучения, который широко используется в ядерной химии, современной медицине, биологии и археологии. Он обладает такими преимуществами, как высокая эффективность обнаружения, простая подготовка проб и подходит для автоматического обнаружения следов или больших количеств проб. Метод ЖСС используется для измерения трития в растворе с высокой чувствительностью [181,182].

Метод ЖСС основан на определении числа и яркости световых вспышек, возбуждаемых радиоактивным излучением в жидком сцинтилляторе (жидкостно-сцинтилляционной смеси). Основным процесс, который происходит, заключается в следующем: радиоактивный образец, содержащий тритий, смешивается со сцинтилляционной жидкостью, а энергия бета-лучей, испускаемая при распаде трития, поглощается молекулами растворителя, вызывая возбуждение или ионизацию молекул растворителя. Энергия в основном передается между молекулами растворителя посредством столкновений и, наконец, передается молекулам растворенного вещества (ароматические соединения, сцинтилляторы) и помещается в возбужденное состояние. Молекулы растворенного вещества в возбужденном состоянии излучают фотоны, когда они невозбуждены, и после получения фотоны преобразуются в электрические сигналы. По выходной трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), который преобразует световые фотоны в поток электронов. Поток электронов усиливается в примерно 10^6 раз и создает импульс тока, который далее

анализируется по времени прохождения, амплитуде сигнала и его длительности.

Поэтому самым важным в процессе является выбор сцинтиллятора и его растворителя. Для эффективного обнаружения излучения к растворителю выдвигаются следующие требования: хорошо растворяет сцинтиллятор, эффективно передает энергию возбуждения сцинтиллятору, не поглощает свет, химически и радиационно устойчив, хорошо растворяет радиоактивное вещество. В табл. 3 приведены наиболее часто используемые в ЖСС растворители и некоторые их характеристики.

Таблица 3. Примеры используемых растворителей в ЖСС [183].

Растворитель	Относительная амплитуда a^*	Максимум Поглощения (нм)	Время свечения (нс)	Эффективность флуоресценции
Триметилбензол	112	270	38,3	0,28
Ксилолы	110	266	33,3	0,22
Толуол	100	262	35,2	0,24
Бензол	85	255	33,6	0,1

*Рассчитывается для комптоновского рассеяния фотонов с энергией 662 кэВ.

Около 90% молекул толуола при возбуждении под действием β -излучений испытывают s-s-переходы, и снятие возбуждения происходит безызлучательным переходом путем рассеяния энергии. У остальных 10% молекул толуола происходит возбуждение p-электронов, которые при переходе в основное состояние испускают кванты света в ближней ультрафиолетовой области спектра (флуоресценция толуола под действием ионизирующего излучения). Поскольку трубка ФЭУ чувствительна только к падающему свету определенных длин волн, длина волны фотонов, испускаемых при снятии возбуждения растворенного вещества, может находиться за пределами чувствительного диапазона трубки ФЭУ. Для повышения квантового выхода флуоресценции к органическому

растворителю добавляют в небольших количествах сцинтиллятор (активатор). Если в процессе тепловой миграции возбужденная молекула толуола оказывается вблизи молекулы активатора, то происходит перенос энергии от молекулы толуола к молекуле активатора. Получаемые таким образом возбужденные молекулы активатора тратят свою энергию на испускание квантов света. Вещество сцинтиллятора должно с высокой вероятностью испускать фотоны при переходе из возбужденного состояния в основное, при этом самопоглощение сцинтилляционного света должно быть минимальным. Растворимость сцинтиллятора в растворителе должна быть достаточно высокой, чтобы достичь оптимальных свойств переноса энергии, а спектральное распределение фотонов должно соответствовать спектральному отклику фотокатода и не зависеть от температуры и растворителя.

При проектировании жидкого сцинтиллятора мы надеемся, что метод передачи энергии от растворителя к люминесцентному материалу будет безызлучательным, поскольку люминесцентный материал добавляется для достижения высокой светоотдачи и короткого времени свечения в жидком сцинтилляторе. Если энергия передается излучением, то длительное время люминесценции и низкая квантовая эффективность растворителя приведут к тому, что жидкий сцинтиллятор потеряет свои преимущества. Следовательно, эффективная передача энергии от растворителя к люминесцентному материалу должна основываться на безызлучательной передаче энергии, так что квантовая эффективность флуоресценции и время люминесценции люминесцентного материала могут доминировать над светоотдачей и временем люминесценции жидкого сцинтиллятора. Список наиболее часто используемых в ЖСС сцинтилляторов приведен в таблице 4.

Таблица 4. Характеристики сцинтилляторов.

Сцинтиллятор	Количество фотонов на возбужденную молекулу	Максимум спектра флуоресценции, нм	Растворимость в растворителях, г/л
2,5-дифенилоксазол (PPO)	0,83	365	414
2-фенил-5-(4-бифенилил)-1,3,4-оксадиазол (PBD)	0,80	365	21
2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазол (PPD)	0,90	365	119
1,4-бис-2-(5-фенилоксазоллил)бензол (PPOP)*	0,85	415	2,2

*вторичный сцинтиллятор

Поскольку большинство радиоизотопов присутствует в водной среде, которая не смешивается с ароматическими растворителями, то для эффективного преобразования энергии излучения в свет требуется образование микроэмульсии, которая создается с помощью добавки специальных детергентов, что позволяет привести водную и органическую фазы в близкий контакт. В сцинтилляционном коктейле микроэмульсия представляет собой дисперсию очень малых капель (радиус приблизительно 10 нм) «вода в масле», что достигается за счет использования разных групп ПАВ: неионогенные (алкилфенолэтоксилаты), анионные (включая среди прочих, алкил и алкиларилсульфонаты, алкилсульфосукцинаты) и катионные, например, четвертичные азотистые основания, а также смеси ПАВ разных классов [182,184,185].

Для проведения измерений радиоактивный препарат в сцинтилляционной жидкости помещают в стандартном флаконе из стекла

или полиэтилена между фотокатодами двух ФЭУ. Взаимодействие ионизирующей частицы с жидким сцинтиллятором порождает довольно большое число световых квантов, которые могут выбивать фотоэлектроны с фотокатодов каждого из ФЭУ, что обеспечивает одновременное возникновение импульсов на обоих ФЭУ. Импульсы с каждого ФЭУ усиливаются и попадают на схему быстрых совпадений, откуда на выход поступают импульсы только в том случае, если на оба ее входа одновременно (с точностью до разрешающего времени схемы совпадений) поступили импульсы от обоих ФЭУ. Таким образом, происходит отделение полезных импульсов от шумовых. Схема быстрых совпадений управляется сумматором, на котором происходит суммирование совпадающих по времени импульсов. Это позволяет удвоить объем информации о поступлении квантов света на фотокатоды, и тем самым получить статистически более достоверную информацию об амплитудном распределении импульсов [186–188].

(2) Влияние гашений на результаты эксперимента и их коррекция.

При измерениях ЖСС потери при передаче энергии в совокупности называются явлением гашения. Поскольку добавление измеряемого образца в сцинтилляционную жидкость изменяет исходное состояние сцинтиллятора, необходимо измерить скорость счета жидкостных сцинтилляций каждого образца. При измерении скорости счета индивидуальные различия в образцах приводят к разной степени гашения, что влияет на эффективность счета [189].

Скорость счета зависит от того, насколько эффективно события ядерного распада преобразуются в световые вспышки. На регистрацию оказывают влияние несколько факторов: химическое гашение, ионизационное гашение, цветное и гашения образцов (Относится к пробирке с образцом, концентрации трития, объему образца, наличию примесей и т.д.).

Химическое гашение. Это наиболее распространенный механизм заделки, который оказывает наибольшее влияние на эффективность регистрации. Химическое гашение происходит из-за того, что небольшое количество молекул растворителя, возбужденных энергией излучения, сталкивается с невозбужденными примесями, растворителями и молекулами растворенных веществ в процессе молекулярного движения и потребляет энергию возбуждения в виде тепловой энергии. Это уменьшает высоту импульса спектрометра и снижает количество регистрируемых импульсов. Степень химического гашения зависит от химической структуры и концентрации гасителя. Чем больше концентрация гасителя, тем серьезнее эффект гашения. Например, кислород и вода являются сильными гасителями. При комнатной температуре и давлении сцинтилляционный раствор может растворять кислород в воздухе. Когда концентрация растворенного кислорода достигает 10^{-3} М, эффект гашения на 20% выше, чем при отсутствии кислорода, и чем меньше содержание воды в сцинтилляционном растворе, тем выше эффективность гашения. Поэтому сцинтилляционный раствор нельзя помещать в холодильник.

Цветовое гашение. Явление цветового гашения наблюдается в окрашенных растворах. Из-за поглощения фотонов цветом окрашенная сцинтилляционная жидкость ослабляет яркость фотонов и сокращает свободный пробег светового кванта, что приводит к уменьшению количества фотонов, достигающих катода, что приводит к снижению эффективности счета. Различные цвета обладают разной степенью подавления, а длина волны флуоресценции сцинтилляционной жидкости близка к ультрафиолетовому излучению. Поэтому порядок изменения степени подавления цветов таков: синий > желтый > красный. Цветовое гашение предотвратить легче, чем химическое, поскольку образцы обычно можно отбелить с помощью специальных реагентов. Некоторые

биологические образцы, такие как кровь, моча должны быть обесцвечены в процессе подготовки образцов.

Ионизационное гашение. Это связанный с плотностью образования возбужденных молекул растворителя в сцинтилляционном коктейле. В экспериментах было обнаружено, что число фотонов, генерируемых на единицу пути тяжелозаряженными ионами в сцинтилляторе, не имеет линейной зависимости от энергии осаждения на единицу пути. Чем больше плотность ионизации частиц, тем больше отклонение от линейности передачи энергии (ЛПЭ). Это связано как с типом падающих частиц (заряд и масса), так и с энергией падающих частиц. Энергия, вкладываемая заряженными частицами на единичную траекторию сцинтилляционной среды, и число фотонов, образующихся в жидкой вспышке, могут быть выражены полуэмпирической формулой Биркса [187]:

$$\frac{dL}{dr} = \frac{S dE / dr}{1 + kB dE / dr} \quad (6)$$

Где S - абсолютная эффективность сцинтилляции, B – константа, $B dE / dr$ это плотность ионизированных и возбужденных молекул, образующихся за счет единичной потери энергии, k - коэффициент гашения ионизации. kB является важным параметром жидкого сцинтиллятора. Константа kB у разных жидкостных сцинтилляторов различна. Когда плотность центра тушения очень мала. То есть, $kB dE / dr \ll 1$, формула (15) становится

$$\frac{dL}{dr} = S \frac{dE}{dr} \quad (7)$$

Проинтегрируем обе части этого уравнения по r и в соответствии с начальными условиями примем константу интегрирования равной 0, поэтому есть:

$$L(E) = SE \quad (8)$$

То есть количество генерируемых фотонов флуоресценции линейно связано с вложенной энергией. Для тяжелых ионов с низкой энергией (например, с энергией α -частиц $E_\alpha < 6$ МэВ), $kB \frac{dE_\alpha}{dr}$ нельзя игнорировать, и уравнение (15) принимает вид [187]:

$$\frac{dL}{dr} = \frac{S}{kB} = const. \quad (9)$$

Проинтегрируем обе части этого уравнения по r , тогда получим

$$L(E) = \frac{S}{kB} R(E) \quad (10)$$

где $R(E)$ — пробег падающей частицы. Видно, что для низкоэнергетических тяжелозаряженных частиц число образующихся фотонов флуоресценции пропорционально длине трека.

Для того чтобы корректно определить радиоактивность образца по данным жидкостного счета необходимо знать величину эффективности регистрации (ε), которая определяется по уравнению (11) и учитывает гашение:

$$\varepsilon = \frac{c_{рт}}{d_{рт}} \times 100\% \quad (11)$$

где $c_{рт}$ - импульсы в минуту, $d_{рт}$ - распад в минуту.

(3) Способы исправления гашения и определения эффективности регистрации.

Гашение является наиболее важным фактором помех при жидкостных сцинтилляционных измерениях. Поэтому тушение и его коррекция являются одним из важных вопросов жидкостных сцинтилляционных измерений. Методы калибровки гашения включают метод внутреннего стандарта (IS), метод отношения скорости счета в каналах (SCR), метод соотношения каналов внешнего стандарта (ESCR), метод спектрального индекса образца (SIS) и т. д.

Метод IS является основным методом калибровки методом гашения. Добавляют в измеряемую пробу стандартный образец (известное количество радиоактивности), небольшой по размеру, достаточно прочный и содержащий тот же нуклид, что и образец, подлежащий измерению, и выполняют отдельные измерения в тех же условиях измерения. Эффективность регистрации (ε) определяют как уравнение (12).

$$\varepsilon = \frac{C_{s+i} - C_s}{D_i} \quad (12)$$

где C_{s+i} - скорость счета образца с добавкой стандарта, C_s - скорость счета образца без добавления стандарта, D_i - радиоактивность стандарта.

При использовании метода внутреннего стандарта применяются следующие требования: в качестве стандарта используется тот же радионуклид, что и в измеряемом образце, скорость счета внутреннего стандарта должна быть существенно выше, чем в образце, добавка стандарта не должна приводить к гашению в образце, радиоактивность внутреннего стандарта должна быть точно и надежно определена.

Метод SCR применяется в приборах, оснащенных анализатором высоты пика или одноканальным анализатором. Метод основан на регистрации образца в каналах спектрометра, соответствующих областям низкой и высокой энергии. Скорость счета в каждой области определяется гашением и изменяется из-за смещения высоты импульса от высокого до более низких величин. Смещение положения спектра за счет гашения вызывает изменение в отношении количества зарегистрированных импульсов в двух каналах спектрометра. Степень спектрального сдвига и величина изменения в выборке каналов CPM1 / CPM2 или скорость счета в канале 1 по частоте отсчета выборки в канале 2 зависят от интенсивности гашения. Поэтому для определения параметров гашения готовят серию растворов с одним и тем же излучателем и одинаковой радиоактивностью, но разным количеством гасителя. После измерения скорости счета в

каналах 1 и 2 получают зависимость эффективности регистрации от отношения счета в каналах [147].

Метод ESCR разработан на основе двух методов подсчета поправок на гашение: метода SCR и метода внешнего стандарта. Этот метод отображает эффективность счета набора стандартных серий образцов для гашения в зависимости от соответствующих значений отношения каналов для получения калибровочной кривой отношения каналов образца для гашения. По измеренному соотношению каналов образца можно найти соответствующую эффективность счета по кривой. Этот метод подходит для образцов с более высокой активностью трития.

SIS — это метод коррекции гашения, основанный на анализе бета-спектральных характеристик образца. Средняя высота импульса полного β -спектра образца используется для представления степени тушения образца. В настоящее время этот метод в основном используется в жидкостных сцинтилляционных спектрометрах серии Tri-Carb.

(4) Оптимизация метода ЖСС для измерения меченных тритием соединений.

Б. Рават и др. [189] в своем исследовании четко указали, что тип бутылки для образцов оказывает значительное влияние на гашение. Для различных концентраций трития, Z. L. Chen и др. [190] подробно проанализировали влияние типа флакона для образцов и пропорции сцинтилляционного раствора на результаты измерений. Результаты показали, что скорость подсчета в стеклянных бутылках с низким содержанием калия выше, чем в пластиковых. При различных концентрациях трития соотношение различных сцинтилляционных растворов и воды для пробы к результатам измерений показывает, что концентрация трития практически не влияет на гашение. При различных концентрациях трития соотношение различных сцинтилляционных растворов и воды для пробы к результатам измерений показывает, что

концентрация трития практически не влияет на явление гашения в процессе измерения.

Кроме того, в процессе измерения трития в жидком виде общее количество образцов в бутылке также в определенной степени непосредственно влияет на результаты измерений, то есть на проблему объемного эффекта. З. Л. Чень и др. [191] Экспериментально изучили объемный эффект жидкого трития-вспышки. В эксперименте использовался промышленный жидкостный анализатор Perking Elmer, модель Tri-Carb 3100, общий объем пробы составлял 1~ 20 мл. Результаты показали, что общий объем образцов находится в диапазоне от 5 до 15 мл, и потери при подсчете минимальны, слишком малый или слишком большой объем образцов приведет к потере при подсчете. Проблема объемного эффекта в основном вызвана различной чувствительностью различных участков поверхности ФЭУ к свету. При нормальных обстоятельствах чувствительность ФЭУ к свету постепенно снижается от центра к окружающему пространству. Когда общее количество образцов мало или велико (образец не может полностью покрыть центральную чувствительную область), некоторые фотоны не могут попасть в чувствительную область ФЭУ, что приводит к ослаблению выходного сигнала ФЭУ.

Б. Рават и др. [189] создали модель для моделирования влияния эффекта гашения на β -спектр при измерении трития в жидком виде. В своих исследованиях уравнение Штерна-Фольмера использовалось для анализа и обнаружения геометрических систем и химических эффектов гашения. Модель разработана на основе эффективности детектирования телесного угла и скорости испускания флуоресценции сцинтиллирующих органических соединений, а также применен метод моделирования Монте-Карло. Эта модель используется для моделирования эффекта гашения CCl_4 при измерении концентрации жидкого азота во вспышке, и было

обнаружено, что результаты моделирования в основном совпадают с результатами экспериментальных испытаний.

При измерении жидкого трития с низким содержанием трития в жидкости необходимо подготовить образцы, чтобы повысить точность измерения, исключить влияние других примесей в жидкости и повысить чувствительность измерения. Обычные методы пробоподготовки включают: метод прямого добавления пробы, выпаривание и конденсацию (обычная, вакуумная или азеотропная дистилляция) для перевода твердого раствора в жидкое состояние, концентрирование и химическую обработку, а также экстракцию с использованием колонн для обмена частиц (таких как смола Erichrom) [192].

И. Ватанабе и др. [193] использовали ультрафиолетовый свет для фотолиза образцов мочи и обнаружили, что при взаимодействии с перекисью водорода фотолиз ультрафиолетовым светом может эффективно подавлять гашению, тем самым значительно сокращая время анализа мочи на содержание трития. Результаты эффективности обнаружения жидких вспышек после фотолиза показывают, что ультрафиолетовый фотолиз образцов мочи в присутствии 10%-ной перекиси водорода может эффективно уменьшить количество органических веществ и увеличить содержание мочи в образцах для обнаружения жидких вспышек в 20 раз. Когда предел обнаружения жидких вспышек составляет 0,3 Бк/мл, время анализа составляет всего 0,5 мин.

И. Сакума и др. [194] сообщили о методе пробоподготовки, который использует фильтрацию вместо традиционных методов выпаривания и усадки для удаления примесей из проб окружающей воды. В данной работе были отдельно изучены четыре метода фильтрации (микропористая фильтрация, ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос). Результаты показывают, что метод фильтрации используется для обработки проб воды из окружающей среды, и влияние содержания примесей в пробах

воды на измерение содержания трития в жидком виде можно игнорировать.

2.3. Применения меченых тритием соединений

Технология отслеживания радиоактивных изотопов трития широко используется в науках о жизни, современной медицине, биологии, сельском хозяйстве, химии, геологии и археологии. К соединениям, меченым тритием, в основном относятся химические препараты: пептиды [195–197], белки [198–200], углеводы [201–203], гормоны [204–206], нуклеотиды [207–209] и другие органические соединения [210–213]. В последние годы благодаря удобству и точности измерения радиоактивности, больше и больше меченых тритием неорганических соединений используются в исследованиях различных механизмов и широко используются в медицине [4,6,214,215]. Соответствующие исследования включают исследование методологии маркировки, разработку маршрутов синтеза метки, радиохимический синтез, разделение и приготовление радиоактивных продуктов, контроль качества продукции и исследования условий хранения продукции и т. д. Также могут быть проведены радиоактивные фармакокинетические исследования, маркировка радиоактивных лигандов для скрининга лекарств и эксперименты по связыванию рецепторов радиоактивных лигандов [216].

Меченные тритием лекарства, широко используются в таких областях, как токсикология и фармакокинетические исследования новых лекарств, а также анализ остатков лекарств. Это также идеальный инструмент для выяснения метаболизма лекарств, начала действия и оценки опасности остатков лекарств. Метод радиоактивных индикаторов позволяет получить количественную информацию о молекулах соединений и продуктах их разложения, метаболитах и родственных веществах [217].

Харнуд и др. [218] использовали метод мечения тритием для изучения синтеза цианида (антибактериального агента роста с высокой удельной

активностью). Метка тритием может помочь выяснить метаболизм лекарств и пути их действия.

Меченные тритием соединения также являются важным средством изучения активных ингредиентов и фармакологических исследований китайских растительных лекарственных средств, что может позволить исследованиям активных ингредиентов растительных лекарственных средств достичь клеточного и даже молекулярного уровня. Ли и др. [219] подготовили меченный тритием силимарин для изучения его лечения заболеваний печени. Дун и др. [220] изучили метод мечения тритием агликона гардении, ацетилаканина и хлорогеновой кислоты, активных ингредиентов китайской фитотерапии. Это обеспечивает основу для дальнейших исследований метаболизма и фармакокинетики активных ингредиентов китайских растительных лекарственных средств.

Меченные тритием соединения являются обычными исследовательскими инструментами во многих биологических исследованиях. Например, механизм действия и анализ ферментов, цитология, молекулярная биология, исследование связывания молекулярных рецепторов, радиоиммуноанализ и т. д.

Филер и др. [221] синтезировали [^3H]($-$)-лисурид, лиганд дофаминового рецептора, используя мечение тритием. Используя бромид лисурида в качестве предшественника, они успешно получили целевой продукт посредством каталитического тритирования. Может использоваться для изучения механизма работы дофаминовых рецепторов.

ГЛАВА 3. МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ НАНОАЛМАЗОВ В КОМБИНАЦИИ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

3.1. Методы модификации поверхности наноалмазов

В процессе применения наноалмазов для конкретных целей применения также необходимо химически модифицировать наноалмазы для улучшения поверхностных свойств алмаза и улучшения его способности сочетаться с другими материалами [222,223]. Быстрое развитие получили исследования по применению модифицированных наноалмазов в области биовизуализации, биосенсорства и доставки лекарств, нацеленных на определенные клетки [224]. Существует несколько распространенных методов модификации:

(1) Функционализация поверхности наноалмазов.

Функционализация поверхности наноалмазов относится к равномерному введению одной или нескольких других функциональных групп на исходную поверхность алмаза для изменения характеристик исходного алмаза. Исследователи используют методы химической модификации, такие как карбоксилирование [225], гидрирование [226], галогенирование [227], аминирование [228], амидирование [229], ацилхлорирование [230] и гидроксिलирование [231], для образования некоторых химических функциональных групп на поверхности наноалмазов. Изменяя, регулируя и проектируя химическую активность поверхности наноалмазов, можно напрямую связывать биологически активные макромолекулы, полимеры и т. д. с поверхностью наноалмазов. Это также позволяет одновременно уменьшить агрегацию наноалмаза и улучшить его диспергируемость в дисперсионной системе.

Прежде чем вводить в наноалмаз другие функциональные группы, необходимо сначала ввести на поверхность водородные терминалы, поскольку на поверхность, содержащую водородные терминалы, легче вводить активные группы. Обычно нагрев до 1000-1300 К в атмосфере

водорода применяют для восстановления кислородсодержащих функциональных групп (гидроксильных, карбоксильных, карбонильных, эфирных связей и др.) [232]. Также недавно было проведено исследование модификации поверхности наноалмазов с использованием обработки водородом. Функционализированные поверхности обрабатываются атомарным водородом, чтобы мягко повысить их гидрофобность и сохранить общий состав, после чего можно выполнить дальнейшую функционализацию [233].

Обработка гидрогенизированного наноалмаза растворами окисляющих кислот (таких как азотная кислота, хромовая кислота, реактив Фентона и т. д.) может удалить примеси (графит и металлы) с поверхности алмаза, позволяя образовывать поверхностные функциональные группы C=O и C-O-C на поверхности наноалмаза (100) и функциональные группы C-OH на поверхности наноалмаза (111) [234].

Облучение ультрафиолетовым светом или различные органические пероксиды используются для инициирования свободнорадикальных реакций, а реакция присоединения между олефинами и поверхностью наноалмазов генерирует связи C-C. Алкильные цепи, карбоновые кислоты или азотсодержащие группы могут быть непосредственно прикреплены к поверхности наноалмазов. Янь и др. [235] использовали свободнорадикальную реакцию для соединения цепи ДНК с поверхностью алмаза, и стабильность соединения цепи ДНК была очень хорошей. Миллер и др. [236] использовали эту технологию для хлоридирования поверхности алмаза и достижения амина или тиолирования на поверхности алмаза. Сментковский и др. [223] посредством фотохимической модификации сформировали очень стабильные терминалы C-F на поверхности алмазных пленок.

(2) Металлизация поверхности наноалмазов.

Металлизация поверхности наноалмазов относится к нанесению покрытия из металлов или сплавов на поверхность алмаза. Методы включают физическое осаждение из паровой фазы [237], химическое покрытие [238], электроосаждение [239], химическое осаждение из паровой фазы [240] и т. д. Нанесение частиц металлов (таких как золото, медь, серебро, никель, платина, рутений, палладий) на поверхность наноалмаза посредством физического осаждения из паровой фазы или потенциостатического электроосаждения может быть использовано для изготовления наноэлектронных устройств и использоваться в каталитических реакциях, диагностике и лечении заболеваний. биосенсорика и другие области [241,242].

Чан и др. [243] электроосаждали наночастицы золота на поверхность наноалмаза для изготовления тонкопленочного электрода. Электрод может катализировать реакцию восстановления O_2 в кислом растворе, а каталитическая эффективность в 20 раз выше, чем у золотого электрода в тех же условиях; Ониши и др. [244] нанесли на поверхность наноалмаза медь и никель, что улучшило электрокаталитическую активность глюкозы; Спатару и Ферро и др. [245,246] нанесли диоксид рутения и гидратированный оксид кобальта на поверхность наноалмаза соответственно, чтобы сделать каталитические электроды, которые могут увеличить выход диоксида углерода до монооксида углерода. Это может снизить выбросы углекислого газа и обеспечить техническую поддержку использования углекислого газа в качестве сырья для химического синтеза.

(3) Модификация поверхности наноалмазов ПАВ.

Неорганические группы ПАВ легко вступают в химическую реакцию с наноалмазами. Органофильные группы могут химически реагировать с органическими веществами, такими как синтетические смолы или другие полимеры, или образовывать водородные связи и растворяться в них. ПАВ

можно ориентировать и располагать на поверхности раствора, что может улучшить дисперсионную способность наноалмаза в системе.

Чу, Ван и др. [247,248] использовали силановый связующий агент для модификации поверхности наноалмазов, что значительно улучшило механические свойства композитной смолы; Вань др. [249] использовали ПАВ КН-550 для модификации поверхности алмаза с целью улучшения его дисперсионных свойств в водно-спиртовых растворах и растворах толуола.

3.2. Нековалентная модификация поверхности наноалмазов

Очень гибкий и относительно простой способ установить нужные функциональные группы на поверхности наночастиц любого типа - покрыть их нековалентно связанными молекулами. Эта концепция применима и к наноалмазам. В зависимости от функциональных групп на поверхности наноалмазов материал проявляет разные адсорбционные свойства. Типичные наноалмазы после обработки кислотой имеют гидрофильную поверхность со значительным количеством различных кислородсодержащих функциональных групп. Эта поверхностная структура способна образовывать многочисленные водородные связи с подходящими полярными соединениями [250]. Вклад всех этих нековалентных взаимодействий в сумме составляет значительную общую прочность связи. Это свойство особенно полезно для иммобилизации более крупных молекул, поскольку молекулы можно использовать в неизменном нативном состоянии [251]. Таким способом Хуан и др. [125] иммобилизовали бычий инсулин на взрывчатых наноалмазах. Дополнительные примеры включают иммобилизацию цитохрома с [89], лизоцима [252,253] и апобелина [254]. Все эти молекулы сохраняют свою функциональность.

Кроме того, лекарства и другие биологически активные соединения также могут быть иммобилизованы на поверхности частиц наноалмазов посредством нековалентных взаимодействий. Такие конъюгаты можно

использовать для доставки лекарств или растворения слишком липофильных соединений путем прививки к нанодiamondам. Лам и др. [255] присоединили доксорубин к нанодiamondам, чтобы контролировать его высвобождение. Другие противоопухолевые соединения, нековалентно связанные с нанодiamondами, включают 10-гидроксикамптотecin [256] и паклитаксел [257].

Нековалентная иммобилизация макромолекул также может быть использована для покрытия нанодiamondов однородной оболочкой из специфических полимеров. Бадун, Чашин и др. [258,259] получили покрытия на основе частиц нанодiamondов хитозана и гиалуроновой кислоты и изучили их стабильность и антибактериальные свойства. Нековалентное внедрение нанодiamondов в полимерную матрицу повышает механическую прочность материала. Моримьон и др. [260] получили композиты из поливинилового спирта и нанодiamondов с отличными механическими свойствами (модуль Юнга ≥ 1 ТПа, прочность на разрыв = 100-150 ГПа). Поэтому можно представить себе его применение не только в имплантатах, но и в качестве прочного и легкого (конструкционного) материала. Еще одним преимуществом алмаза является его биосовместимость, поэтому его можно использовать при модификации различных медицинских материалов (биопротезов, искусственных костей, искусственной кожи).

3.3. Ковалентная модификация поверхности нанодiamondов

Во многих применениях нанодiamondов помимо нековалентных модификаций существуют и ковалентные модификации. То есть на поверхности нанодiamondа образуется относительно стабильная ковалентная связь. На сложной поверхности нанодiamondов посредством обычных органических химических реакций могут образовываться различные связи. Хотя нанодiamond считается неорганическим материалом, на самом деле он ведет себя как гигантская органическая молекула с более высоким

содержанием углерода. Схема связывания может быть адаптирована к структуре и функции иммобилизованной молекулы.

Например, когда ферменты или другие биологически активные соединения иммобилизованы нековалентно, большое количество мест связывания на поверхности алмаза может фактически препятствовать их нормальному функционированию [261]. Сильные взаимодействия на больших участках поверхности молекулы могут изменить ее трехмерную структуру или привести к неблагоприятной ориентации соединения на поверхности наноалмаза. В этих случаях желательно обеспечить возможность избирательного связывания функциональных молекул с поверхностью наночастиц в специфических и предпочтительных местах, вдали от фактического активного сайта биоактивного соединения. Жесткие линкерные молекулы обеспечивают отсутствие неспецифических взаимодействий между поверхностью и иммобилизованным фрагментом. Эти цели могут быть легко достигнуты посредством ковалентной иммобилизации [255].

Исходная однородная структура поверхности наноалмазов обеспечивает успех последующей функционализации наноалмазов. После модификации могут измениться некоторые основные свойства частиц (например, стабильность дисперсии, размер частиц). Особенно для последующих применений поверхность наноалмазов необходимо дополнительно модифицировать с помощью более сложных деталей. При ковалентной модификации практически все типы органических химических реакций могут осуществляться на поверхностях наноалмазов с соответствующим образом модифицированной поверхностью. Общие проблемы связаны с однородностью превращения, удалением побочных продуктов или стабильностью исходных поверхностных групп в необходимых условиях реакции.

Все наноалмазные материалы можно использовать для дальнейшей прививки красителей, лекарств, меток, катализаторов и других функциональных частей. Одним из наиболее универсальных методов дальнейшей прививки более крупных молекул является «химия кликов» [262]. Мочалин [263] и др. использовали карбоксилированные наноалмазы, активированные тионилхлоридом, и они легко реагировали с додециламином с образованием амидных связей. Кроме того, введение длинных углеводородных цепей позволяет улучшить его дисперсию в гидрофобных растворителях, создавая наноалмазные материалы с чрезвычайно высокой гидрофобностью. Ли и др. [264] использовали амидные связи для введения бромида имидазолина в наноалмаз. Полученные наноалмазные композиты хорошо растворимы в ионных жидкостях и могут быть полезны при разработке новых композиционных материалов на основе алмазов. Комацу и др. [265] использовали гидроксильные наноалмазы, чтобы раскрыть эпоксидную структуру глицидола и инициировать полимеризацию. Полученные конъюгаты полиглицерин-наноалмаз показали очень хорошую растворимость в различных растворителях (20 мг/мл в воде).

ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И ОБЩИЕ МЕТОДИКИ ЭКСПЕРЕМЕНТОВ

4.1. Материалы

4.1.1. Антибиотики

В работе использовали следующие вещества, которые являются антибиотиками: сульфат амикацин (ApxBio, США), левофлоксацин (Sigma-Aldrich, США), ванкомицин (Sigma-Aldrich, США). Препараты использовали без дополнительной очистки. Выбор антибиотиков обусловлен их различной химической структурой, а также широким спектром действия. Структурные формулы антибиотиков приведены на рис. 3.

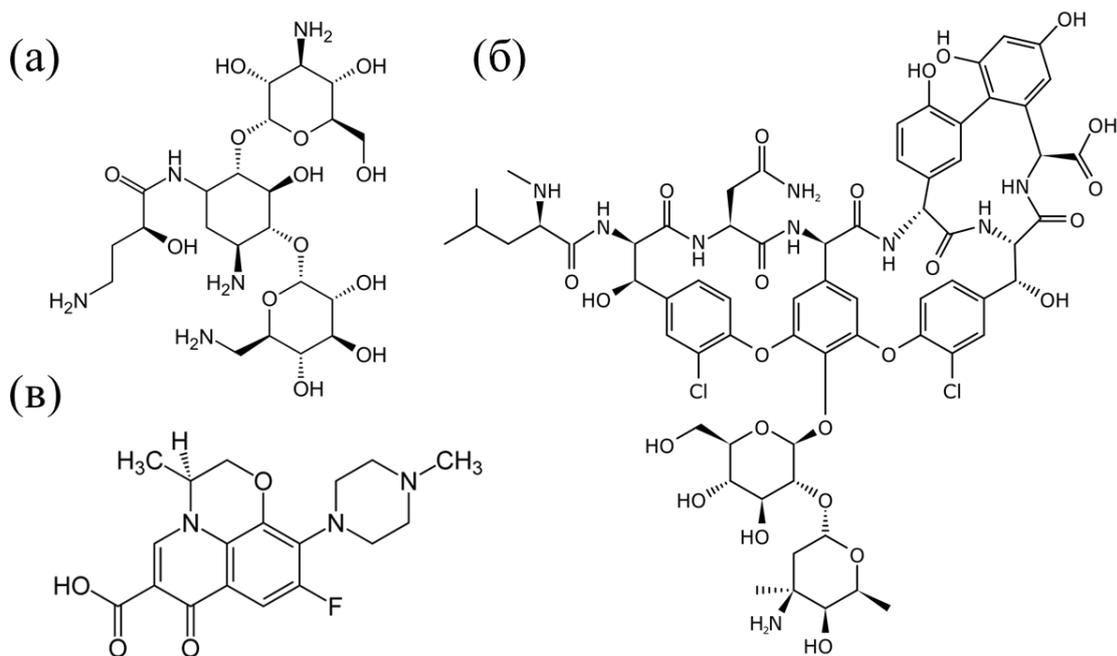


Рисунок 3. Структурные формулы антибиотиков: (а) амикацин; (б) ванкомицин; (в) левофлоксацин.

4.1.2. Хитозан

Для нанесения хитозановых покрытий на коллагеновых матрицы бычьего перикарда и свиную аорту (см. п. 2.1.3) использовали хитозан производства Sigma-Aldrich (США) со средней молекулярной массой 208 кДа. Степень деацетилирования определенная с помощью потенциометрического титрования составила 68 % [266].

4.1.3. Наноалмазы

В работе использовали следующие виды детонационных наноалмазов: SDND (PlasmaChem GmbH, Германия), который поставляется производителем в форме водной суспензии и обладает отрицательным ζ -потенциалом. Наноалмазы в форме порошков производства PlasmaChem GmbH (Германия), Реал-Дзержинск (Россия) и ФГУП СКТБ Технолог (Россия). Наноалмазы производства Реал-Дзержинск (марки RUDDM) при суспензировании в воде обладали отрицательным ζ -потенциалом, остальные наноалмазы положительным. Порошок наноалмазов PlasmaChem GmbH (Германия) отжигали на воздухе в течение 1 ч при 450 °С. Такая обработка приводит к небольшому окислению поверхности и наноалмаз проявляет в водной суспензии отрицательный ζ -потенциал.

4.1.4. Коллагеновые матрицы бычьего перикарда и свиная аорта

В работе использовали стабилизированные глутаровым альдегидом коллагеновые матрицы бычьего перикарда и свиную орту предоставленные НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева. Образцы коллагеновых матриц представляли собой прямоугольные кусочки размером 1×1 см² или 7×1 см² для исследования механических характеристик. Образцы хранили в физиологическом растворе при 4 °С.

4.1.5. Другие материалы

Для приготовления растворов и суспензий использовали воду, очищенную с помощью системы Milli-Q (Merk MilliPore).

Для получения меченных тритием веществ использовали газообразный тритий (ФГУП ПО Маяк, Россия).

В работе для приготовления десорбционных растворов использовали физиологический раствор (NaCl 0,09%) (SoloPharm, Россия) и бычий сывороточный альбумин (БСА) (BioWest).

Дополнительно при проведении очистки и анализа меченых тритием веществ, в качестве составляющих подвижных фаз и реагентов для десорбции вещества, использовали: аммиак, ацетонитрил, диоксан, метанол, соляную кислоту, трифторуксусную кислоту, хлороформ, этанол. Все реактивы производства России, использованные в работе, имели классификацию х.ч. Жидкости, используемые в качестве элюентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии, имели классификацию HPLC Grade.

4.2. Общие методики анализа веществ и получения меченых соединений

4.2.1. Измерение радиоактивности растворов и суспензий

Измерение радиоактивности растворов меченных тритием веществ проводили с помощью метода ЖСС с применением сцинтилляционных жидкостей UltimaGold, OptiPhase Hisafe 3, Ultima-Flo M (Perkin Elmer, США), ScintiLene BD (FisherBiotech, Австралия). Также готовили сцинтилляционную жидкость – аналог ЖС-8, добавляя к 1 л диоксана 60 г нафталина, 4 г 2,5-дифенилоксазола и 0,2 г 1,4-бис-2-(5-фенилоксазолил) бензола.

Измерения проводили с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра RackBeta 1215 (ЛКВ, Финляндия).

При измерении радиоактивности наноалмазов осадок после центрифугирования суспензий или аликвоту суспензии диспергировали в сцинтилляционной жидкости UltimaGold или OptiPhase Hisafe 3 с помощью ультразвуковой ванны (Град, Россия). При необходимости отбирали аликвоту такой суспензии в другую порцию сцинтиллятора, снова диспергировали и измеряли радиоактивность с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра RackBeta 1215.

4.2.2. Анализ наноалмазов

Анализ наноалмазов, использованных в работе проводили с помощью методов ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье, тепловой адсорбции

азота, просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния.

Регистрацию ИК-спектров наноалмазов проводили на кафедре физической химии химического факультета МГУ совместно с к.х.н., в.н.с. Поповым А.Г. Использовали ИК-Фурье-спектрометр «Nicolet IR200» («Thermo Scientific», США) с разрешением 2 см^{-1} . Для количественных оценок приготовили таблетки наноалмазов с KBr аналогичным образом: 1 мг наноалмаза смешали с 150 мг порошка KBr, высушенного в вакууме (при $100 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 мм рт. ст.) и растерли в агатовой ступке, а затем спрессовывали в таблетку. ИК-спектры регистрировали в области волновых чисел от 4000 до 400 см^{-1} .

Размер первичных частиц наноалмазов характеризовали с использованием микроскопа ультравысокого разрешения JEM-2100 F (JEOL, Япония) (оборудование ЦКП МГУ).

Определение удельной поверхности наноалмазов проводили методом тепловой адсорбции азота на кафедре физической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Размер частиц наноалмазов в гидрозолях и электрокинетический потенциал определяли с помощью метода динамического светорассеяния на приборе Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Malvern Instruments.

4.2.3. Получение меченных тритием веществ с помощью метода

Водный раствор вещества (антибиотик) или водную суспензию (наноалмазы, хитозан) наносили на стенки стеклянного реакционного сосуда, замораживали жидким азотом и удаляли растворитель лиофилизацией. Сосуд с готовой мишенью присоединяли к специальной вакуумной установке для работы с газообразным тритием и вакуумировали

до остаточного давления 0.01 Па. Затем систему заполняли протий-тритиевой смесью. Состав смеси определяли в независимых экспериментах, когда в качестве мишени использовали коричную кислоту и обработку атомами трития проводили до полного падения давления в системе. Радиоактивность мишени коричной кислоты, полученной в эксперименте с новой фасовкой трития (содержание трития не менее 97 %) По радиоактивности коричной кислоты после проведения реакции ($a_{\text{мишень}}$) и ее радиоактивности при работе с новой ампулой ($a_{0\text{мишень}}$) определяли содержание трития в данный момент - уравнение (13).

$$\%({}^3\text{H}) = \frac{a_{\text{мишень}}[\text{МБк}]}{a_{0\text{мишень}}[\text{МБк}]} \times 100\% \quad (13)$$

После заполнения системы тритием вольфрамовую нить, расположенную в центре реакционного сосуда, нагревали 10 секундными импульсами до 1900-2000 К. При проведении реакции с антибиотиками стенки сосуда охлаждали жидким азотом для предотвращения разложения вещества. При введении метки в наноалмазы и хитозан охлаждали азотом только дно реакционного сосуда. Такой подход позволяет вводить тритий с большей эффективностью, и подходит для веществ, не подвергающихся деструкции.

По окончании реакции остаточный газ откачивали, сосуд заполняли воздухом и отделяли системы. Вещество смывали водой со стенок, измеряли радиоактивность и проводили очистку от лабильного трития. Для этого вещество выдерживали в водном растворе или суспензии, а затем упаривали с помощью роторного испарителя. Вещество снова растворяли/суспендировали в воде, измеряли радиоактивность и снова высушивали. Процедуру повторяли до тех пор, пока радиоактивность не переставала меняться. Наноалмазы и хитозан использовали в полученном виде, а для антибиотиков проводили очистку с помощью хроматографии.

4.2.4. Анализ и очистка меченных тритием антибиотиков

[³H]левофлоксацин после удаления лабильной метки анализировали помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ. ТСХ анализ проводили в смеси хлороформ-метанол-аммиак в объемном отношении 10:12:5 ($R_f = 0,53$). Положение левофлоксацина на пластинке определяли с помощью УФ-лампы. При проведении очистки [³H]левофлоксацина зону левофлоксацина счищали, вещество с сорбента элюировали водой и метанолом. Дополнительную очистку препарата проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Waters Nova-Pak C18 (3,9×300 мм, размер гранул 4 мкм). Использовали градиентный режим элюирования 0,1%-ым водным раствором трифторуксусной кислоты и 0,1%-ым раствором трифторуксусной кислоты в ацетонитриле, скорость элюирования 0.5 мл/мин, левофлоксацин регистрировали по УФ-поглощению при 284 нм. Фракции, содержащие левофлоксацин, объединяли, упаривали с помощью роторного испарителя и растворяли вещество в воде.

Анализ и очистку [³H]амикацина от радиоактивных примесей проводили с помощью ТСХ. В качестве подвижной фазы использовали смесь диоксан – аммиак – вода в объемном отношении 1:1:3. Используя нерадиоактивный стандарт и нингидриновый реагент определяли положение меченого амикацина. Амикацин элюировали с силикагеля раствором 0,5 М соляной кислоты.

[³H]ванкомицин очищали с помощью ВЭЖХ на колонке Waters Nova-Pak C18 (3,9×300 мм, размер гранул 4 мкм), подвижная фаза 0.1%-ная трифторуксусная кислота (ТФУ) – 0.1%-ная ТФУ в ацетонитриле (линейный градиент от 0 до 80% органической фазы в течение 20 мин, скорость потока 0.5 мл/мин), детектирование при 280 нм. Фракции, содержащие ванкомицин, объединяли, упаривали с помощью роторного испарителя и растворяли вещество в воде.

4.3. Применение меченных тритием антибиотиков при получении адсорбционных комплексов с наноалмазами

4.3.1. Изучение адсорбции антибиотиков на наноалмазах

Для приготовления суспензий смешивали растворы меченого и немеченого антибиотика до достижения нужной концентрации и итоговой удельной радиоактивности 55,5 кБк/мл, добавляли суспензию наноалмаза, итоговый объем суспензии составлял 1 мл, масса наноалмазов составляла 1 мг. Суспензии инкубировали в течение 48 ч при 25°C. Затем растворы центрифугировали в течение 15 мин при 12100g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf). Отбирали 100 мкл раствора над осадком, смешивали с жидким сцинтиллятором UltimaGold (PerkinElmer) для измерения радиоактивности раствора методом ЖСС. Рассчитывали равновесную концентрацию вещества в растворе (c (мг/мл)) по уравнению (14).

$$c = \frac{I}{\varepsilon \cdot 60 \cdot V \cdot a_{уд}} \quad (14)$$

где I – скорость счета (имп/мин), ε – эффективность регистрации β -излучения трития, которую определяли с использованием калибровочной зависимости эффективности регистрации от отношения счета в энергетических каналах спектрометра, V – объем измеряемой аликвоты (100 мкл), $a_{уд}$ – удельная радиоактивность антибиотиков (Бк/мг).

Осадок наноалмазов декантировали, трижды промывали 1 мл воды, очищенной с помощью системы для очистки воды Milli-Q (Millipore). При третьей промывке проводили измерение электрокинетического потенциала комплекса наноалмаз-антибиотик с помощью динамического рассеяния света. Затем суспензии центрифугировали, осадок декантировали. Отмытый таким образом осадок заливали 1 мл сцинтилляционной жидкости Ultima Gold, диспергировали наноалмазы с помощью ультразвуковой ванны и оставляли на 1 сут. Измеряли радиоактивность отмытого осадка и по уравнению (15) определяли количество необратимо адсорбировавшегося вещества.

$$\Gamma = \frac{I - I_{\text{фон}}}{\varepsilon \cdot 60 \cdot m \cdot a_{\text{уд}}} \quad (15)$$

где $I_{\text{фон}}$ – скорость счета фона (имп/мин), m – масса наноалмазов в суспензии (мг).

При изучении кинетики адсорбции процедуры, описанные выше, проводили не через двое суток, а через определенные интервалы времени. При этом готовили несколько суспензий с одинаковой концентрацией сорбата.

4.3.2. Изучение десорбции антибиотиков с поверхности наноалмазов

Для определения устойчивости связывания антибиотиков с наноалмазами получали адсорбционные комплексы наноалмазы- ^3H антибиотик по методике, описанной в п. 2.3.1, но вместо стадии заливки осадка сцинтиллятором его заливали десорбирующим раствором и термостатировали в течение 48 ч. Затем, суспензии центрифугировали и измеряли радиоактивность раствора над осадком и осадка, как это описано в п. 2.3.1. Определяли по количеству вещества антибиотика оставшееся на поверхности наноалмазов по уравнению 3.

4.4. Получение и характеристика наноалмазных покрытий коллагеновой матрицы

4.4.1. Методика получения наноалмазных покрытий

Коллагеновые матрицы бычьего перикарда помещали в суспензию наноалмазов с концентрацией твердой фазы 1 мг/мл. Перемешивали с помощью орбитального шейкера в течение 7 часов и затем оставляли на ночь при 4°C. После этого матрицы доставали из суспензии, промывали водой, остатки воды удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Матрицы с нанесенным алмазным покрытием помещали в 0,9 % раствор хлорида натрия и хранили в таком виде при 4 °С.

4.4.2. Изучение механико-прочностных характеристик коллагеновых матриц

Эксперименты проводили в Институте элементоорганических соединений имени А. Н. Несмеянова РАН совместно с к.ф.-м.н. Чащиным И.С. и д.х.н. Васильевым В.Г. Механико-прочностные характеристики коллагеновых матриц получали прикладыванием нагрузки с помощью разрывной машины «LLOYD Instruments LR5R Plus». Образцы коллагеновых матриц перикарда имели форму полосок ($7,0 \times 0,5$ см²). Нагрузка прикладывалась к одному концу образца электродвигателем со скоростью 50 мм/мин, второй конец оставался неподвижен.

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.

4.4.3. Изучение антимикробных характеристик коллагеновых матриц

Эксперименты проводили в НМИЦ ССХ им. А. Н. Бакулева Минздрава России совместно с к.ф.-м.н. Чащиным И.С. и Анучиной Н.М. В качестве тест-культур были выбраны клинические штаммы грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) в концентрации 10^6 клеток/мл, вызывающие осложнения после проведения операции по замене клапана. Проводили оценку адгезии и выживаемости бактерий для модифицированных и контрольных образцов коллагеновых матриц перикарда в соответствии с ГОСТ Р ИСО 11737-1-2000 [267].

4.4.4. Нанесение хитозанового покрытия на биологические материалы

Хитозановые покрытия наносили на биологические материалы (коллагеновые матрицы и свиную аорту (см. п. 4.4.5)) наносили из раствора хитозана в условиях сверхкритического $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$. Эксперименты проводили в Институте элементоорганических соединений имени А. Н. Несмеянова РАН совместно с к.ф.-м.н. Чащиным И.С. согласно методике,

приведенной в работе [268–271].

4.4.5. Изучение in vivo устойчивости наноалмазных покрытий

Все in vivo эксперименты были проведены в Нмиц Ссх им. А. Н. Бакулева Минздрава России на основании директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Работы с животными проводили сотрудники НМИЦ ССХ им. А. Н. Бакулева Минздрава России Чащин И.С., Циганков Ю.М., Бритиков Д.В., Хугаев Г.А. и Бакулева Н.П. Проводили два типа экспериментов: (1) подкожное введение крысам линии Wistar и (2) подшивка в кондуите из свиной аорты и подшивка в аорту свиньи.

Для проведения экспериментов готовили образцы (коллагеновая матрица или кусочки свиной аорты) с наноалмазным покрытием согласно методике, описанной в п. 4.4.1, при этом использовали как наноалмазы, так и комплексы наноалмазы-антибиотик, полученные согласно методике, приведенной в п. 4.3.1 до стадии заливки сцинтиллятором. Далее на материал наносили хитозан, согласно п. 4.4.4. Тритиевая метка содержалась в одном из компонентов покрытия (наноалмазы, антибиотик или хитозан). Далее образцы вводили в тело животного. Оба эксперимента длились 4 месяца. Затем образцы изымали из тела животного и проводили определение состава покрытия и содержание кальция на образце.

4.4.6. Определение состава наноалмазных покрытий после эксплуатации животными

Материал после эксплуатации животным высушивали до постоянной массы и кипятили в концентрированной азотной кислоте до его полного растворения. Далее растворы остужали при -20°C в течение 30 мин. Далее добавляли воду, переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 30 мин при 12100g. Осадок наноалмазов декантировали и измеряли радиоактивность и радиоактивность

надосадочного раствора согласно методике, описанной в п. 4.3.1. Количество (n) меченного компонента на g материала определяли по его радиоактивности (суммарной в растворе и на поверхности) согласно уравнению (16).

$$n = \left(\frac{I_{\text{осадок}}}{\varepsilon_{\text{осадок}} \cdot 60 \cdot a_{\text{уд}}} + \frac{I_{\text{раствор}}}{\varepsilon_{\text{раствор}} \cdot 60 \cdot a_{\text{уд}}} \right) / m_{\text{материал}} \quad (16)$$

где $I_{\text{осадок}}$ и $I_{\text{раствор}}$ – скорость счета в осадке и растворе соответственно, $\varepsilon_{\text{осадок}}$ и $\varepsilon_{\text{раствор}}$ – эффективность регистрации β -излучения трития для осадка и раствора соответственно, $a_{\text{уд}}$ – удельная радиоактивность меченного компонента покрытия, $m_{\text{материал}}$ – масса материала.

4.4.7. Определение кальцинирования образцов после эксплуатации животными

Количественный анализ содержания металлов, в частности кальция, в покрытиях после эксплуатации животными проводили методом ИСП-АЭС на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова совместно с к.х.н. доцентом Михеевым И.С. Азотнокислый раствор после осаждения фазы наноалмазов анализировали с использованием спектрометра Agilent 720 (Agilent, Mulgrave, Виктория, Австралия) оснащенного низкопоточковой кварцевой неразборной горелкой с внутренним диаметром инжектора 2.4 мм («Glass Expansion», Австралия), двухходовой циклонической распылительной камерой (Agilent Technologies), концентрическим небулайзером (распылителем) Seaspray (Glass Expansion) и смесительным тройником для on-line ввода внутреннего стандарта (Glass Expansion).

Ряд из десяти калибровочных стандартов в диапазоне 0,1–100 ppm (мг/л) был приготовлен из одноэлементного CRM (сертифицированные эталонные материалы, Inorganic Ventures, Кристиансбург, Вирджиния, США). Длины волн были выбраны в соответствии со стандартом ISO

11885:2007. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор Sc с концентрацией 20 ppm с предварительным смешиванием в режиме онлайн для анализа раствора (не более 5%) для повышения воспроизводимости результатов. Контроль качества проводился путем анализа двух повторных растворов и измерений 29-элементного стандарта калибровки/контроля качества ИСП-АЭС с концентрацией 10 ppm.

ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АДСОРБЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ НАНОАЛМАЗЫ- АНТИБИОТИКИ

В работе получены адсорбционные комплексы нанодIAMAZOB с меченными тритием антибиотиками. В этих работах в основном использовали нанодIAMAZO SDND, которые характеризуются отрицательным электрокинетическим потенциалом в водной суспензии и удельной поверхностью 390 м²/г. Функциональный состав поверхности нанодIAMAZOB был охарактеризован с помощью ИК-спектрии. ИК-спектры будут представлены при обсуждении результатов в дальнейших разделах.

5.1. НанодIAMAZO-амикацин ¹

Полученный меченный тритием амикацин после хроматографической очистки имел удельную радиоактивность 74 ГБк/г. Адсорбционный эксперимент проводили в диапазоне концентраций антибиотика от 0,1 до 10 г/л. В данном случае определить равновесную адсорбцию, как разницу концентраций вещества в растворе до и после добавления сорбента, не удалось ввиду их малых различий. Поэтому в дальнейших обсуждениях указано количество вещества, оставшееся на поверхности нанодIAMAZOB после отмывки комплекса.

На рисунке 4 приведена зависимости концентрации амикацина на поверхности нанодIAMAZO, зависимости электрокинетического потенциала от поверхностной концентрации антибиотика и сравнительные ИК-спектры

¹ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shen T. Chernysheva M.G., Badun G.A., Popov A.G., Egorov A.V., Anuchina N.M., Chaschin I.S., Bakuleva N.P. Levofloxacin and Amikacin Adsorption on Nanodiamonds: Mechanism and Application Prospects // Colloids and Interfaces. 2022. Vol. 6, № 2. P. 1–15. (Импакт-фактор 2,5), 30 %.

наноалмаза, антибиотика и адсорбционных комплексов. Для описания изотерм адсорбции и количественного сравнения сорбционной способности наноалмазов по отношению к различным веществам использовали уравнения аналогичные уравнению Ленгмюра и Фрейндлиха (уравнения 5 и 6 соответственно).

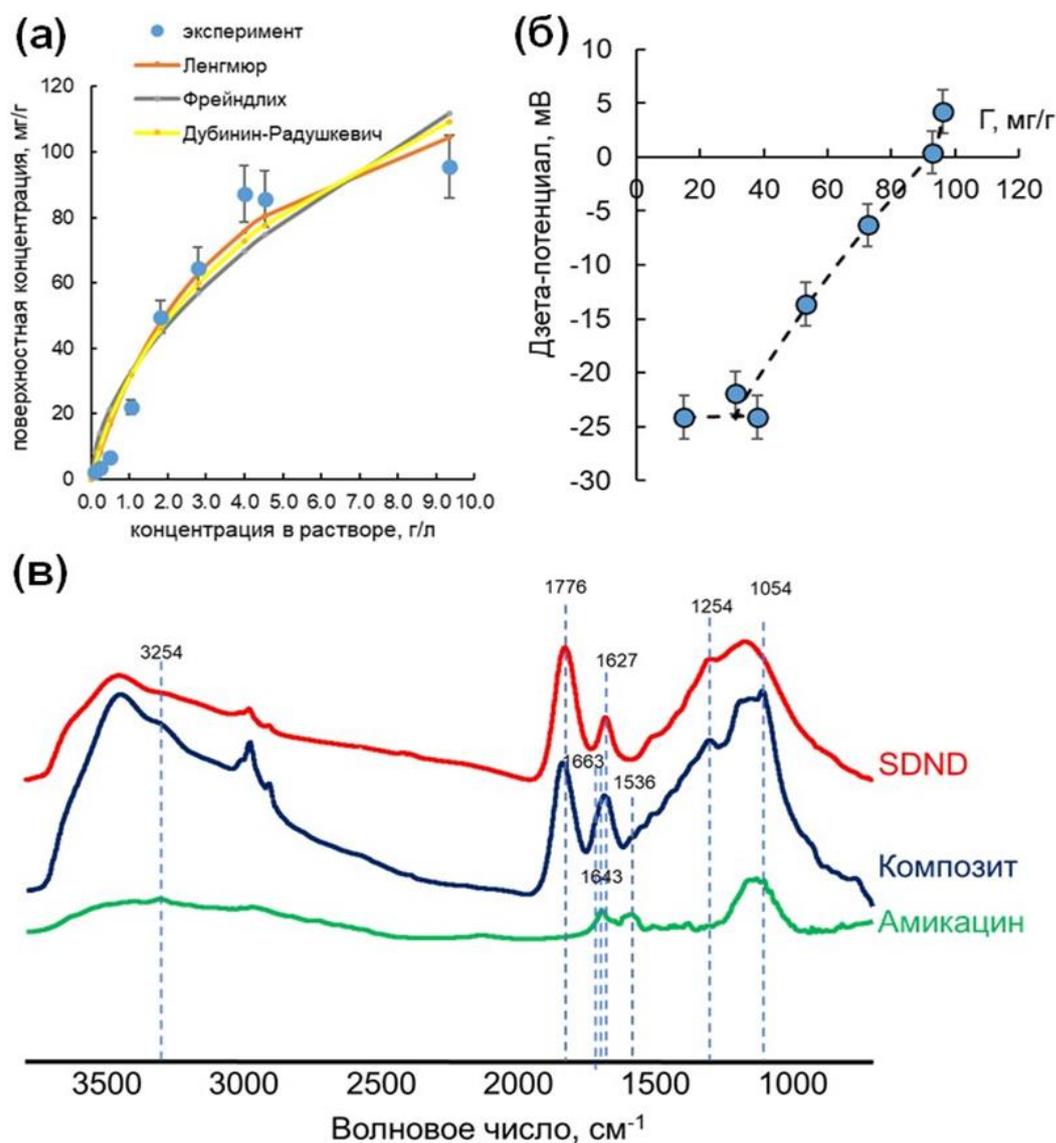


Рисунок 4. Характеристики комплекса SDND–ампицилин. (а) Зависимость поверхностной концентрации ампицилина от равновесной концентрации в водной фазе: экспериментальные данные показаны точками, а сплошными линиями – аппроксимации по уравнениям, аналогичным уравнениям Ленгмюра, Фрейндлиха и Дубинина-Радушкевича. (б) Зависимость дзета–потенциала SDND–ампицилин в водной суспензии от концентрации ампицилина на

поверхности. (в) ИК-спектры SDND, комплекса SDND–амикацин и амикацина.

$$\Gamma = \Gamma_{\text{макс}} \frac{K_L c}{1 + K_L c} \quad (17)$$

$$\Gamma = K_F c^{1/n} \quad (18)$$

Для определения энергетических параметров использовали модель адсорбции Дубинина-Радушкевича, аналогично тому, как это проводили для описания адсорбции левофлоксацина на других сорбентах [272].

$$\Gamma = \Gamma_{\text{макс}} e^{-\beta \varepsilon^2} \quad (19)$$

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, связанная с энергией адсорбции как

$$E = (2\beta)^{-\frac{1}{2}} \quad (20)$$

ε – потенциал Поляни, отражающий изотермическую работу переноса моля вещества из раствора к поверхности сорбента, который рассчитывается по уравнению:

$$\varepsilon = RT \ln \left(1 + \frac{1}{c} \right) \quad (21)$$

В табл. 5 приведены значения параметров уравнений Ленгмюра, Фрейндлиха и Дубинина-Радушкевича для описания зависимостей поверхностной концентрации амикацина на поверхности SDND.

Таблица 5. Параметры «необратимой» адсорбции амикацина на SDND. Размерности параметров приведены в примечании.

Антибиотик	Модель Ленгмюра			Модель Фрейндлиха			Модель Дубинина-Радушкевича			
	$\Gamma_{\text{макс}}^c$	K_L	R	K_F	n	R	B	$\Gamma_{\text{макс}}^c$	E	r
Амикацин	99	1,3	0,979	48	3,2	0,978	5×10^{-3}	159	11	0,987

Примечание: $\Gamma_{\text{макс}}$ (мг/г), K_L (л/г), K_F (мг/г), β (моль²/кДж²), E (кДж/моль)

Поверхностная концентрация амикацина увеличивалась с ростом концентрации в растворе и достигала постоянного значения (около 100 мг/г) при равновесной концентрации 3-4 г/л. Все модели адсорбции хорошо согласуются и описывают изотермы адсорбции (коэффициенты корреляции для каждой модели приведены в табл. 5). Для выявления вкладов физической и химической адсорбции в образование композита наноалмаз-антибиотик использовали параметры из модели Дубинина–Радушкевича: когда параметр E ниже 8 кДж/моль, то образование комплекса происходит по механизму физической адсорбции; если параметр E находится в диапазоне от 8 кДж/моль до 16 кДж/моль, процесс образования композита относится к химической адсорбции [273,274]. На основании значений энергии активации мы можем предположить, что в случае амикацина высокая возможность химической адсорбции [275]. Можно предположить образования солевых мостиков между карбоксильными поверхностными группами наноалмазов и аминогруппами амикацина. Поскольку амикацин использовался в форме сульфата амикацина, протонированные аминогруппы могут быть вовлечены в электростатические взаимодействия.

Для более точного установления характера взаимодействия между амикацином и поверхностью SDND провели анализ суспензий методом электрофоретического светорассеяния для определения электрокинетического потенциала частиц в воде. На рис. 4б показана

зависимость электрокинетического потенциала от поверхностной концентрации амикацина. При адсорбции амикацина происходило увеличение дзета-потенциала с ростом поверхностной концентрации амикацина и нейтрализация поверхностного заряда при поверхностной концентрации амикацина близкой к 100 мг/г. Полученные результаты указывают на то, что электростатическое притяжение является основным механизмом адсорбции.

Для характеристики поверхности комплексов наноалмаз-антибиотик использовали метод ИК-спектроскопии, для проведения которой использовали образцы с содержанием антибиотика около 100 мг/г (рис. 4в). Расшифровку ИК-спектров комплексов SDND-антибиотик проводили на основании работы [276].

На поверхности SDND можно видеть ангидридные группы (сигнал C=O связей при 1776 см^{-1}). Сигнал 1465 см^{-1} связан с деформационными колебаниями СН-связи в CH_3 -группах [277]. Полоса при 1254 см^{-1} отвечает колебаниям С-О связей в эпокси- и эфирных группах [276].

В ИК-спектре комплекса наноалмаз-амикацин появляется полоса 3254 см^{-1} обусловленная колебаниями аминогруппы, а также уширение полосы в области $1640\text{-}1630\text{ см}^{-1}$ также обусловленная колебаниями азотсодержащих групп амикацина, интенсивная полоса в области 1054 см^{-1} обусловлена колебаниями CH_2OH и С-О-С связей. Таким образом, образование комплекса между амикацином и поверхностью наноалмаза SDND происходит посредством образования водородных связей с функциональными группами поверхности наноалмаза, а также за счет электростатического притяжения между протонированными аминогруппами амикацина (использовали амикацин сульфат) и карбоксильными группами поверхности наноалмаза.

Для определения прочности связывания амикацина с SDND изучили их

десорбцию в 0,09% растворе NaCl и растворе бычьего сывороточного альбумина концентрации 40 мг/мл в 0,09% NaCl. После трехкратной промывки осадка к нему добавляли 1 мл десорбирующего раствора, перемешивали и оставляли при 25°C на 48 ч. После этого суспензии центрифугировали, измеряли радиоактивность раствора над осадком и самого осадка согласно методикам, описанным выше. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 6. Поверхностная концентрация амикацина на поверхности SDND до и после десорбции в 0.9% растворе NaCl и в растворе альбумина 40 г/л в физиологическом растворе.

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
73±13	58±15	30±8

Было найдено, что при комнатной температуре через 48 ч остаточное содержание амикацина составило 70%, десорбция амикацина возрастала в присутствии БСА – на поверхности наноалмазов оставалось 47%.

Комплекс SDND-амикацин с наибольшей поверхностной концентрацией наносили на поверхность коллагеновой матрицы бычьего перикарда и проводили тестирование антимикробных свойств полученного покрытия. В качестве тест-культур были выбраны клинические штаммы бактерий, вызывающие осложнения после проведения операции по замене клапана: грамположительные *Staphylococcus aureus* в концентрации 10^6 клеток/мл поскольку именно золотистый стафилококк является основным возбудителем инфекционного эндокардита [278,279].

Для интерпретации полученных данных мы использовали понятия индекс адгезии и индекс выживаемости. Под индексом адгезии или выживаемости мы понимаем среднее количество жизнеспособных клеток тест-культур, адгезированных или выживших на поверхности 1 тест-

образца. Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 7. Значения индексов адгезии и выживания *Staphylococcus aureus* для исследуемых покрытий.

Состав покрытия	Нет покрытий (контроль)	SDND	SDND-амикацин
Индекс адгезии (lg (КОЕ))	~5	~3.0	~2.5
Индекс выживаемости (lg (КОЕ))	~5	~1.5	~0.9

Фотографии, иллюстрирующие выживаемость бактерий в присутствии покрытий показаны на рисунке 5.



контрольный образец:
матрица без покрытия

контрольный образец:
матрица с покрытием SDND

матрица с покрытием
SDND-амикацин

Рисунок 5. Фотографии «выживаемости» бактерий *Staphylococcus aureus* на матрицах с разным покрытием.

Полученные результаты показывают, что пленка SDND на поверхности коллагеновых матриц, обладает высокой антимикробной активностью. Адгезия была на два порядка ниже, чем в эксперименте в присутствии SDND. Для обоих комплексов эффект был близким, что указывает на ключевую роль наноалмаза в качестве антиадгезионного покрытия. Длительное воздействие приводит к резкому снижению выживаемости бактерий в присутствии свободного SDND и особенно адсорбционных комплексов SDND-амикацин.

Можно оценить, что концентрация антибиотика в этих экспериментах

составляет единицы мкг на мл, в то время как для свободных лекарственных средств концентрация обычно на порядок выше [280]. Таким образом, адсорбция на наноалмазе снижает дозу антибиотиков, которые используются в качестве антимикробного средства. Следовательно, использование биоматериала на основе комплексов SDND с антибиотиками в качестве основы биопротезов позволит либо избежать, либо значительно сократить продолжительность и интенсивность применения антибиотиков в послеоперационном периоде, что критически важно с точки зрения развития антибиотикорезистентности у патогенов.

5.2. Наноалмазы-левофлоксацин ²

Удельная радиоактивность меченого тритием левофлоксацина, используемого в работе после хроматографической очистки составила Удельная радиоактивность полученных препаратов 218 ГБк/г. Адсорбционный эксперимент также как и для амикацина проводили в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 г/л.

На рисунке 6 показана зависимость адсорбции левофлоксацина на SDND.

² При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shen T. Chernysheva M.G., Badun G.A., Popov A.G., Egorov A.V., Anuchina N.M., Chaschin I.S., Bakuleva N.P. Levofloxacin and Amikacin Adsorption on Nanodiamonds: Mechanism and Application Prospects // Colloids and Interfaces. 2022. Vol. 6, № 2. P. 1–15. (Импакт-фактор 2,5), 30 %.

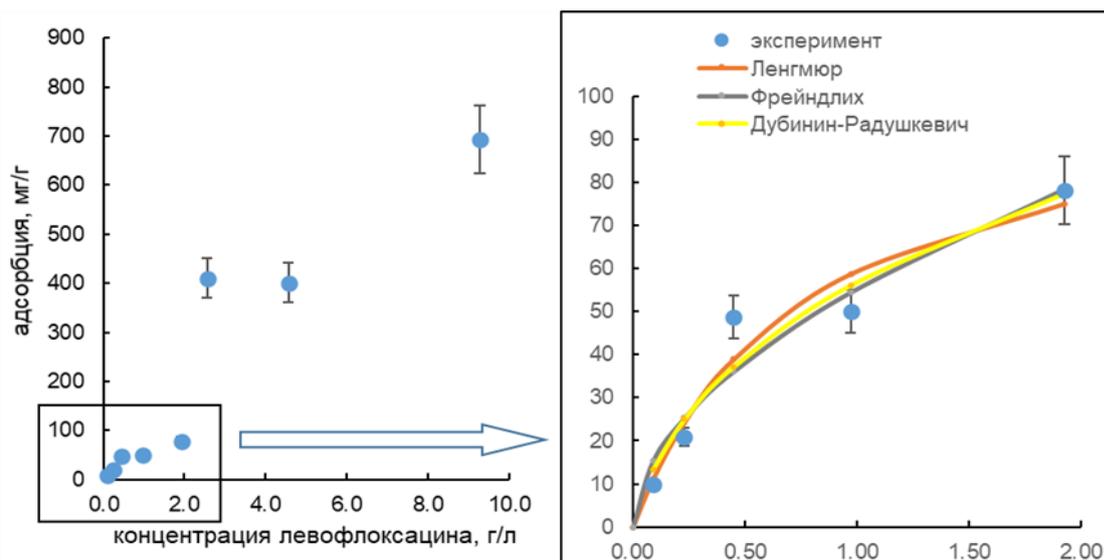


Рисунок 6. Изотерма адсорбции левофлоксацина на SDND.

С ростом концентрации левофлоксацина в растворе его адсорбция увеличивалась, достигала первого плато в области концентраций 1-2 мг/мл и далее продолжала расти. Для описания начального участка изотермы (до равновесной концентрации 2 г/л) использовали модели адсорбции Ленгмюра, Фрейдлиха и Дубинина-Радушкевича, аналогично тому, как это проводили для описания адсорбции левофлоксацина на других сорбентах [272]. В отличие от амикацина здесь было возможно определить равновесную адсорбцию и описать изотерму теми же уравнениями. Результаты расчета приведены на рисунке 7 сплошными линиями, а рассчитанные параметры приведены в табл. 8.

Таблица 8. Параметры адсорбции левофлоксацина (обратимая адсорбция) на SDND.

Модель Ленгмюра			Модель Фрейдлиха			Модель Дубинина-Радушкевича			
$\Gamma_{\text{макс}}$	K_L	R	K_F	N	R	V	$\Gamma_{\text{макс}}$	E	r
105	1,3	0,966	55	1,9	0,961	0,007	247	8,5	0,965

Примечание: $\Gamma_{\text{макс}}$ (мг/г), K_L (л/г), K_F (мг/г), β (моль²/кДж²), E (кДж/моль)

Полученное значение энергии активации адсорбции свидетельствует в пользу физической адсорбции левофлоксацина на SDND. Для определения количества лекарства, которое прочно связывается с

поверхностью SDND проводили отмывку комплекса наноалмаз-левофлоксацин водой и измеряли непосредственно радиоактивность осадка, используя сцинтилляционные жидкости, содержащие поверхностно-активные вещества, например, UltimaGold или OptiPhaseHiSafe.

На рисунке 7 приведены зависимости концентрации левофлоксацина «прочно» сорбированного на поверхности наноалмазов, зависимости электрокинетического потенциала от поверхностной концентрации антибиотика и сравнительные ИК-спектры наноалмаза, антибиотика и адсорбционных комплексов. В табл. 9 приведены значения параметров уравнений Ленгмюра, Фрейндлиха и Дубинина-Радушкевича для описания зависимостей поверхностной концентрации антибиотика на поверхности SDND.

Таблица 9. Параметры «необратимой» адсорбции левофлоксацина на SDND. Размерности параметров приведены в примечании.									
Модель Ленгмюра			Модель Фрейндлиха			Модель Дубинина-Радушкевича			
$\Gamma_{\text{макс}}^{\text{с}}$	K_L	R	K_F	N	r	B	$\Gamma_{\text{макс}}$	E	r
145	0,27	0,983	32,2	1,8	0,951	1×10^{-2}	244	7,2	0,970

Примечание: $\Gamma_{\text{макс}}$ (мг/г), K_L (л/г), K_F (мг/г), β (моль²/кДж²), E (кДж/моль)

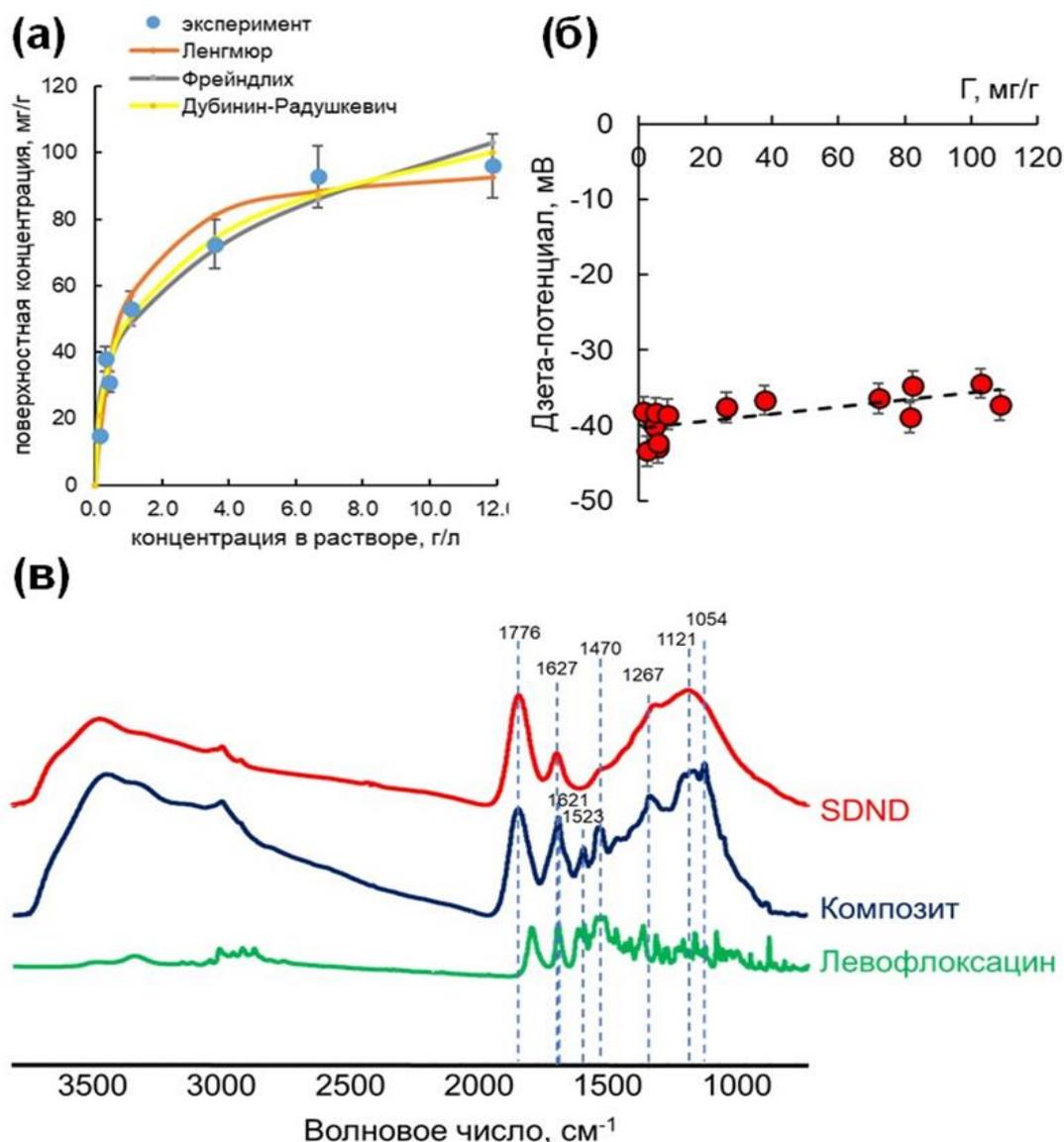


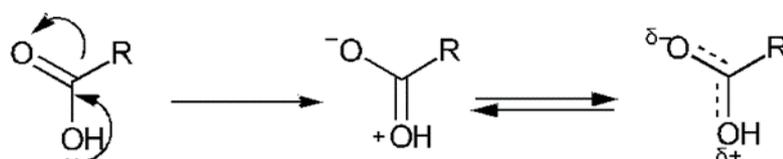
Рисунок 7. Характеристики комплекса SDND–левофлоксацин. (а) Зависимость поверхностной концентрации левофлоксацина от равновесной концентрации в водной фазе: экспериментальные данные показаны точками, а сплошными линиями – аппроксимации по уравнениям, аналогичным уравнениям Ленгмюра, Фрейндлиха и Дубинина-Радушкевича. (б) Зависимость дзета–потенциала SDND–левофлоксацина в водной суспензии от концентрации левофлоксацина на поверхности. (в) ИК-спектры SDND, комплекса SDND–левофлоксацин и левофлоксацина.

Все модели адсорбции хорошо согласуются и описывают изотермы адсорбции (коэффициенты корреляции для каждой модели приведены в таблице 9). На основании значений энергии активации можно

предположить, что SDND образует адсорбционные комплексы с левофлоксацином посредством физической адсорбции.

Электрокинетический потенциал комплексов наноалмазы-левофлоксацин был идентичен дзета-потенциалу исходного (не модифицированного) наноалмаза и не зависел от концентрации левофлоксацина на поверхности (рисунок 7б.). Для левофлоксацина, так и для амикацина наблюдались сходные значения адсорбции, в то время как механизмы адсорбции и сайты связывания, вероятно, различаются для молекулярных ионов разного заряда.

В ИК-спектре комплекса наноалмазы-левофлоксацин присутствует полоса 1621 см^{-1} , которая может быть обусловлена наличием конденсированной ароматической группы, а также ArCO^{2-} . Уширение этой полосы в область более высоких волновых чисел (1745 см^{-1}) может быть обусловлено образованием связи между C=O карбоксильной группы и поверхностью наноалмаза, при которой происходит делокализация электронной плотности:



Для определения прочности связывания левофлоксацина с SDND изучили его десорбцию в 0,9% растворе NaCl и растворе бычьего сывороточного альбумина концентрации 40 мг/мл в 0,09% NaCl (табл. 8).

Таблица 10. Поверхностная концентрация антибиотиков на поверхности SDND до и после десорбции в 0.9% растворе NaCl и в растворе альбумина 40 г/л в физиологическом растворе.

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
132±23	34±6	17±3

Было найдено, что при комнатной температуре через 2 сут остаточное

содержание левофлоксацина составляет 24%, а в присутствии БСА достигает 14% (табл. 10).

Для проведения анализа антимикробных свойств наноалмазных покрытий, содержащих левофлоксацин использовали комплекс с наибольшим содержанием антибиотика после отмывки. В табл. 11 приведены данные по индексам адгезии и выживаемости золотистого стафилококка в присутствии покрытий коллагенового материала (Под индексом адгезии или выживаемости мы понимаем среднее количество жизнеспособных клеток тест-культур, адгезированных или выживших на поверхности 1 тест-образца).

Таблица 11. Значения индексов адгезии и выживания *Staphylococcus aureus*

Состав покрытия	Нет покрытий (контроль)	SDND	SDND- левофлоксацин
Индекс адгезии (lg (КОЕ))	~5	~3.0	~2.9
Индекс выживаемости (lg (КОЕ))	~5	~1.5	~1.1

Полученные результаты показывают, что пленка SDND на поверхности коллагеновых матриц, обладает высокой антимикробной активностью. Адгезия была на два порядка ниже, чем в эксперименте в присутствии SDND. Для обоих комплексов эффект был близким, что указывает на ключевую роль наноалмаза в качестве антиадгезионного покрытия. Длительное воздействие приводит к резкому снижению выживаемости бактерий в присутствии свободного SDND и особенно адсорбционных комплексов SDND-антибиотик.

5.3. Наноалмазы-ванкомицин

Введение тритиевой метки в ванкомицин имеет свои особенности поскольку ванкомицин совмещает в своей структуре циклический пептид, а также глюкозу и оксibenзойную кислоту (рисунок 3). Если условия введения тритиевой метки в амикацин и левофлоксацин уже были

отработаны в предыдущих работах [281], то введения метки в ванкомицин проведена впервые.

5.3.1. Получение меченного тритием ванкомицина с помощью метода термической активации трития ³

Для введения трития в ванкомицин методом термической активации использовали результаты оптимизации условий (температура атомизатора, давление газа в системе, время воздействия и температура мишени), отработанных на аминокислотах и сахарах [282–284]. Введение метки проводили при температуре вольфрамовой проволоки 1820 К в течение 10 с и охлаждая мишень до 77 К. Давление трития в системе было 0,5 Па. В таких условиях доля трития в лабильных положениях составила около 50%, а радиоактивность побочных продуктов реакции после удаления лабильной метки была в диапазоне от 34 до 55%. Поскольку атомы трития взаимодействуют преимущественно с поверхностным слоем мишени, уменьшение ее толщины приводит к увеличению удельной радиоактивности. В данной работе исследовали влияние массы мишени ванкомицина, которую меняли от 0,05 до 0,38 мг (средняя толщина слоя вещества на стенках реакционного сосуда от 2,5 до 19 мг/м²) на его удельную радиоактивность. Зависимость удельной радиоактивности [³H]ванкомицина от массы мишени показана на рисунке 8.

³ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Шэнь Т., Чернышева М. Г., Бадун Г. А. Получение меченного тритием ванкомицина и исследование его адсорбции на наноалмазах // Радиохимия. 2023. Т. 65, № 6. С. 575–583. (Импакт-фактор 0,833), 30 %.

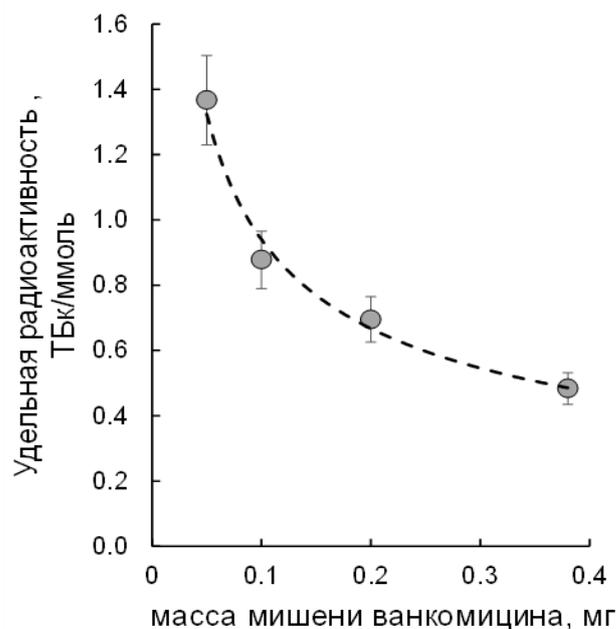


Рисунок 8. Зависимость удельной радиоактивности [³H]ванкомицина от массы препарата, использованного для приготовления мишени.

Показано, что величина удельной активности [³H]ванкомицина в указанных условиях снижается от 1,37 ТБк/ммоль до 0,48 ТБк/ммоль при увеличении массы мишени от 0,05 до 0,38 мг. Необходимо отметить, что при наименьшей массе мишени произошло уменьшение химического выхода [³H]ванкомицина до 48%, а доля радиоактивности в побочных продуктах возросла до 55%.

Удельную активность препарата можно увеличить при использовании сосуда с шероховатыми стенками, удельная поверхность которых примерно в 2 раза больше гладких. Однако в таком сосуде удельная активность [³H]ванкомицина при массе мишени 0,1 мг наоборот снизилась с 0,88 ТБк/ммоль (гладкие стенки) до 0,46 ТБк/ммоль (шероховатые стенки). Вероятно, это связано с тем, что межмолекулярные взаимодействия в ванкомицине предпочтительнее, чем взаимодействие ванкомицин-стекло. 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.

Полученных значений удельной радиоактивности ванкомицина хватило для проведения адсорбционных экспериментов на наноалмазах.

5.3.2. Получение и анализ адсорбционных комплексов наноалмазов с ванкомицином ⁴

При получении адсорбционных комплексов наноалмазов с ванкомицином с наноалмазами исследовали влияние функционального состава наноалмазов на их способность связываться с ванкомицином. В этих исследованиях использовали два типа наноалмазов, сравнение свойств которых приведено далее. Наноалмазы SDND (PlasmaChem), которые были использованы при исследовании адсорбции амикацина и левофлоксацина и представляют собой водную суспензию 100 мг/мл, разводили водой до нужной концентрации. Из порошка наноалмазов (PlasmaChem) (далее будут обозначены как ДНА) готовили водную суспензию (5 мг/мл) ультразвуковой обработкой с помощью ультразвуковой ванны Град (Россия). По данным метода низкотемпературной адсорбции азота удельная поверхность наноалмазов составляет 390 и 250 м²/г для SDND и ДНА, соответственно. Значения электрокинетического потенциала водных

⁴ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Шэнь Т., Чернышева М. Г., Бадун Г. А. Получение меченного тритием ванкомицина и исследование его адсорбции на наноалмазах // Радиохимия. 2023. Т. 65, № 6. С. 575–583. (Импакт-фактор 0,833), 30 %.

суспензий составили $+21 \pm 2$ и -41 ± 5 мВ для ДНА и SDND, соответственно. Для ДНА рI составляет 11,4, в то время как для SDND в диапазоне рН от 3 до 13 изоэлектрическая точка отсутствует.

Исследовали кинетику адсорбции ванкомицина на наноалмазах. Эксперимент проводили при концентрации ванкомицина 0,7 г/л (удельная радиоактивность ванкомицина в суспензии составляли 37 МБк/г) и концентрации наноалмазов 1 мг/мл. В случае ванкомицина было возможно надежно определить равновесную адсорбцию, поэтому при анализе кинетики следили как за величиной, найденной по разнице начальной концентрации и концентрации вещества в растворе в настоящий момент времени, так и за количеством вещества, которое остается на поверхности наноалмазов после отмывки осадка.

На рисунке 9 показана найденная из изменения концентрации ванкомицина в растворе.

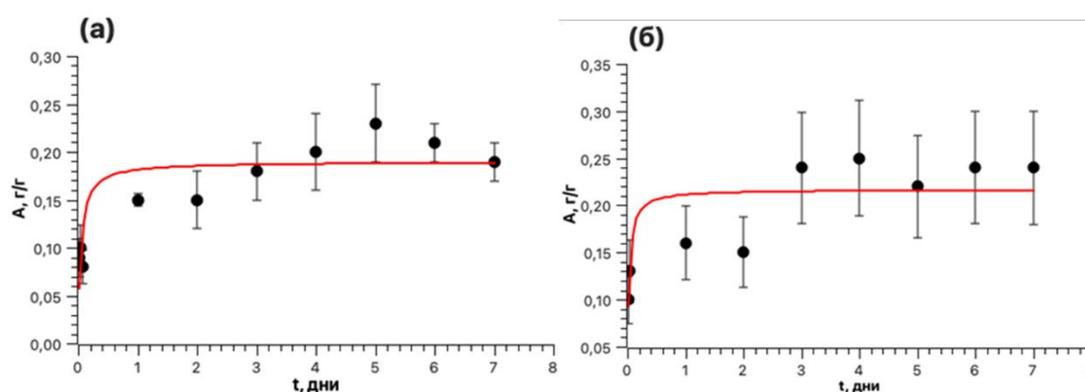


Рисунок 9. Зависимость адсорбции ванкомицина на наноалмазах ДНА (а) и SDND (б) от времени.

Кинетические зависимости адсорбции на наноалмазах обоих типов были описаны уравнением псевдо-второго порядка [285]:

$$A = \frac{A_{\text{равн}}^2 \times k_2 \times t}{1 + A_{\text{равн}} \times k_2 \times t} \quad (22)$$

Подбор параметров осуществляли с помощью программного пакета SciDAVis с использованием алгоритма Левенберга-Марквардта с допуском 0,0001. Результат аппроксимации показан на рисунке 9 сплошной линией.

Параметры уравнения псевдо-второго порядка приведены в табл. 12.

Таблица 12. Параметры уравнения кинетики адсорбции псевдо-второго порядка

Тип наноалмазов	$A_{\text{равн}}$, г/г	k_2 , день ⁻¹	R^2
ДНА	$0,19 \pm 0,01$	$114,7 \pm 51,0$	0,974
SDND	$0,22 \pm 0,01$	$174,4 \pm 97,2$	0,973

В течение первых суток адсорбция достигает постоянного значения около 0,20 г/г. Важно подчеркнуть, что параметры кинетики адсорбции для обоих типов наноалмазов оказались близкими. Причина может быть связана с тем, что адсорбция ванкомицина на поверхности наноалмазов происходит посредством образования связей между сорбатом и связанными с поверхностью молекулами воды. Отметим, что серьезные изменения происходят с ванкомицином в воде при концентрациях более 20 г/л и времени хранения более суток [286].

Зависимость адсорбции ванкомицина на наноалмазах после промывки образца и измерения непосредственно радиоактивности осадка комплекса наноалмазов с ванкомицином приведены на рисунке 10.

Кинетические зависимости для обоих типах наноалмазов имели схожий вид и описывались уравнением псевдо-первого порядка:

$$A = A_{\text{равн}}(1 - e^{-k_1 t}) \quad (32)$$

Параметры уравнения псевдо-первого порядка приведены в таблице 9, результаты аппроксимации показаны на рисунке 8 сплошной линией.

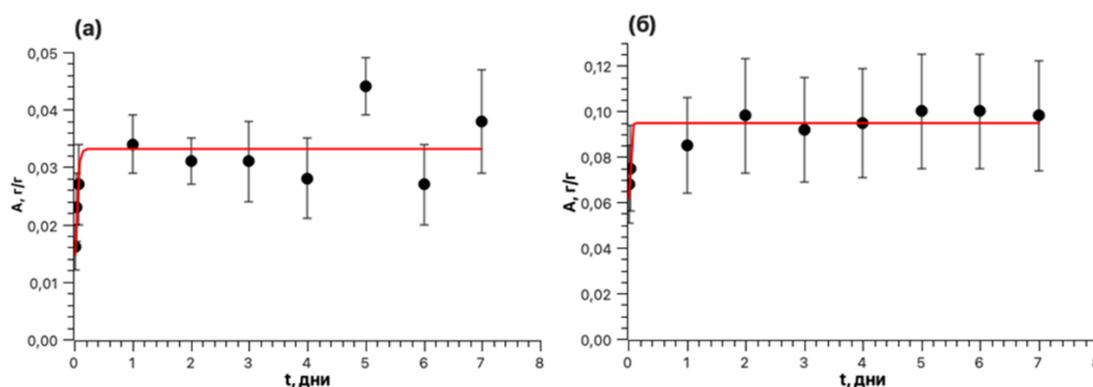


Рисунок 10. Зависимость прочно связанного ванкомицина на наноалмазах ДНА (а) и SDND (б) от времени.

Таблица 13. Параметры кинетического уравнения псевдо-первого порядка для прочно связанного ванкомицина с нанодиамазамаи.

Тип нанодиамазамаи	$A_{равн}$, г/г	k_1 , день ⁻¹	R^2
ДНА	0,033 ± 0,002	29,2 ± 9,1	0,977
SDND	0,095 ± 0,002	53,1 ± 8,6	0,996

Пределное значение количества ванкомицина, прочно связанного с поверхностью нанодиамазамаи обоих типов, достигается за первые сутки адсорбции. Принимая во внимание размер молекулы ванкомицина (3,2 × 2,2 нм) [287] значение остаточного количества ванкомицина на SDND близко к полному заполнению поверхности молекулами ванкомицина с плотной упаковкой. В то время как покрытие ДНА уменьшается в 4,5-5 раз и в три раза меньше, чем на SDND.

Десорбцию ванкомицина с поверхности нанодиамазамаи изучали в воде, в 0,9% растворе хлорида натрия и в растворе бычьего сывороточного альбумина 40-г/л в 0,9% NaCl в течение 10 суток при 25°C. Результаты приведены в табл. 14.

Таблица 14. Десорбция ванкомицина с поверхности нанодиамазамаи.

Десорбирующий раствор	Количество ванкомицина на поверхности нанодиамазамаи после десорбции, г/г	
	ДНА	SDND
Вода	0,030	0,009
0,9% NaCl	0,033	0,010
Сывороточный альбумин 40-г/л в 0,9% NaCl	0,022	0,003

Из результатов, приведенных в таблице 10 видно, что с нанодиамазамаи ДНА ванкомицин не удаляется в присутствии десорбирующих веществ, в то время как с поверхности SDND ванкомицин легко десорбируется. Можно предположить, что удержание ванкомицина на ДНА происходит за счет электростатического притяжения карбоксильной группы ванкомицина и положительных групп на поверхности ДНА.

Для подтверждения выдвинутого предположения о механизме

образования связи ванкомицина с поверхностью наноалмазов провели эксперименты, в которых получили изотермы адсорбции ванкомицина на ДНА проводя адсорбцию из воды и 0,028 М фосфатных буферов с рН 2,7 и 6,7.

На рис. 11 показана адсорбция ванкомицина на наноалмазах по истечении 3 суток при проведении эксперимента из воды и фосфатного буфера, которую определили по изменению концентрации раствора, и зависимости количества ванкомицина, остающегося в составе комплекса с наноалмазами после промывки водой, от концентрации адсорбционного раствора перед отмывкой.

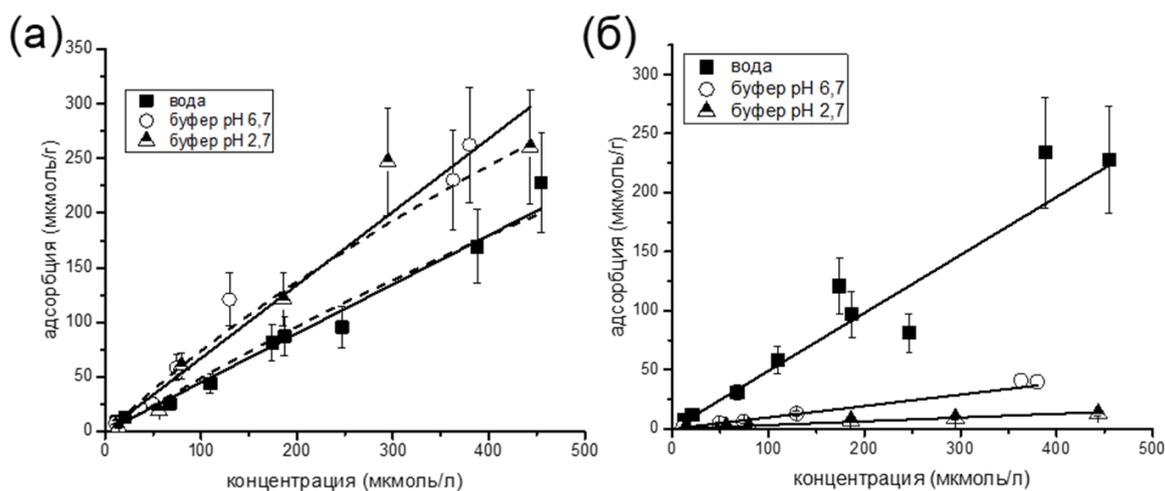


Рисунок 11. Изотермы равновесной адсорбции ванкомицина на наноалмазах (а) и остаточного количества после отмывки водой (б). Адсорбцию ванкомицина проводили из воды и фосфатного буфера рН 6,7 и 2,7. Пунктирными линиями показаны результаты расчета по модели Дубинина-Радушкевича (пунктир) и по линейной модели (сплошная линия) (см. текст).

Таблица 15. Константы уравнений Дубинина-Радускевича и линейной модели при описании изотерм адсорбции ванкомицина на наноалмазах.

Условия адсорбции (25°C)	Модель Дубинина-Радускевича (равновесная адсорбция)				Линейная модель (равновесная адсорбция ванкомицина)		Линейная модель (остаточное количество ванкомицина)	
	$\Gamma_{\text{макс}}$	β , моль ² /кДж ²	E , кДж/моль	R	K	r	K	r
Вода	5,2	0,0090	7,47	0,925	$0,45 \pm 0,02$	0,981	$0,45 \pm 0,01$	0,973
буфер рН 6,7	6,2	0,0086	7,63	0,939	$0,67 \pm 0,03$	0,989	$0,10 \pm 0,01$	0,994
буфер рН 2,7							$0,030 \pm 0,001$	0,964

Оказалось, что равновесная адсорбция ванкомицина при адсорбции из буфера при двух значениях рН была выше примерно в полтора раза, чем из воды. В этом эксперименте адсорбция ванкомицина из воды была практически необратимой и не изменялась при отмывке. При проведении кинетического эксперимента отмывку проводили более тщательно с использованием ультразвуковой обработки водных суспензий.

При адсорбции из буферного раствора наблюдалось существенное уменьшение содержания ванкомицина уже при отмывке водой без ультразвука: для буфера рН 2,7 адсорбция снижалась в 22 раза, а для буфера рН 6,7 - в 7 раз. Такое различие может быть связано с различием в механизмах адсорбции. Как для равновесной изотермы, так и для зависимости необратимой адсорбции от концентрации насыщающего раствора достаточно хорошо описываются линейным уравнением, аналогичным уравнению Генри. Коэффициенты уравнения приведены в

табл. 11. Кроме того изотермы равновесной адсорбции описали с помощью модели Дубинина-Радускевича (уравнения 7-9). Поскольку полученные значения свободной энергии (E) ниже 8 кДж/моль, то можно предположить физический характер адсорбции ванкомицина на нанодиамазах как из воды, так и из фосфатного буфера, что подтверждает экспериментальные данные.

Для определения форм существования ванкомицина в воде при разных значениях рН провели его потенциометрическое титрование. Распределение форм ванкомицина показано на рис. 12. При расчете использовали константы протонирования шести групп в составе ванкомицина (1 карбоксильная, 3 фенольные, 2 аминогруппы), приведенные в работе [288].

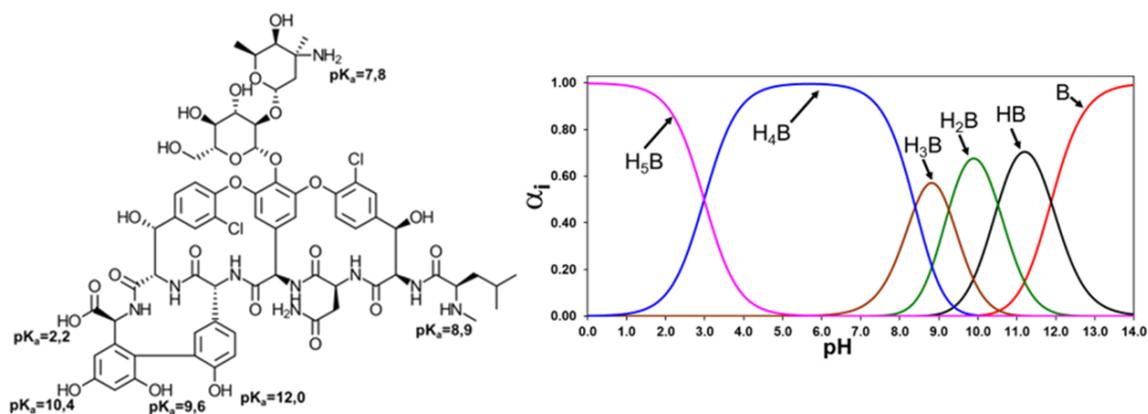


Рисунок 12. Распределение форм ванкомицина при разных значениях рН.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при исследуемых значениях рН у ванкомицина депротонирована карбоксильная группа, остальные группы не несут заряда.

Для нанодиамазов и комплексов нанодиамазов с ванкомицином определили электрокинетический потенциал. Для суспензии нанодиамазов в воде при рН 6,5 электрокинетический потенциал составлял 25 мВ и не изменялся после адсорбции ванкомицина. Приготовление суспензии нанодиамазов в фосфатном буфере приводила к снижению электрокинетического потенциала до 5 и 14 мВ при рН 6,7 и 2,7. Снижение электрокинетического потенциала связано с тем, что поверхность

наночастиц покрывали фосфатные группы, входящие в состав буфера. В результате снижалась агрегативная устойчивость наночастиц, но одновременно повышалась адсорбция ванкомицина за счет взаимодействия аминогрупп и фосфатными группами [289]. Однако при промывке водой фосфатные группы удалялись с поверхности наноалмазов вместе с молекулами ванкомицина, и только небольшая часть ванкомицина оставалась в составе комплекса.

На следующем этапе образцы положительно и отрицательно заряженных наноалмазов (SDND и ДНА) с наибольшим содержанием ванкомицина (адсорбция 1 сут., отмывка водой) проанализировали методом ИК-спектроскопии, а также проверили их антимикробные свойства. На рисунках 13 и 14 приведены ИК-спектры комплексов ванкомицина с наноалмазами.

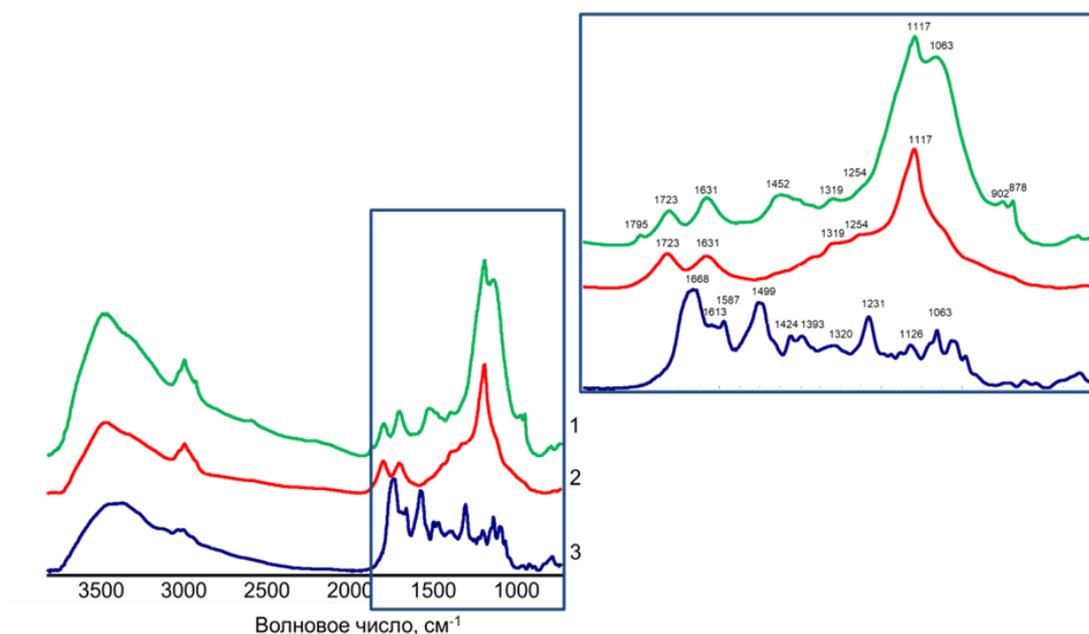


Рисунок 13. ИК-спектры ДНА (1), комплекса ДНА-ванкомицин (2) и ванкомицина (3).

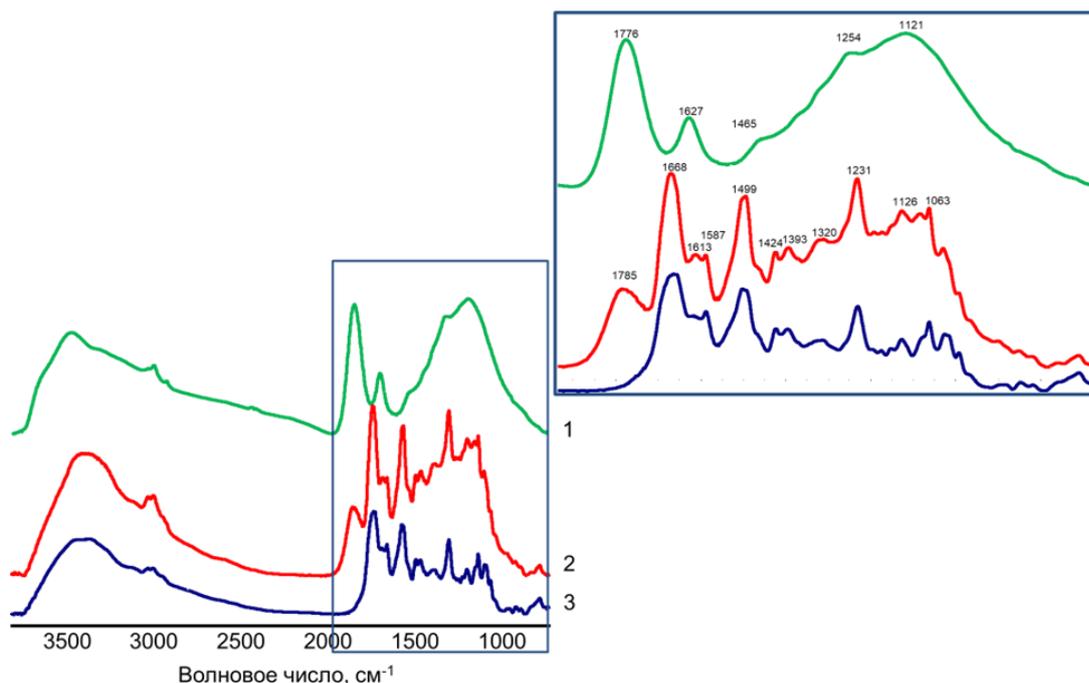


Рисунок 14. ИК-спектры SDND (1) комплекса SDND-ванкомицин (2) и ванкомицина (3).

В ИК-спектре наноалмазов ДНА полоса 1795 см^{-1} относится к колебаниям $\text{C}=\text{O}$ групп в ангидридных и лактонных группах на поверхности наноалмазов [276]. Полоса при 1723 см^{-1} относится к колебаниям $\text{C}=\text{O}$ групп в карбонилах. Сигнал при 1630 см^{-1} объясняется наличием связанной с поверхностью водой. Полоса при 1452 см^{-1} относится к деформационным колебаниям CH -связей в CH_2 -группах (sp^2 и sp^3) [277]. Сигналы 1319 и 1254 см^{-1} относятся к валентным колебаниям $\text{C}-\text{C}$ связей в sp^2 и sp^3 состояниях. Сигнал 1117 см^{-1} относится к асимметричным колебаниям $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ связей, а при 1063 см^{-1} – к валентным колебаниям $\text{C}-\text{O}$ связи в гидроксильных или эфирных группах [276]. Сигналы при 902 см^{-1} и 878 см^{-1} относятся к колебаниям CH -связей в $\text{CH}_2(\text{sp}^2)$ -группах и графитизированной части поверхности, соответственно [277].

Как отмечалось ранее на поверхности SDND присутствуют ангидридные группы (сигнал $\text{C}=\text{O}$ связей при 1776 см^{-1}), CH_3 -группы (1465 см^{-1} деформационные колебания CH -связи). Полоса при 1254 см^{-1} отвечает колебаниям $\text{C}-\text{O}$ связей в эпокси- и эфирных группах [276].

Расшифровка ИК-спектра ванкомицина подробно приведена в работах [290,291]. Сигнал при 1668 см^{-1} относится к колебаниям С=О связи амида I, сигналы в области 1587 и 1499 см^{-1} связаны с колебанием связей в ароматических кольцах. Также о колебаниях связей С=C в арильных фрагментах свидетельствует полоса 1613 м^{-1} . Сигналы при 1424 и 1393 см^{-1} относятся к симметричным колебаниям CO_2^- -группы [290,292]. Сигнал 1320 см^{-1} является типичной для аминокислот, но происхождение ее не определено. Сигнал при 1231 см^{-1} обусловлен колебаниями фенольных групп [292].

При образовании комплексов с наноалмазами SDND в ИК-спектре комплекса сохраняются сигналы, характерные для ванкомицина связанные с колебаниями амида I и ароматических фрагментов, которые отсутствуют в спектре исходного алмаза и подтверждают наличие вещества на его поверхности. В ИК-спектре комплекса ДНА-ванкомицин напротив, присутствуют сигналы, характерные для наноалмазов. При этом исчезают полосы 1063 , 902 и 878 см^{-1} , что позволяет предположить связывание небольшого количества ванкомицина с графитизированными частями положительно заряженных наноалмазов.

Таким образом, данные ИК-спектроскопии подтвердили данные радиохимического метода о существенно меньшем количестве ванкомицина на ДНА по сравнению с SDND, поверхность которых полностью покрыта слоем ванкомицина.

Для проверки антимикробных свойств комплекса было необходимо получить покрытия коллагеновых матриц бычьего перикарда слоем комплексов наноалмаз-ванкомицин. Поэтому с помощью меченных тритием наноалмазов определили количество комплекса, которое адсорбируется на поверхность коллагеновой матрицы. Было показано, что на поверхность матрицы может быть осаждено $5,6 \pm 1,7$ мг/г комплекса с SDND и $8,6 \pm 1,1$ мг/г комплекса с ДНА. Эти величины больше, чем ранее

полученные для положительно и отрицательно заряженных наноалмазов, поскольку были использованы более тонкие матрицы, по-видимому, лучше сорбирующие наноалмазы. Откуда был сделан вывод, что содержание ванкомицина на поверхности матриц составляет 0,27 и 0,56 мг ванкомицина на 1 г коллагеновой матрицы для комплексов с ДНА и SDND, соответственно. Это значение ниже, чем при нанесении ванкомицина из раствора в угольной кислоте под давлением [293]. Однако результаты исследования антимикробных свойств по отношению к отношению к золотистому стафилококку показали схожие результаты по адгезии (табл. 14). Выживаемость оказалась выше, чем в случае ванкомицина в составе покрытий с гиалуроновой кислотой и хитозаном, но на 3 порядка меньше, чем в случае контрольного образца.

Таблица 16. Антимикробные характеристики адсорбционных комплексов наноалмазов с ванкомицином.

Тип комплекса	Индекс адгезии, (lg КОЕ)	Индекс выживаемости, (lg КОЕ)
Контрольный образец без наноалмазов	≈ 5	≈ 5
ДНА-ванкомицин	2,4	2,1
SDND-ванкомицин	2,4	2,2

Таким образом, использование наноалмазов позволяет использовать меньшее количество антибиотика для достижения необходимого результата. Однако если сравнить антимикробные характеристики покрытий, содержащих амикацин и левофлоксацин, то они окажутся примерно на порядок выше, чем в случае ванкомицина. Поэтому именно покрытия с амикацином и левофлоксацином использовались в экспериментах с животными.

ГЛАВА 6. АНАЛИЗ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИЦ С НАНОАЛМАЗНЫМ ПОКРЫТИЕМ

6.1. Определение количества наноалмазов в покрытии ⁵

В процессе эксплуатации биологический протез клапана сердца испытывает большие ударные нагрузки со стороны кровяного потока, поэтому коллагеновая матрица перикарда биологического протеза должна обладать достаточной прочностью, но при этом для обеспечения функциональности клапана важна ее эластичность. Для создания материала на основе коллагена бычьего перикарда предлагается использовать наноалмаз для улучшения механико-прочностные характеристики, а также использовать его как носителя антисептического средства ввиду его функционально развитой поверхности [141,294,295]. Для предотвращения отложения кальция на поверхности протеза биоткань с нанесенным наноалмазным слоем должна быть покрыта хитозаном, что может быть сделано в условиях сверхкритического CO₂ [269].

Количество наноалмазов на поверхности матрицы определяли с использованием наноалмазов, меченных тритием, которые получали с помощью метода термической активации трития [296]. Далее матрицы растворяли и измеряли радиоактивность фазы наноалмазов.

В этом разделе работы использовали наноалмазы с положительным электрокинетическим потенциалом в воде (ДНА), а также их подвергали отжигу на воздухе при 450°C в течение 1 ч (ДНА-O₂). Как было показано

⁵ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, I.S. Chaschin, G.A. Badun, V.G. Vasil'ev, I.V. Mikheev, T. Shen, M.A. Sinolits, N.P. Bakuleva. Novel nanodiamond coatings for durable xenogenic heart valve prostheses: Mechanical properties and in vivo stability // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2022. Vol. 656. P. 130373. (Импакт-фактор 4.9%), 25 %.

ранее такая обработка приводит к небольшому окислению поверхности (электрокинетический потенциал становится отрицательным), но при этом СН-группы сохраняются на поверхности, что позволяет вводить тритиевую метку в «отожженный» наноалмаз практически не меняя его характеристики [233].

В данной работе была разработана методика определения количества наночастиц на поверхности матрицы или ткани. Материал с нанесенным покрытием из [³H]наноалмазов растворяли кипячением в концентрированной азотной кислоте, далее разбавляли суспензию водой, центрифугировали и измеряли радиоактивность раствора и осадка. Введение стадии разбавления позволило проводить измерения радиоактивности трития с помощью метода жидкостной сцинтилляционной спектрометрии с использованием кислотостойких сцинтилляторов (например, GoldStar (Triskem)) с высокой эффективностью регистрации. Было обнаружено, что 98-99 % радиоактивности находится в фазе осадка наноалмазов. Это связано с отсутствием изотопного обмена с жидкой фазой даже в условиях кипячения в кислоте, когда возможно окисление поверхности наноалмазов и подтверждает, что при метке наноалмазов методом термической активации трития радиоактивный водород находится именно в СН-положениях поверхности наноалмазов.

Оказалось, что на поверхности коллагеновой ткани окисленный наноалмаз адсорбируется в меньшей степени по сравнению с неокисленными наноалмазами. Величины удельных покрытий в единицах мг наноалмаза на г матрицы приведены в табл. 15.

Таблица 17. Удельное покрытие ксеноткани наноалмазами.

Тип наноалмазов	ДНА	ДНА-O ₂
Количество на поверхности матрицы, мг/г	4.0±1.2	1.5±1.0

Для проведения механических испытаний на поверхность коллагеновых матриц бычьего перикарда наносили покрытия из

нерадиоактивных наноалмазов ДНА и ДНА-О₂ по описанной выше методике. Далее на образцы с нанесенным наноалмазым покрытием наносили хитозан из раствора в Н₂О/СО₂ [297]. В независимых экспериментах с использованием меченного тритием хитозана было показано, что наличие на поверхности биоткани наноалмазного покрытия как положительного, так и отрицательного, не влияет на количество хитозана на поверхности, которое составляет 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. Матрицы с двойным покрытием анализировали на механико-прочностные характеристики. с помощью разрывной машины «LLOYD Instruments LR5R Plus». Образцы коллагеновых матриц перикарда имели форму полосок (7.0×0.5 см). Нагрузка прикладывалась к одному концу образца электродвигателем со скоростью 50 мм/мин, второй конец оставался неподвижен [270].

6.2. Механические свойства материалов с покрытием наноалмазы-хитозан ⁶

Механические свойства коллагенового материала являются одним из важнейших факторов определяющим долговечность 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

⁶ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, I.S. Chaschin, G.A. Badun, V.G. Vasil'ev, I.V. Mikheev, T. Shen, M.A. Sinolits, N.P. Bakuleva. Novel nanodiamond coatings for durable xenogenic heart valve prostheses: Mechanical properties and in vivo stability // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2022. Vol. 656. P. 130373. (Импакт-фактор 4.9%), 25 %.

поверхности наноалмаза (не окисленный, окисленный). Отметим, что результат измерения механических характеристик коллагеновой ткани зависит от способа нарезания полосок для анализа (вдоль или поперек коллагеновых фибрилл) [298,299]. Поэтому в настоящей работе проанализированы оба типа образцов, отмеченные значками «П» и «Л» для образцов, нарезанных вдоль или поперек коллагеновых фибрилл соответственно.

Тестирование механико-прочностных свойств контрольных образцов коллагеновых матриц перикарда и образцов коллагеновых матриц перикарда с нанесенным хитозановым покрытием производили прикладыванием нагрузки

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 табл. 18.

Таблица 18. Механические характеристики коллагеновых образцов с наноалмазным и хитозановым покрытием.

Количество образцов	σ , МПа	ε , %	E , МПа
Бычий перикард с нанесенным наноалмазыным (ДНА) и хитозановым покрытием			
5 П	11±1	47±2	40±5
5 Л	3.5±0.5	45±5	12±2
Бычий перикард с нанесенным наноалмазыным (ДНА-О ₂) и хитозановым покрытием			
5 П	12±1	45±5	57±7
5 Л	5.0±0.5	45±5	22±5
Бычий перикард, стабилизированный глутаровым альдегидом			
5 П	11±1	42±1	35±5
5 Л	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 ксеноткани.

Нанесение слоя хитозана на коллагеновые матрицы бычьего перикарда в условиях сверхкритического СО₂ приводит к увеличению максимального предела прочности, а также повышает прочность к разрывным деформациям как в осевом, так и в радиальном направлениях. Иными словами, прямое осаждение хитозана на ксеноткань перикарда из растворов в угольной кислоте делает перикард более гибким, менее жестким, при этом механические свойства перикарда сохраняются [270]. Добавка наноалмаза, как с положительной, так и с отрицательно заряженной поверхностью, приводит к дополнительному усилению механико-прочностных характеристик, что снижает риск усталостного разрушения биопротезов.

6.3. Механические свойства материалов с покрытием наноалмазы-антибиотик-хитозан ⁷

Для создания трехкомпонентных покрытий использовали наноалмазы SDND, один из антибиотиков (амикацин и левофлоксацин) и хитозан. Для определения состава покрытия тритиевая метка содержалась в одном из компонентов. Как и для проведения анализов методом ИК-спектроскопии использовали условия, в которых содержание антибиотика на поверхности

⁷ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, T. Shen, I.S. Chaschin, G.A. Badun, V.G. Vasil'ev, I.V. Mikheev, N.P. Bakuleva. Nanodiamond–drug conjugates for coating xenogenic heart valve prostheses. Mendeleev Communications. 2024. Vol. 34. P. 104–106. (Импакт-фактор 1.8%), 25 %

наноалмазов наибольшее. На первом этапе получали адсорбционный комплекс наноалмазы-антибиотки, затем получали покрытия коллагеновых матриц, после этого наносили на матрицы слой хитозана. На рисунке 15 показаны изображения коллагеновых матриц с нанесенным покрытием, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

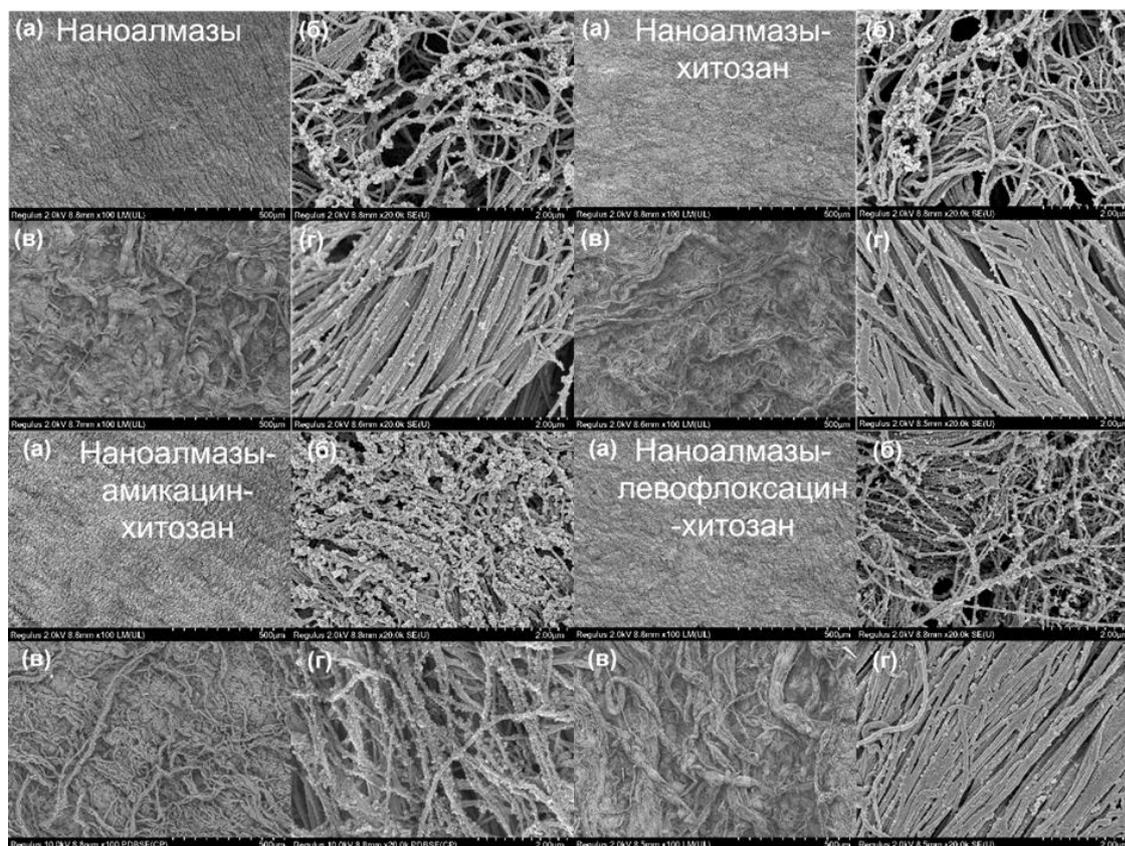


Рисунок 15. СЭМ-изображения коллагеновой матрицы с покрытиями состава: наноалмазы, наноалмазы-хитозан, наноалмазы-амикацин-хитозан и наноалмазы-левофлоксацин-хитозан. (а) гладкая сторона (500 мкм), (б) гладкая сторона (2 мкм), (в) “ворсистая” сторона (500 мкм), (г) “ворсистая” сторона (2 мкм).

Показано, что как исходные, так и модифицированные лекарственными средствами наноалмазы адсорбируются на коллагеновых матрицах с обеих сторон. В случае левофлоксацина мы наблюдали адгезию волокон, которая может уменьшить удельную площадь матриц, что объясняет меньшее количество наноалмазов в составе покрытия. Действительно, содержание наноалмаза в составе покрытий с амикацином и левофлоксацином было 3.3 ± 0.6 и 1.8 ± 0.4 мг на г матрицы соответственно (табл. 19).

Таблица 19. Состав покрытия наноалмазы-антибиотик-хитозан в пересчете на г коллагеновой матрицы.

Наноалмазы	Антибиотик	Хитозан
Нет	Нет	12±2
3.9 ± 0.8	Нет	17 ± 5
1.8 ± 0.4	0.19 ± 0.02 (левофлоксацин)	23 ± 6
3.3 ± 0.6	0.28 ± 0.02 (амикацин)	21 ± 4

Примечание: Приведены средние значения по трем измерениям ± доверительный интервал (95%).

Адсорбция хитозана не влияла на распределение наноалмазов по поверхности: слой наноалмазов остается стабильным в условиях нанесения слоя хитозана. Присутствие и количество наноалмазов на поверхности коллагеновых матриц не влияют на адсорбцию хитозана в условиях сверхкритического диоксида углерода, которая составляла около 20 мг/г, в то время как для матриц без наноалмазов адсорбция хитозана в тех же условиях составляет 12±2 мг/г. Наноалмазы имеют отрицательный заряд (дзета-потенциал водной суспензии составляет -30 мВ), адсорбция левофлоксацина на его поверхности сохраняет отрицательный потенциал, а адсорбция амикацина нейтрализует отрицательный заряд поверхности наноалмазов. Можно предположить, что слой наноалмаза способствует увеличению поверхности, доступной для адсорбции хитозана, раздвигая волокна матрицы, а также появлению центров отрицательного заряда на поверхности, что также повышает адсорбцию хитозана.

Показано, что количество наноалмаза SDND на поверхности коллагеновой матрицы больше, чем окисленного наноалмаза ДНА-О2. Это может быть связана как с особенностями состава SDND (например, присутствие некоторого стабилизатора, добавленного производителем для стабилизации водной суспензии), так и с особенностями самой матрицы, которая может отличаться толщиной и упаковкой коллагеновых фибрилл для разных кусков, из которых нарезают образцы.

Модификация поверхности SDND левофлоксацином снижает количество на наноалмазов, в то время как дзета-потенциал конъюгата наноалмаз-лекарственное средство остается отрицательным [111]. В случае свободных наноалмазов и конъюгата наноалмаз-амикацин количество наноалмазов на поверхности коллагеновой ткани практически одинаково. Можно предположить, что функциональный состав поверхности наноалмазов в этих случаях схож. ИК-спектры (рисунок 1 и 5) показывают, что наноалмазы, модифицированные амикацином, меньше отличаются от исходного по сравнению со спектром комплекса наноалмазы-левофлоксацин [111]. Чтобы определить способность покрытий изменять поверхность материала протеза, были определены механические характеристики биоткани, а также устойчивость материала к кальцификации *in vivo* (см. глава 5) и его восприимчивость к кальцификации. В табл. 20 приведены механико-прочностные характеристики коллагеновых матриц с покрытиями наноалмазы-антибиотик-хитозан.

Таблица 20. Механическо-прочностные характеристики коллагеновых матриц с покрытиями разного состава.

Состав покрытий	Модуль Юнга, МПа		относительное удлинение при разрыве, %		Напряжение при разрыве, МПа	
		⊥		⊥		⊥
Контроль	52±8	43±17	53.1±9.8	46.6±3.0	11.41±0.3 5	8.87±1.73
Хитозан	60±15	37±22	50.7±4.9	47.8±13.3	11.75±1.2 9	8.8±3.1
наноалмаз-хитозан	48±15	40±13	46.2±1.7	44.2±6.2	9.84±2.20	8.75±5.00
наноалмаз-левофлоксацин-хитозан	49±13	44±8	44.1±4.9	45.1±5.9	9.16±4.25	8.37±3.04
наноалмаз-амикацин-хитозан	48±26	38±17	51.4±8.9	52.4±5.4	9.74±1.91	8.28±5.62

Примечание: Приведено среднее значение трех измерений ± стандартная ошибка среднего значения.

Было показано, что наноалмазы SDND 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 амикацином. Важно отметить, что при модификации поверхности биологической ткани наноалмазами сохраняется J-образная форма кривой напряжение-деформация (рис. 16), что делает ее похожей на человеческую ткань [300].

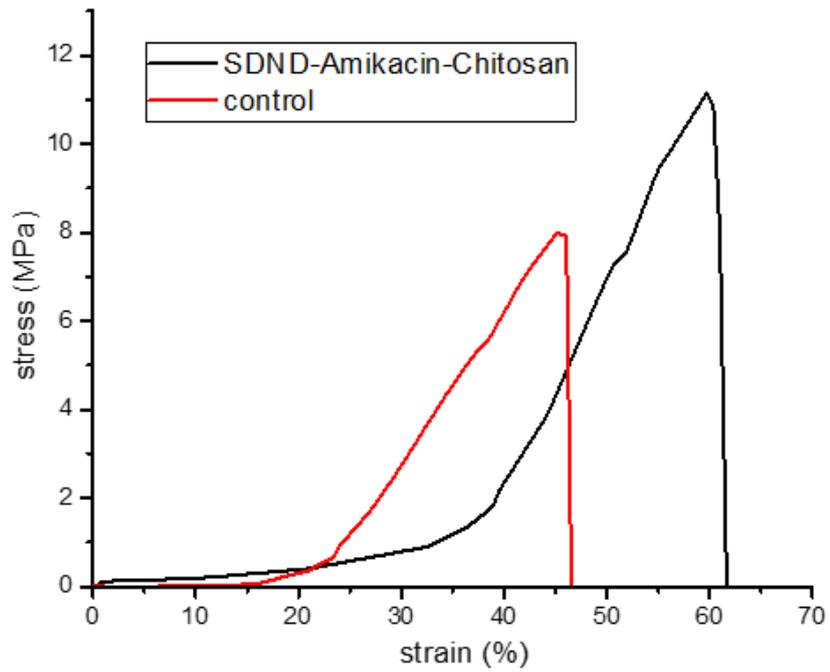


Рисунок 16. Кривая зависимости напряжения от деформации при растяжении коллагеновых матриц бычьего перикарда с покрытием наноалмазы–амикацин-хитозан и контрольного образца.

ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ *IN VIVO* ПОКРЫТИЙ КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИЦ И ИХ КАЛЬЦИНИРОВАНИЯ В ПРОЦЕССЕ ЭКСПЛУАТАЦИИ ⁸

На первом этапе определили устойчивость в организме покрытий, содержащих наноалмазы и хитозан. Важным вопросом было не вызовет ли наличие алмазных наночастиц дополнительного образования солей кальция на поверхности материала, что, как известно, существенно снижает эластичность материала и снижает срок службы изделия. В работе использовали меченные тритием наноалмазы ДНА и ДНА-О₂, для сравнения влияния функционального состава поверхности на устойчивость на поверхности коллагеновой матрицы и к кальцинированию. Также здесь отработали методику определения наноалмазов и металлов на одной и той же матрице, что позволил проводить полное определение в одном эксперименте и тем самым сократить количество необходимых животных.

На матрицы с нанесенным слоем [³H]наноалмазов наносили хитозановое покрытие в условии сверхкритического СО₂ (30 МПа) в течение 3 ч при 25°C. Затем матрицы с нанесенными покрытиями имплантировали подкожно крысам линии Wistar под тиопенталовым наркозом на спине по 6 штук на животное. После имплантации животные содержались в нормальных условиях вивария, питание *ad libitum*.

⁸ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, I.S. Chaschin, G.A. Badun, V.G. Vasil'ev, I.V. Mikheev, T. Shen, M.A. Sinolits, N.P. Bakuleva. Novel nanodiamond coatings for durable xenogenic heart valve prostheses: Mechanical properties and in vivo stability // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2022. Vol. 656. P. 130373. (Импакт-фактор 4.9%), 25 %, M.G. Chernysheva, T. Shen, I.S. Chaschin, G.A. Badun, V.G. Vasil'ev, I.V. Mikheev, N.P. Bakuleva. Nanodiamond–drug conjugates for coating xenogenic heart valve prostheses. Mendeleev Communications. 2024. Vol. 34. P. 104–106. (Импакт-фактор 1.8%), 25 %

Эксперимент 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.

В рацион питания включали эргокальциферол (витамин Д3) с целью лучшего усвоения кальция. Через 4 месяца после имплантации образцы под наркозом извлекали из животных, промывали физиологическим раствором для удаления формульных элементов крови животных. Затем матрицы высушивали до постоянной массы, полностью растворяли в азотной кислоте и измеряли радиоактивность раствора и осадка, как описано выше для определения содержания наноалмаза. Азотнокислый раствор анализировали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмы (ИСП-АЭС) для определения содержания кальция и других металлов.

Содержание наноалмазов на поверхности коллагеновых матриц после их извлечения из тел крыс определяли на основании радиоактивности [^3H]наноалмазов. Оказалось, что через 4 месяца ношения крысами коллагеновых матриц содержание наноалмазов в них составило 1.4 ± 0.8 (35% от начального количества) и 1.0 ± 0.3 (67% от начального количества) мг/г для ДНА и ДНА-О₂ соответственно. Таким образом показано, что окисленный наноалмаз лучше удерживается на поверхности коллагеновой матрицы в процессе ее эксплуатации.

Содержание кальция проводили с помощью ИСП-АЭС отложение кальция на образцах составило 4.6 ± 0.3 и 14.3 ± 0.7 мг/г для матриц, с покрытием из ДНА и ДНА-О₂ соответственно. Объяснить большее количество кальция на поверхности матриц с покрытием из окисленного наноалмаза, можно наличием на поверхности наноалмазов большого количества кислородсодержащих групп, образующихся в результате

отжига на воздухе, которые способствуют связыванию кальция и других металлов. Для образцов, покрытых ДНА-О₂, также было показано повышенное в 1.5-3 раза содержание натрия, калия и железа по сравнению с ДНА. Отметим, что при покрытии коллагеновой матрицы хитозаном из раствора Н₂О/СО₂ содержание кальция за 4 месяца эксплуатации составляет около 0.9 масс % или 9 мг/г, а в отсутствие хитозанового покрытия – 300 мг/г [301]. Таким образом, можно сделать вывод, что покрытие коллагеновой матрицы бычьего перикарда наноалмазами не приводит к существенному увеличению кальциноза ее поверхности.

Таким образом, на данном этапе работы показано, что механико-прочностные свойства коллагеновых матриц перикарда биопротезного клапана сердца могут быть существенно улучшены с помощью последовательного нанесения наноалмазного слоя и слоя хитозана. Образующийся слой наноалмазов связан с поверхностью коллагеновой матрицы. В процессе эксплуатации на поверхности матрицы остается около 35% ДНА и до 67% ДНА-О₂. Улучшение свойств наблюдается как для положительно, так и для отрицательно заряженного наноалмаза, что открывает широкие возможности использования его функционально развитой поверхности для нанесения различных антибактериальных средств как за счет химической пришивки, так и посредством адсорбции [302,303]. Подчеркнем, что окисленные наноалмазы в меньшем количестве сорбируются на поверхность коллагеновой матрицы бычьего перикарда, при этом улучшают ее механико-прочностные характеристики и лучше удерживаются на поверхности по сравнению с исходными наноалмазами. Поэтому для исследования связывания с антибиотиками выбраны именно отрицательно заряженные наноалмазы.

Для определения устойчивости всех тех компонентов покрытия (наноалмазы-антибиотик-хитозан) при эксплуатации в живом организме были выбраны наноалмазы SDND, антибиотики – амикацин и

левофлоксацин, хитозан. 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 ношения их крысами под кожей аналогично эксперименту, описанному выше. В табл. 21 приведен состав покрытий до и после эксплуатации материала.

Таблица 21. 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

Примечание: 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 сохраняется. Уменьшение слоя хитозана связано с удалением слоев, которые слабо связаны с поверхностью. Это предположение 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 в ходе выполнения проекта 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 ICP-AES на наличие металлов, в частности кальция. Анализ ANOVA результатов измерения проводили с использованием программного обеспечения Statistica10. Результаты приведены в табл. 22.

Таблица 22. 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±0.4 2	1.39±0.5 9	0.11±0.0 5	11.0±6.9	11.33±0.65
наноалмазы-левофлоксацин-хитозан	1.45±0.4 8	0.89±0.1 5	0.10±0.0 8	16.0±7.5	9.33±3.46
контроль (матрица без покрытий)	11.3±0.9	0.54±0.0 5	0.07±0.0 1	13±3	9±2

Анализ ANOVA показывает, что для обоих типов покрытий наноалмаз-амикацин-хитозан и наноалмаз-левофлоксацин-хитозан содержание кальция существенно не отличается, когда в образце без покрытия содержание кальция почти на порядок выше. Полученный результат подчеркивает роль хитозана в предотвращении кальциноза. Поскольку железо является основным металлом - примесью в составе наноалмазов, его концентрация в наноалмазосодержащем образце значительно выше ($p < 0,05$), чем в контрольном образце. Количество других металлов (цинка, натрия и калия) в образцах с покрытиями и без них было сопоставимым.

Таким образом, были впервые получены и проанализированы с разных точек зрения многокомпонентные покрытия коллагеновых матриц бычьего перикарда. Нанесение таких покрытий делает материал похожим по механическим характеристикам на человеческий. Исследования *in vivo* показали сохранение многослойных слоев, состоящих из наноалмазов, антимикробных агентов и хитозана, на поверхности материала и предотвращение отложения на нем кальция.

ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ НАНОАЛМАЗНЫХ ПОКРЫТИЙ В КРОВОТОКЕ ⁹

Для исследования устойчивости наноалмазных покрытий в кровотоке по описанной выше методике нанесли покрытия из меченных тритием наноалмазов ДНА, ДНА-О₂ и SDND на кусочки свиной аорты, на которую затем нанесли слой хитозана в условия сверхкритического СО₂/Н₂О. 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 (рисунок 17). Вид аорты с конduitом после извлечения из тела животного показано на рисунке 18. Эксперимент с животным проводили в соответствии с этическими нормами, регулируемыми эксперименты на животных в соответствии с международными нормативными документами [Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях EST № 123, Страсбург, 18.03.1986. Европейское руководство по содержанию и уходу за животными, используемыми в экспериментальных и других научных целях. 2007. FELASA: Федерация Европейских ассоциаций по изучению лабораторных животных, Шафтсбери-авеню, 25, Лондон, W1D 7EG, Великобритания. Директива ЕС 2010/63/EU об экспериментах на животных или руководство Национальных институтов здравоохранения по уходу за лабораторными животными и их использованию (публикации NIH № 8023, пересмотренные в 1978 году)].

⁹ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, T. Shen, G.A. Badun, I.V. Mikheev, I.S. Chaschin, Y.M. Tsygankov, D.V. Britikov, G.A. Hugaev, . N.P. Bakuleva. Tritium-labeled nanodiamonds as an instrument to analyze bioprosthetic valve coatings: A case of using a nanodiamond containing coating on a pork aorta. // *Molecules*. 2024. Vol. 29. N13. Art#3078. (Импакт-фактор 4.2), 15 %

Эксперименты проводились в виварии, зарегистрированном в ФГИС «ВетИС» "Цербер", номер участка, подтвержденный государственной ветеринарной службой - RU77:27583362.

После проведения операции животное чувствовало себя нормально. 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 провели эвтаназию животного, извлекли конduit и проводили дальнейшие исследования подшитых образцов с покрытиями, контрольного подшитого в конduit образца, кондуита носителя, а также нативной аорты на кальциноз, остаточного содержания наноалмазов в составе покрытия, а также проводили гистологическое исследование ткани всех образцов.

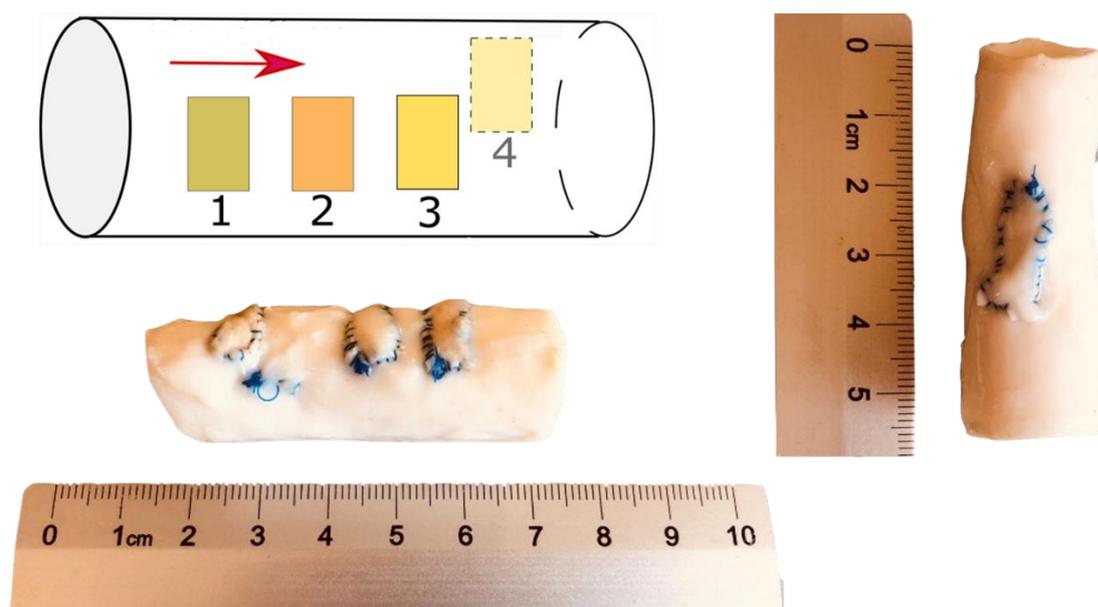


Рисунок 17. Расположение кусочков аорты в кондуите (схема сверху и фото). 1 – SDND-хитозан, 2 – ДНА-хитозан, 3 – ДНА-О2-хитозан, 4 – контроль (кусочек той аорты, на которую наносили покрытия, но без покрытия). Красной стрелкой показано направление кровотока.



Рисунок 18. Фото аорты с кондуитом (показан стрелкой сверху) и в теле животного (снизу).

Гистологическое исследование проведено сотрудниками центра сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева. Образцы коллагеновой ткани, взятой из опытных образцов и разных участков кондуита носителя, а также нативной аорты свиньи, помещали в гистологические кассеты и фиксировали в 10 %-ном (объемном) нейтральном формалине в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в парафин в соответствии со стандартом. методы. Образцы (срезы толщиной 5 мкм) окрашивали гематоксилин–эозином (“BioVitrum”, США). Для гистологической оценки были изготовлены парафиновые блоки. Изображения были получены с помощью микроскопа “LEICA DMRB” (“Leica”, Германия) и программного обеспечения “Leica Application Suite”. Гистологический срез образцов исследовали при увеличении от $\times 50$ до $\times 400$.

На рисунке 19 показаны срезы тканей разных образцов. Слева-направо столбцы: SDND-хитозан, ДНА-хитозан, ДНА-О₂-хитозан, контроль, вшитый в конduit (образец 4 на схеме рисунок 15), конduit, нативная аорта (×50, масштабная линия — 400 мкм). Изображения тех же образцов более высокими разрешениями строки снизу последовательно: ×100 (масштабная линия — 300 мкм), ×200 (масштабная линия — 200 мкм), ×400 (масштабная линия — 60 мкм). Окрашены гематоксилин-эозином. Волокна коллагена и эластина окрашены в розовый цвет, клетки и их остатки окрашены в синий цвет. Черными стрелками указаны области кальциноза. Синими стрелками – области воспаления с лимфатическими клетками. Черными указателями срезы кровеносных сосудов, образовавшихся при воспалении. Прямоугольниками выделены области, представленные с большим разрешении на нижележащей строке.

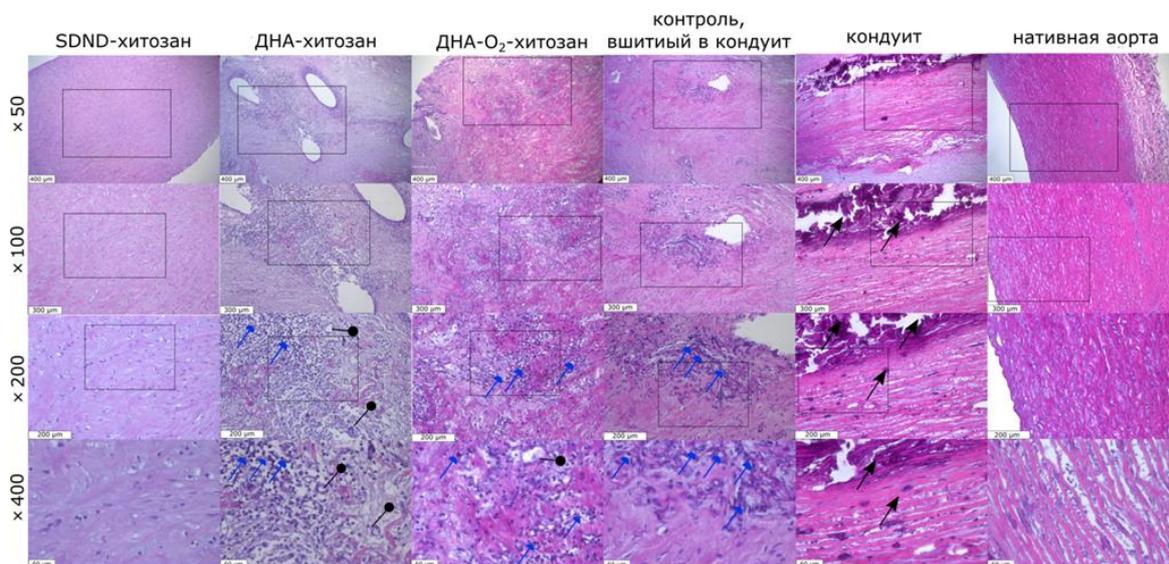


Рисунок 19. Срезы образцов коллагеновой ткани различных образцов свиной аорты.

Стоит сразу отметить, что 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. Однако, степень функциональных свойств таких как подавление

кальциноза, и устойчивость к заражению, можно оценить проведи более детальное гистологическое исследование образцов различных частей кондуита. Исходя из анализа гистологических срезов образцов (рисунок 19) можно сделать следующие выводы. Стенка нативной аорты свиньи (столбец нативная аорта) представлена внутренней, средней и наружной оболочками. Средняя оболочка построена из большого количества гладкомышечных клеток и выраженных эластических мембран, кальциноз и воспаление отсутствует. Данный образец можно принять в качестве положительного контроля. Для кондуита-носителя (столбец кондуит) можно выявить среднюю оболочку аорты преимущественно в субинтимальном отделе с явлениями выраженного кальциноза. Для образца с покрытием ДНА-хитозан (столбец ДНА-хитозан) можно выявить явления фиброза и очаговой лимфо-гистиоцитарной инфильтрации с примесью гигантских многоядерных клеток инородных тел преимущественно в области отверстий от шовного материала (хроническое неактивное воспаление). Для контрольного образца (столбец контроль, вшитый в кондуит) и образца с покрытием ДНА-О₂-хитозан (столбец ДНА-О₂-хитозан) характерны явления выраженного фиброза и очаговой лимфо-гистиоцитарной инфильтрации (хроническое неактивное воспаление, менее выраженное, чем для случая с покрытием ДНА-хитозан). Напротив, результаты анализа среза образца с покрытием SDND-хитозан выглядят весьма обнадеживающе. Действительно, в этом случае фрагмент стенки аорты не имеет признаков, фиброза, кальциноза и воспаления.

Из гистологического анализа образцов следует, что все образцы с покрытием, которые были подшиты в кондуит-носитель были устойчивы к кальцинозу, далее содержание кальция в образцах определили методом ИСП-АЭС. Просто модификация путем девиталлизации без дополнительного антикальциевого покрытия не так эффективна в плане подавления этого деструктивного явления. Более того, композитное

покрытие с наличием нанодiamondов 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 нанодiamondов (по радиоактивности) и на наличие металлов методом ИСП-АЭС. В таблице 16 приведены количества разных типов нанодiamondов на аорте после нанесения покрытия и после ношения животным. В табл. 23 приведено содержание металлов в образцах.

Таблица 23. Количество нанодiamondов на поверхности аорты до и после эксплуатации животным.

Тип нанодiamondов	Содержание нанодiamondов, мг нанодiamondов 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 24. 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 (№4 на рис. 17)	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. 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 [304]. 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 много компонентных 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 не зависимо от количества нанесенного наноалмаза. Показано, что лучшими характеристиками обладают покрытия из наноалмазов, которые поставляются в виде порошков, по сравнению с теми которые стабилизируются производителем в водной суспензии. Показано, что материал с покрытием, содержащим наноалмазы, не только сохраняет механические и прочностные характеристики, но на его поверхности удерживается антибиотик, который сохраняет антимикробные свойства при адсорбции. Обнаружено, что использование наноалмазов позволяет использовать меньшее количество антибиотика для достижения необходимого результата при подавлении роста золотистого стафилококка – основного возбудителя инфекции. При сравнении антимикробных характеристик покрытий, содержащих амикацин, левофлоксацин и ванкомицин, оказалось, что антимикробные свойства покрытий с амикацином и левофлоксацином примерно на порядок выше, чем в случае

ванкомицина. Поэтому именно покрытия с амикацином и левофлоксацином использовались в экспериментах с животными.

С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что как исходные, так и модифицированные лекарственными средствами нанодиазмы адсорбируются на коллагеновых матрицах с обеих сторон. В случае комплекса с левофлоксацином наблюдалась адгезия волокон, которая может уменьшить удельную площадь матриц, что объясняет меньшее количество нанодиазмов в составе покрытия. С помощью меченных тритием нанодиазмов было установлено, что содержание нанодиазма в составе покрытий с амикацином и левофлоксацином $3,3 \pm 0,6$ и $1,8 \pm 0,4$ мг на г матрицы соответственно.

С помощью сканирующей электронной микроскопии и меченных тритием нанодиазмов также показано, что адсорбция хитозана в условиях сверхкритического $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ не влияла на распределение и количество нанодиазмов на поверхности. С помощью меченного тритием хитозана найдено, что присутствие и количество нанодиазмов на поверхности коллагеновых матриц не влияют на адсорбцию хитозана в условиях сверхкритического диоксида углерода, которая составляла около 20 мг/г, в то время как для матриц без нанодиазмов адсорбция хитозана в тех же условиях составляет 12 ± 2 мг/г.

Определена стабильность нанодиазных покрытий *in vivo*: для покрытий нанодиазмы-антибиотик-хитозан определено количество каждого компонента в составе покрытия после четырех месяцев эксплуатации материала под кожей у крыс. Для покрытий нанодиазм-хитозан (3 типа нанодиазмов) определено количество нанодиазмов каждого типа после четырех месяцев эксплуатации в кровотоке свиньи. Для определения протекания процесса кальцинирования покрытий в рацион животных включали витамин Д3 для лучшего усвоения кальция.

Через четыре месяца после имплантации коллагеновые матрицы и аллогraft изымали из тел животных, высушивали до постоянной массы и разлагали кипячением в концентрированной азотной кислоте. Полученные суспензии разбавляли водой, центрифугировали для отделения осадка наноалмазов. После этого измеряли радиоактивность раствора и осадка наноалмазов с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра для определения количества меченого вещества, а также анализировали азотнокислый раствор с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на наличие металлов, в частности кальция. Для измерения радиоактивности использовали сцинтилляционную жидкость GoldStar, предназначенную для измерения растворов с низким значением pH. 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.

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 сохраняется. Уменьшение слоя хитозана связано с удалением слоев, которые слабо связаны с поверхностью. Это предположение 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.

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 является зародышем для отложения нерастворимых солей кальция.

Показано, что наноалмазные покрытия удерживаются в кровотоке крупного животного.

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 не высокое кальцинирование материала с покрытием. 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.

ВЫВОДЫ

1. Метод термической активации трития позволяет вводить радиоактивную метку в антибиотики (левофлоксацин, амикацин, ванкомицин), наноалмазы и хитозан, причем удельная радиоактивность полученных препаратов достаточна не только для определения количественных характеристик адсорбционных комплексов наноалмаз-антибиотик, но и для характеристики трехкомпонентных покрытий наноалмаз-антибиотик-хитозан, в том числе в экспериментах *in vivo*.
2. Разработана методика нанесения равномерных и устойчивых покрытий наноалмаз-антибиотик-хитозан на поверхности материалов животного происхождения (коллагеновая матрица бычьего перикарда, свиная аорта). Полученные покрытия улучшают механико-прочностные характеристики материала.
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. Поэтому именно эти покрытия использовались в экспериментах с животными.
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 покрытия содержащие наноалмазы устойчивы, в том числе в кровотоке, и не подвергаются сильному кальцинированию.
6. 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНА - детонационный наноалмаз

SDND - монодисперсные наноалмазы

ПЭМ - просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

XAS - рентгеновская абсорбционная спектроскопия

CVD - химическое осаждение из газовой фазы

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

МС - масс-спектрометрия

ЖСС - жидкостная сцинтилляционная спектрометрия

ФЭУ - фотоэлектронный умножитель

ЛПЭ - ленточная передача энергии

IS - метод внутреннего стандарт

ESCR - соотношение каналов внешнего стандарта

SIS - спектральный индекс образца

Метод БЭТ - метод Брунауэра-Эммета-Теллера

Метод ВЖН - метод Барретта-Джойнера-Халенда

АЭС-ИСП - атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой

БСА - бычий сывороточный альбумин

ПАВ - поверхностно-активное вещество

ТСХ - тонкослойная хроматография

ТФУ - трифторуксусная кислота

PBS - фосфатно-солевой буфер

СПИСОК 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. Carpentier A. et al. Mitral and tricuspid valve replacement with frame-mounted aortic heterografts. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg. American Association for Thoracic Surgery*, 1968. Vol. 56, № 3. P. 388–394.
3. Manji R.A. et al. Porcine bioprosthetic heart valves: The next generation // *Am. Heart J.* 2012. Vol. 164, № 2. P. 177–185.
4. Chernysheva M.G. et al. Novel nanodiamond coatings for durable xenogenic heart valve prostheses: Mechanical properties and in vivo stability // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. Elsevier B.V.*, 2023. Vol. 656, № PA. P. 130373.
5. Chernysheva M.G. et al. Tritium-Labeled Nanodiamonds as an Instrument to Analyze Bioprosthetic Valve Coatings: A Case of Using a Nanodiamond Containing Coating on a Pork Aorta // *Molecules*. 2024. Vol. 29, № 13.
6. Chernysheva M.G. et al. Nanodiamond–drug conjugates for coating xenogenic heart valve prostheses // *Mendeleev Commun. Russian Academy of Sciences*, 2024. Vol. 34, № 1. P. 104–106.
7. Greiner N.R. et al. Diamonds in detonation soot. // *Nat. (London, United Kingdom)*. 1988. Vol. 333, № 6172. P. 440–442.
8. Даниленко В. В. Из истории открытия синтеза наноалмазов // *Физика твердого тела*. 2004. Vol. 46, № 4. P. 581–584.
9. Лямкин А. И., Петров Е. А., А.П. Е., Сакович Г. В., Ставер А. М. Т.В.М. Получение алмазов из взрывчатых веществ // *ДАН СССР*. 1988. Vol. 302, № 3. P. 611–613.
10. Greiner N. R., Phillips D. S., Johnson J. D. V.F. Diamonds in detonation soot // *Nature*. 1988. Vol. 333, № 6172. P. 440–442.
11. Eidelman S., Altshuler A. Synthesis of nanoscale materials using detonation of solid explosives // *Nanostructured Mater.* 1993. Vol. 3, № 1–6. P. 31–41.
12. Dossa S.S. et al. Analysis of the High-Pressure High-Temperature (HPHT) growth of single crystal diamond // *J. Cryst. Growth*. 2023. Vol. 609. P. 127150.
13. Wang Z. et al. Synthesis and characterization of gem diamond single crystals in Fe-C system under high temperature and high pressure // *J. Cryst. Growth*. 2020. Vol. 531. P. 125371.

14. Liang Y. et al. Vapor phase nucleation and sedimentation of dispersed nanodiamonds by MPCVD // Powder Technol. 2024. Vol. 436. P. 119507.
15. Zheng S. et al. Effect of plasma modulation on the nucleation and crystal evolution of nanodiamond seeds during CVD diamond growth // J. Cryst. Growth. 2024. Vol. 627. P. 127538.
16. Трефилов В. И. С.Г.И. О прямом превращении некристаллического углерода в алмаз и повышенной скорости диффузионного превращения в условиях высоких импульсных давлений и температур // ДАН СССР. 1979. Vol. 246, № 5. P. 1115–1119.
17. Трефилов В. И., Саввакин Г. И., Скороход В. В., Солонин Ю. М. Х.А.Ф. Особенности структуры ультрадисперсных алмазов, полученных высокотемпературным синтезом в условиях взрыва // ДАН СССР. 1978. Vol. 239, № 4. P. 838–841.
18. Xu Kang, Jin zengshou W.F. Preparation of ultrafine diamond powder by explosive explosion // Energ. Mater. 1993. Vol. 1, № 3. P. 19–21.
19. Waldemar A. Trzciński J.P., Wolański P. Thermodynamic analysis of afterburning of detonation products in confined explosions // J. Energ. Mater. Taylor & Francis, 2002. Vol. 20, № 3. P. 195–222.
20. Zhu L.L.J.Z.Y. Study and Present Application of Ultrafine Diamond // Min. Metall. Eng. 2002. Vol. 22, № 3. P. 96–100.
21. Даниленко В.В. Из истории открытия синтеза наноалмазов // Физика твердого тела. 2004. Vol. 46, № 4. P. 581.
22. Van Thiel M., Ree F.H. Properties of carbon clusters in TNT detonation products: Graphite-diamond transition // J. Appl. Phys. 1987. Vol. 62, № 5. P. 1761–1767.
23. Badziag P. et al. Nanometre-sized diamonds are more stable than graphite // Nature. 1990. Vol. 343, № 6255. P. 244–245.
24. Толочко Б. П., Титов В. М., Чернышев А. П., Тэн К. А., Прууэл Э. Р., Жогин И. Л., Зубков П. И., Ляхов Н. З., Лукьянчиков Л. А. Ш.М.А. Физико-химическая модель детонационного синтеза наноалмазов // СО РАН. 2005.
25. Holt K. B. Diamond at the nanoscale: applications of diamond nanoparticles from cellular biomarkers to quantum computing // Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 2007. Vol. 365, № 1861. P. 2845–2861.
26. Долматов В. Ю., Веретенникова М. В., Марчуков В. А. С.В.Г. Современные промышленные возможности синтеза наноалмазов // Физика твердого тела. 2004. Vol. 46, № 4.

27. Алексенский А. Е., Байдакова М. В., Вуль А. Я., Давыдов В. Ю. П.Ю.А. Фазовый переход алмаз-графит в кластерах ультрадисперсного алмаза // Физика твердого тела. 1997. Vol. 39, № 6.
28. Новиков С. А. Искусственные алмазы, образующиеся при детонации взрывчатых веществ // Соросовский образовательный журнал. 1999. Vol. 2. P. 104–109.
29. Vereschagin A.L. et al. Properties of ultrafine diamond clusters from detonation synthesis // *Diam. Relat. Mater.* 1994. Vol. 3, № 1. P. 160–162.
30. Chen P.W. et al. Spherical nanometer-sized diamond obtained from detonation // *Diam. Relat. Mater.* 2000. Vol. 9, № 9. P. 1722–1725.
31. Kuznetsov V.L. et al. Study of ultradispersed diamond powders obtained using explosion energy // *Carbon N. Y.* 1991. Vol. 29, № 4. P. 665–668.
32. Алексенский, А.Е. ,Осипов В.Ю. , Дидейкин А.Т. , Вуль А.Я. А.В.В. Исследование агрегации кластеров ультрадисперсного алмаза методом атомно-силовой микроскопии // Письма в Журнал технической физики. 2000. Vol. 26, № 18. P. 28–35.
33. Алексенский А. Е., Байдакова М. В., Вуль А. Я. С.В.И. Структура алмазного нанокластера // Физика твердого тела. 1999. Vol. 41, № 4. P. 740–743.
34. Holt K.B., Caruana D.J., Millán-Barrios E.J. Electrochemistry of Undoped Diamond Nanoparticles: Accessing Surface Redox States // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 2009. Vol. 131, № 32. P. 11272–11273.
35. Praver S. et al. The Raman spectrum of nanocrystalline diamond // *Chem. Phys. Lett.* 2000. Vol. 332, № 1. P. 93–97.
36. Osswald S. et al. Control of sp²/sp³ Carbon Ratio and Surface Chemistry of Nanodiamond Powders by Selective Oxidation in Air // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 2006. Vol. 128, № 35. P. 11635–11642.
37. Loktev V.F. et al. Surface modification of ultradispersed diamonds // *Carbon N. Y.* 1991. Vol. 29, № 7. P. 817–819.
38. Mironov E., Petrov E., Koretz A. Chemical aspect of ultradispersed diamond formation // *Diam. Relat. Mater.* 2003. Vol. 12, № 9. P. 1472–1476.
39. Jiang T., Xu K. FTIR study of ultradispersed diamond powder synthesized by explosive detonation // *Carbon N. Y.* 1995. Vol. 33, № 12. P. 1663–1671.

40. Mironov E., Koretz A., Petrov E. Detonation synthesis ultradispersed diamond structural properties investigation by infrared absorption // *Diam. Relat. Mater.* 2002. Vol. 11, № 3. P. 872–876.
41. Cataldo F., Koscheev A.P. A Study on the Action of Ozone and on the Thermal Stability of Nanodiamond // *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* Taylor & Francis, 2003. Vol. 11, № 3. P. 201–218.
42. Ajeel M.A. et al. Preparation and characterization of electrode from annealed nano-diamond particles with boric acid for anodic oxidation process // *Electrochim. Acta.* 2020. Vol. 362. P. 137221.
43. Datta A. et al. Surface structure and properties of functionalized nanodiamonds: a first-principles study // *Nanotechnology.* 2011. Vol. 22, № 6. P. 65706.
44. Xu X. et al. Effect of sodium oleate adsorption on the colloidal stability and zeta potential of detonation synthesized diamond particles in aqueous solutions // *Diam. Relat. Mater.* 2005. Vol. 14, № 2. P. 206–212.
45. Tkachenko B.A. et al. Functionalized Nanodiamonds Part 3: Thiolation of Tertiary/Bridgehead Alcohols // *Org. Lett. American Chemical Society,* 2006. Vol. 8, № 9. P. 1767–1770.
46. Holt K.B. et al. Redox properties of undoped 5 nm diamond nanoparticles. 2008. P. 303–310.
47. Saini G. et al. Core–Shell Diamond as a Support for Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography // *Anal. Chem. American Chemical Society,* 2010. Vol. 82, № 11. P. 4448–4456.
48. Voznyakovskii A.P., Kudoyarov M.F., Pozdnyakov O.F. Self-organization processes and sedimentation stability in detonation nanodiamond suspensions // *Tech. Phys. Lett.* 2007. Vol. 33, № 10. P. 865–868.
49. Voznyakovskii A.P. Self-organization in nanocomposites based on detonation nanodiamonds // *Phys. Solid State.* 2004. Vol. 46, № 4. P. 644–648.
50. Ozawa M. et al. Preparation and Behavior of Brownish, Clear Nanodiamond Colloids // *Adv. Mater. John Wiley & Sons, Ltd,* 2007. Vol. 19, № 9. P. 1201–1206.
51. Krüger A. et al. Unusually tight aggregation in detonation nanodiamond: Identification and disintegration // *Carbon N. Y.* 2005. Vol. 43, № 8. P. 1722–1730.

52. Pichot V. et al. An efficient purification method for detonation nanodiamonds. // *Diam. Relat. Mater.* Elsevier B.V., 2008. Vol. 17, № 1. P. 13–22.
53. Vallar S. et al. Oxide slurries stability and powders dispersion: optimization with zeta potential and rheological measurements // *J. Eur. Ceram. Soc.* 1999. Vol. 19, № 6. P. 1017–1021.
54. Pochapski D.J. et al. Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results // *Langmuir.* American Chemical Society, 2021. Vol. 37, № 45. P. 13379–13389.
55. Langmuir I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. // *J. Am. Chem. Soc.* 1916. Vol. 38, № 11. P. 2221–2295.
56. Swenson H., Stadie N.P. Langmuir's Theory of Adsorption: A Centennial Review // *Langmuir.* American Chemical Society, 2019. Vol. 35, № 16. P. 5409–5426.
57. Vigdorowitsch M. et al. Freundlich Isotherm: An Adsorption Model Complete Framework // *Appl. Sci.* 2021. Vol. 11, № 17.
58. Nguyen C., Do D.D. The Dubinin–Radushkevich equation and the underlying microscopic adsorption description // *Carbon* N. Y. 2001. Vol. 39, № 9. P. 1327–1336.
59. Johnson R.D., Arnold F.H. The temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1995. Vol. 1247, № 2. P. 293–297.
60. Tzabar N., ter Brake H.J.M. Adsorption isotherms and Sips models of nitrogen, methane, ethane, and propane on commercial activated carbons and polyvinylidene chloride // *Adsorption.* 2016. Vol. 22, № 7. P. 901–914.
61. Tóth J. Uniform interpretation of gas/solid adsorption // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1995. Vol. 55. P. 1–239.
62. Tran H.N. et al. Revisiting the calculation of thermodynamic parameters of adsorption processes from the modified equilibrium constant of the Redlich–Peterson model // *J. Chem. Technol. & Biotechnol.* 2023. Vol. 98, № 2. P. 462–472.
63. Tran H.N. et al. Critical Review and Discussion of the Nonlinear Form of Radke–Prausnitz Model in Adsorption Solid–Liquid Phases // *J. Environ. Eng.* 2023. Vol. 149, № 3. P. 3122006.

64. Komarof V. F. S.G. V. Synthetic Diamond based polishing suspension for semiconductor // *Electrochem. Soc.* 1994. Vol. 94, № 22. P. 970.
65. Zhang Liqu. Water-based diamond polishing liquid and its production. 2010. P. 1.
66. Chkhalov N.I. et al. Ultradispersed diamond powders of detonation nature for polishing X-ray mirrors // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 1995. Vol. 359, № 1. P. 155–156.
67. Jin Zhuji, Wang Lixin Q.Y. Experimental study on grinding ceramic beads by magnetic fluid grinding method // *J. Harbin Inst. Technol.* 1995. Vol. 27, № 3. P. 130–134.
68. Сакович Г.В., Брыляков П.М. Г.В.Д. Получение алмазных кластеров взрывом и их практическое использование // *Журнал ВХО.* 1990. Vol. 35, № 5. P. 600–602.
69. Chu H.Y., Hsu W.C., Lin J.F. The anti-scuffing performance of diamond nano-particles as an oil additive // *Wear.* 2010. Vol. 268, № 7. P. 960–967.
70. Tao X., Jiazheng Z., Kang X. The ball-bearing effect of diamond nanoparticles as an oil additive // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 1996. Vol. 29, № 11. P. 2932–2937.
71. Shakun A. et al. Hard nanodiamonds in soft rubbers: Past, present and future – A review // *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 2014. Vol. 64. P. 49–69.
72. Yusof N.H. et al. Preparation and properties of natural rubber with filler nanomatrix structure // *Colloid Polym. Sci.* 2015. Vol. 293, № 8. P. 2249–2256.
73. Dolmatov V.Y. Detonation-synthesis nanodiamonds: synthesis, structure, properties and applications. // *Russ. Chem. Rev. Turpion Ltd.*, 2007. Vol. 76, № 4. P. 339–360.
74. Basso L. et al. Nanodiamonds: Synthesis and application in sensing, catalysis, and the possible connection with some processes occurring in space // *Appl. Sci.* 2020. Vol. 10, № 12. P. 1–28.
75. Altammar K.A. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. // *Front. Microbiol. Switzerland*, 2023. Vol. 14. P. 1155622.
76. Даниленко В. В. Синтез и спекание алмазов взрывом // *Энергоатомиздат.* 2003.

77. Shenderova O. A., Zhirnov V. V. B.D.W. Carbon Nanostructures // Crit. Rev. Solid State Mater. Sci. 2002. Vol. 27, № 3. P. 227–356.
78. Hosseinpour A. et al. Recent advances and future perspectives for carbon nanostructures reinforced organic coating for anti-corrosion application // Surfaces and Interfaces. 2021. Vol. 23. P. 100994.
79. Betancur-Lopera A.F. et al. Role of low-dimensional carbon nanostructures in hybrid material as anticorrosive coating // Prog. Org. Coatings. 2022. Vol. 163. P. 106682.
80. Murasawa K. et al. Disclosing mechanical and specific structural characteristics of thick and adherent nanodiamond composite hard coating deposited on WC–Co substrates // Mater. Today Commun. 2024. Vol. 40. P. 109839.
81. Sharon M. Stealth, Counter Stealth and Nanotechnology // Nanotechnology in the Defense Industry. 2019. P. 37–88.
82. OZLER, Muhammed Emre and ALKRDY, Abdul Rhman and BOZKURT Y. ADVANCED NANOTECHNOLOGY COATINGS USED IN THE AEROSPACE INDUSTRY // Curr. Top. Aeronaut. 2023. P. 73.
83. Hens S.C. et al. Nanodiamond bioconjugate probes and their collection by electrophoresis // Diam. Relat. Mater. 2008. Vol. 17, № 11. P. 1858–1866.
84. Härtl A. et al. Protein-modified nanocrystalline diamond thin films for biosensor applications // Nat. Mater. 2004. Vol. 3, № 10. P. 736–742.
85. Yang W. et al. DNA-modified nanocrystalline diamond thin-films as stable, biologically active substrates // Nat. Mater. 2002. Vol. 1, № 4. P. 253–257.
86. Knickerbocker T. et al. DNA-Modified Diamond Surfaces // Langmuir. 2003. Vol. 19, № 6. P. 1938–1942.
87. Dahoumane S.A. et al. Protein-Functionalized Hairy Diamond Nanoparticles // Langmuir. American Chemical Society, 2009. Vol. 25, № 17. P. 9633–9638.
88. Kong X.L. et al. High-Affinity Capture of Proteins by Diamond Nanoparticles for Mass Spectrometric Analysis // Anal. Chem. American Chemical Society, 2005. Vol. 77, № 1. P. 259–265.
89. Huang L.-C.L., Chang H.-C. Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds. // Langmuir. American Chemical Society, 2004. Vol. 20, № 14. P. 5879–5884.

90. Rubio-Retama J. et al. Synthetic Nanocrystalline Diamond as a Third-Generation Biosensor Support // *Langmuir*. American Chemical Society, 2006. Vol. 22, № 13. P. 5837–5842.
91. Пузырь А П, Позднякова И О Б.В.С. Создание люминесцентного биочипа с использованием наноалмазов и бактериальной люциферазы // *Физика твердого тела*. 2004. Vol. 46, № 4. P. 740–742.
92. Schrand A.M., Lin J.B. Chapter 16 - Characterization of Detonation Nanodiamonds for Biocompatibility // *Ultananocrystalline Diamond (Second Edition)*. Second Edi / ed. Shenderova O.A., Gruen D.M. Oxford: William Andrew Publishing, 2012. P. 519–548.
93. Formoso I. et al. Chapter 1 - Progress of nanotechnology in the development of medicines // *Nanotechnology and Regenerative Medicine* / ed. Santana M.H., Souto E.B., Shegokar R. Academic Press, 2023. P. 1–21.
94. Tang L. et al. Biocompatibility of chemical-vapour-deposited diamond // *Biomaterials*. 1995. Vol. 16, № 6. P. 483–488.
95. Schrand A.M. et al. Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds // *Diam. Relat. Mater.* 2007. Vol. 16, № 12. P. 2118–2123.
96. Kelly S. et al. Patterned growth of neuronal cells on modified diamond-like carbon substrates // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, № 17. P. 2573–2580.
97. Liu K.-K. et al. Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell // *Nanotechnology*. 2007. Vol. 18, № 32. P. 325102.
98. Liu K.-K. et al. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 26. P. 4249–4259.
99. Dworak N. et al. Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes in vitro // *Carbon* N. Y. 2014. Vol. 68. P. 763–776.
100. Puzyr A.P. et al. Destruction of human blood cells in interaction with detonation nanodiamonds in experiments in vitro // *Diam. Relat. Mater.* 2004. Vol. 13, № 11. P. 2020–2023.
101. Vial S. et al. Peptide-Grafted Nanodiamonds: Preparation, Cytotoxicity and Uptake in Cells // *ChemBioChem*. 2008. Vol. 9, № 13. P. 2113–2119.
102. Vaijayanthimala V. et al. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake // *Nanotechnology*. 2009. Vol. 20, № 42. P. 425103.

103. Yu S.-J. et al. Bright Fluorescent Nanodiamonds: No Photobleaching and Low Cytotoxicity // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 50. P. 17604–17605.
104. Zhang B. et al. Receptor-Mediated Cellular Uptake of Folate-Conjugated Fluorescent Nanodiamonds: A Combined Ensemble and Single-Particle Study // *Small*. 2009. Vol. 5, № 23. P. 2716–2721.
105. Priyadarshni N., Singh R., Mishra M.K. Nanodiamonds: Next generation nano-theranostics for cancer therapy // *Cancer Lett.* 2024. Vol. 587. P. 216710.
106. Brakmane G., Winslet M., Seifalian A.M. Systematic review: The applications of nanotechnology in gastroenterology // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012. Vol. 36, № 3. P. 213–221.
107. Namdar R., Nafisi S. Nanodiamond applications in skin preparations // *Drug Discov. Today*. 2018. Vol. 23, № 5. P. 1152–1158.
108. Yuan Y. et al. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice // *Diam. Relat. Mater.* 2010. Vol. 19, № 4. P. 291–299.
109. Yuan Y. et al. Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo // *Diam. Relat. Mater.* 2009. Vol. 18, № 1. P. 95–100.
110. Zhang X. et al. Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation // *Toxicol. Lett.* 2010. Vol. 198, № 2. P. 237–243.
111. Shen T. et al. Levofloxacin and Amikacin Adsorption on Nanodiamonds: Mechanism and Application Prospects // *Colloids and Interfaces*. 2022. Vol. 6, № 2. P. 1–15.
112. Shen T., Chernysheva M.G., Badun G.A. Tritium labeling vancomycin and studying its adsorption on nanodiamonds // *Радиохимия*. 2023. Vol. 65, № 6. P. 575–583.
113. Batyuk L., Kizilova N., Muraveinik O. Biomedical Applications of Nanodiamonds and Nanotoxicity Problems // 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2021. P. 1–4.
114. Taha N., Ghafil J.A. Burn skin treatment by nanoparticle – review article. 2022. Vol. 16, № 1. P. 48–55.
115. Suarez-Kelly L.P. et al. Fluorescent nanodiamonds engage innate immune effector cells: A potential vehicle for targeted anti-tumor immunotherapy // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2017. Vol. 13, № 3. P. 909–920.

116. Zhao J. et al. Fructose-Coated Nanodiamonds: Promising Platforms for Treatment of Human Breast Cancer // *Biomacromolecules*. 2016. Vol. 17, № 9. P. 2946–2955.
117. Guo Q. et al. Nanodiamonds Inhibit Cancer Cell Migration by Strengthening Cell Adhesion: Implications for Cancer Treatment // *ACS Appl. Mater. & Interfaces*. 2021. Vol. 13, № 8. P. 9620–9629.
118. Vervald A.M. et al. Boron-Doped Nanodiamonds as Anticancer Agents: En Route to Hyperthermia/Thermoablation Therapy // *ACS Biomater. Sci. & Eng.* 2020. Vol. 6, № 8. P. 4446–4453.
119. Neburkova J., Vavra J., Cigler P. Coating nanodiamonds with biocompatible shells for applications in biology and medicine // *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2017. Vol. 21, № 1. P. 43–53.
120. Xu J., Chow E.K.-H. Biomedical applications of nanodiamonds: From drug-delivery to diagnostics // *SLAS Technol.* 2023. Vol. 28, № 4. P. 214–222.
121. Mengesha A.E., Youan B.-B.C. 8 - Nanodiamonds for drug delivery systems // *Diamond-Based Materials for Biomedical Applications* / ed. Narayan R. Woodhead Publishing, 2013. P. 186–205.
122. Laptinskiy K.A. et al. Nanodiamond based complexes for prolonged dexamethasone release // *Saratov Fall Meeting 2018: Computations and Data Analysis: from Nanoscale Tools to Brain Functions* / ed. Postnov D.E. SPIE, 2019. Vol. 11067. P. 110671G.
123. Lam R. et al. Nanodiamond-Embedded Microfilm Devices for Localized Chemotherapeutic Elution. // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2008. Vol. 2, № 10. P. 2095–2102.
124. Wei L. et al. Immobilization of enzyme on detonation nanodiamond for highly efficient proteolysis. // *Talanta*. Elsevier B.V., 2010. Vol. 80, № 3. P. 1298–1304.
125. Shimkunas R.A. et al. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles. // *Biomaterials*. Elsevier Ltd., 2009. Vol. 30, № 29. P. 5720–5728.
126. Cheng C.-Y. et al. Direct and in vitro observation of growth hormone receptor molecules in A549 human lung epithelial cells by nanodiamond labeling. // *Appl. Phys. Lett.* American Institute of Physics, 2007. Vol. 90, № 16. P. 163903/1-163903/3.

127. Kossovsky N. et al. Surface-Modified Diamond Nanoparticles as Antigen Delivery Vehicles. // *Bioconjug. Chem.* American Chemical Society, 1995. Vol. 6, № 5. P. 507–511.
128. Chernyaev A.P. et al. Prospects of Development of Radiation Technologies in Russia // *Phys. At. Nucl.* 2019. Vol. 82, № 5. P. 513–527.
129. Zhuikov B.L. Successes and problems in the development of medical radioisotope production in Russia // *Physics-Uspekhi*. Turpion Ltd and the Russian Academy of Sciences, 2016. Vol. 59, № 5. P. 481.
130. Myasoedov N.F., Sidorov G. V. The combination of chemical reactions and isotopic exchange reactions in the synthesis of tritium-labelled compounds // *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* 1988. Vol. 39, № 6. P. 601.
131. Bauder-Wüst U. et al. Synthesis of tritium-labeled Lu-PSMA-617: Alternative tool for biological evaluation of radiometal-based pharmaceuticals // *Appl. Radiat. Isot.* 2023. Vol. 197. P. 110819.
132. Filer C.N. Synthesis and characterization of tritium-labelled substances // *Appl. Radiat. Isot.* 2018. Vol. 137. P. 261–272.
133. Valera V. et al. Synthesis of 4R- and 4S-tritium labeled NADPH for the determination of the coenzyme stereospecificity of NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. Vol. 148, № 1. P. 515–520.
134. Winnicka E., Kańska M. Enzymatic synthesis of methyl derivatives of L-tryptophan selectively labeled with hydrogen isotopes // *Appl. Radiat. Isot.* 2018. Vol. 137. P. 118–122.
135. Pająk M., Kańska M. Enzymatic syntheses of 3'-halotyramines, selectively 2H- and 3H-labeled in the side chain // *Appl. Radiat. Isot.* 2018. Vol. 131. P. 8–12.
136. Tortajada A., Hevia E. Alkali-metal bases in catalytic hydrogen isotope exchange processes // *Catal. Sci. Technol.* 2023. Vol. 13, № 17. P. 4919–4925.
137. Morawietz P. et al. Significantly improved radiochemical yields in gaseous tritium reactions by iridium(i)-catalyzed hydrogen isotope exchange††Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed reaction conditions and analytical details, literature survey. See D // *Green Chem.* 2022. Vol. 24, № 12. P. 4824–4829.

138. Barranco S., Pérez-Temprano M.H. Chapter Five - Merging homogeneous transition metal catalysis and hydrogen isotope exchange / ed. Pérez P.J. Academic Press, 2023. Vol. 79. P. 157–193.
139. Shchepina N.E. et al. Synthesis of arylhalonium compounds [including (4-methylphenyl) phenylfluoronium] by the nuclear–chemical method // *Tetrahedron Lett.* 2002. Vol. 43, № 22. P. 4123–4124.
140. Badun G.A., Simonov E.F., Filatov E.S. Labelling biomolecules by the action of atomic tritium // *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part C. Radiat. Phys. Chem.* 1991. Vol. 38, № 2. P. 276.
141. Chernysheva M.G. et al. Cationic surfactant coating nanodiamonds: Adsorption and peculiarities // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* Elsevier, 2019. Vol. 565, № August 2018. P. 25–29.
142. Rozhko T. V et al. On the mechanism of biological activation by tritium // *J. Environ. Radioact.* 2016. Vol. 157. P. 131–135.
143. Badun G.A. et al. Atomic tritium as a surface nanoprobe in a structural investigation of molecular assemblies // *Mater. Sci. Eng. C.* 2003. Vol. 23, № 6. P. 797–802.
144. Badun G.A., Chernysheva M.G. Tritium Thermal Activation Method. Features of Application, Modern Achievements, and Further Development Prospects // *Radiochemistry.* 2023. Vol. 65, № 2. P. 185–197.
145. Langmuir I. The Dissociation of Hydrogen into Atoms. // *J. Am. Chem. Soc.* 1912. Vol. 34. P. 860–877.
146. Otsuka T., Ihara M., Komiyama H. Hydrogen dissociation on hot tantalum and tungsten filaments under diamond deposition conditions. // *J. Appl. Phys. American Institute of Physics*, 1995. Vol. 77, № 2. P. 893–898.
147. Чернышева М. Г. Б.Г.А. Меченые соединения в физко-химических и биохимических исследованиях. Издательство Московского университета, 2018. 55 р.
148. Umemoto, H., Ohara, K., Morita, D., Nozaki, Y., Masuda, A., Matsumura H. Direct detection of H atoms in the catalytic chemical vapor deposition of the SiH/H system // *J. Appl. Phys.* 2002. Vol. 91, № 3. P. 1650–1656.
149. Zheng W., Gallagher A. Hydrogen dissociation on high-temperature tungsten. // *Surf. Sci. Elsevier B.V.*, 2006. Vol. 600, № 10. P. 2207–2213.
150. Fang Y. et al. Study on high-temperature hydrogen dissociation for nuclear thermal propulsion reactor // *Nucl. Eng. Des.* 2022. Vol. 392. P. 111753.

151. Vanderslice J.T. et al. High-Temperature Transport Properties of Dissociating Hydrogen // *Phys. Fluids*. 1962. Vol. 5, № 2. P. 155–164.
152. Giovanella B.C., Abell C.W., Heidelberger C. The Preparation and Purification of Tritiated Carcinogenic Hydrocarbons* // *Cancer Res*. 1962. Vol. 22, № 8_Part_1. P. 925–930.
153. Zhang W.G. et al. Tritium analysis in titanium films by the BIXS method // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*. 2012. Vol. 275. P. 20–23.
154. Mao L. et al. Effects of internal bremsstrahlung of tritium β -decay and surface roughness in the BIXS method // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*. 2011. Vol. 269, № 2. P. 105–110.
155. Yuji Hatano Masanori Hara H.O.H.N.T.H., Yamanishi T. Measurement of Highly Tritiated Water by Imaging Plate // *Fusion Sci. Technol*. Taylor & Francis, 2011. Vol. 60, № 3. P. 982–985.
156. Ohuchi-Yoshida H. et al. Tritium depth profile in matter using an imaging plate // *Fusion Eng. Des*. 2012. Vol. 87, № 5. P. 423–426.
157. Hiroko Ohuchi Yasuhiro Kondo Y.A., Kawano T. Tritium Measurement in High Gamma-Ray Radiation Fields by Using an Imaging Plate // *Fusion Sci. Technol*. Taylor & Francis, 2011. Vol. 60, № 3. P. 944–947.
158. Mason J.A., Vassallo G. Tritium Measurement by Isothermal Calorimetry // *Fusion Technol*. Taylor & Francis, 1992. Vol. 21, № 2P2. P. 425–429.
159. Klein J.E., Mailory M.K., Nobile Jr. A. Tritium Measurement Technique Using “In-Bed” Calorimetry // *Fusion Technol*. Taylor & Francis, 1992. Vol. 21, № 2P2. P. 401–405.
160. Hans K., Reinhard K., Rolf H. Tritium Inventory Measurements Using Calorimetry // *Fusion Technol*. Taylor & Francis, 1992. Vol. 21, № 2P2. P. 412–418.
161. Bykov I. et al. Investigation of tritium analysis methods for ion microbeam application // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*. 2012. Vol. 273. P. 250–253.
162. Nakamura H. et al. Tritium permeation study through tungsten and nickel using pure tritium ion beam // *J. Nucl. Mater*. 2003. Vol. 313–316. P. 679–684.
163. Pearson J.E. Nondestructive Determination of Tritium Content of Erbium Tritide Thin Films // *Appl. Spectrosc*. Optica Publishing Group, 1974. Vol. 28, № 4. P. 358–361.

164. Pearson J.E. Nondestructive Determination of Areal Density and Tritium Content of Tritided Erbium Films with Beta-Excited X-rays // *Appl. Spectrosc.* Optica Publishing Group, 1973. Vol. 27, № 6. P. 450–453.
165. Roberts M.L. et al. A compact tritium AMS system // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 2000. Vol. 172, № 1. P. 262–267.
166. Friedrich M. et al. Tritium depth profiling by AMS in carbon samples from fusion experiments // *Phys. Scr.* 2001. Vol. 2001, № T94. P. 98.
167. Fu Tao, An Zhu, Zhu Jing-Jun L.M.-T. and M.L. Tritium and helium analyses in thin films by enhanced proton backscattering // *Chinese Phys. C.* 2014. Vol. 38, № 8. P. 88203.
168. Sawicki J.A. et al. Analysis of near-surface tritium in materials by elastic recoil detection under MeV energy helium bombardment // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 1986. Vol. 15, № 1. P. 475–480.
169. Beyerle U. et al. A Mass Spectrometric System for the Analysis of Noble Gases and Tritium from Water Samples // *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society, 2000. Vol. 34, № 10. P. 2042–2050.
170. Clarke W.B., Jenkins W.J., Top Z. Determination of tritium by mass spectrometric measurement of ^3He // *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1976. Vol. 27, № 9. P. 515–522.
171. Masakatsu SAEKI Takakuni HIRABAYASHI Y.A.T.H., TACHIKAWA E. Preparation of Gas Chromatographic Column for Separation of Hydrogen Isotopes and Its Application to Analysis of Commercially Available Tritium Gas // *J. Nucl. Sci. Technol.* Taylor & Francis, 1983. Vol. 20, № 9. P. 762–768.
172. Karmen A. et al. Measurement of Tritium in the Effluent of a Gas Chromatography Column. // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 1963. Vol. 35, № 4. P. 536–542.
173. O'hira S. et al. On-line Tritium Process Gas Analysis by Laser Raman Spectroscopy at TSTA // *Fusion Technol.* Taylor & Francis, 1992. Vol. 21, № 2P2. P. 465–470.
174. O'hira S. et al. Development of a compact real-time process gas analysis system for tritium accountancy for a DEMO fusion reactor by an application of laser Raman spectroscopy // *Fusion Eng. Des.* 2021. Vol. 170. P. 112502.
175. Chen Z. et al. Analysis of ion recombination in ionization chambers for tritium measurements // *Fusion Eng. Des.* 2015. Vol. 101. P. 52–55.

176. Rodrigo L. et al. Tritium Measurement and Monitoring in Experimental and Process Systems with Ionization Chambers // *Fusion Technol.* Taylor & Francis, 1992. Vol. 21, № 2P2. P. 629–635.
177. Curtis M. Lou. Detection and measurement of tritium by bremsstrahlung counting // *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1972. Vol. 23, № 1. P. 17–23.
178. Matsuyama M., Watanabe K., Hasegawa K. Tritium assay in materials by the bremsstrahlung counting method // *Fusion Eng. Des.* 1998. Vol. 39–40. P. 929–936.
179. Werbin H., Chaikoff I.L., Imada M.R. Rapid Sensitive Method for Determining H³-Water in Body Fluids by Liquid Scintillation Spectrometry. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1959. Vol. 102, № 1. P. 8–15.
180. LEIBMAN J., GOTCH F.A., EDELMAN I.S. Tritium Assay by Liquid Scintillation Spectrometry // *Circ. Res.* 1960. Vol. 8, № 5. P. 907–912.
181. Chernysheva M.G., Badun G.A. Liquid Scintillation Spectrometry of Tritium in Studying Lysozyme Behavior in Aqueous/Organic Liquid Systems. The Influence of the Organic Phase. // *Langmuir.* American Chemical Society, 2011. Vol. 27, № 6. P. 2188–2194.
182. Al-Haddad M.N., Fayoumi A.H., Abu-Jarad F.A. Calibration of a liquid scintillation counter to assess tritium levels in various samples // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 1999. Vol. 438, № 2. P. 356–361.
183. Horrocks D. *Applications of liquid scintillation counting.* Elsevier, 2012. 345 p.
184. Anderson L.E., McClure W.O. An improved scintillation cocktail of high-solubilizing power // *Anal. Biochem.* 1973. Vol. 51, № 1. P. 173–179.
185. Jan ter Wiel H.T. *Advances in scintillation cocktails.* Citeseer, 1991. 51 p.
186. L'Annunziata M.F. et al. Chapter 6 - Liquid scintillation analysis: principles and practice * / ed. L'Annunziata M.F.B.T.-H. of R.A. (Fourth E. Academic Press, 2020. P. 575–801.
187. Birks John Betteley. *The theory and practice of scintillation counting: International series of monographs in electronics and instrumentation.* Elsevier, 2013. Vol. 27. 663 p.
188. Horrocks Donald. *Applications of liquid scintillation counting.* Elsevier, 2012. 345 p.

189. Ravat B. et al. Model and simulation of quenching effects on the shape of a tritium β^- in a liquid scintillation counting // *Comput. Phys. Commun.* 2000. Vol. 127, № 2. P. 261–267.
190. Zhilin C. et al. The effect of vial type and cocktail quantity on tritium measurement in LSC // *Appl. Radiat. Isot.* 2010. Vol. 68, № 9. P. 1855–1858.
191. Zhilin C. et al. Optimization of Counting Conditions on Tritium Measurement in LSC Considering Volume Effect. 2014. Vol. 31, № 1. P. 1–5.
192. Matsuyama M. et al. Non-destructive tritium measurements of Mk IIA divertor tile by BIXS // *J. Nucl. Mater.* 2003. Vol. 313–316. P. 491–495.
193. Watanabe Y., Kuwabara J. Ultraviolet photolysis of urine for suppression of color quenching prior to liquid scintillation counting of tritium // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. Vol. 384, № 2. P. 547–550.
194. Sakuma Y. et al. Removal of the impurities from environmental water samples for tritium measurement by liquid scintillation counting // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2003. Vol. 255, № 2. P. 325–327.
195. Zaitsev D.A., Zolotarev Y.A., Myasoyedov N.F. Non-specifically tritium-labelled peptides of high molar activity // *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* 1988. Vol. 39, № 6. P. 619.
196. Loomans E.E.M.G. et al. Adsorption studies of tritium-labeled peptides on polystyrene surfaces // *J. Immunol. Methods.* 1998. Vol. 221, № 1. P. 131–139.
197. Meriluoto J.A.O. et al. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog // *Toxicon.* 1990. Vol. 28, № 12. P. 1439–1446.
198. Price P.A. Specific tritium labeling of γ -carboxyglutamic acid residues in proteins // *Posttranslational Modifications Part B.* Academic Press, 1984. Vol. 107. P. 544–548.
199. Meredith C., Johnson M.K. Complete extraction in a form suitable for liquid scintillation counting of tritium-labeled proteins from polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 162, № 2. P. 405–408.
200. Klimova O.A., Zolotarev Y.A., Chebotarev V.Y. The Preparation of Soft-Tritium-Labeled Proteins and Their Application for the Collagenolytic Activity Investigations // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 195, № 2. P. 758–761.

201. Péron O. et al. Towards speciation of organically bound tritium and deuterium: Quantification of non-exchangeable forms in carbohydrate molecules // *Chemosphere*. 2018. Vol. 196. P. 120–128.
202. Usuki S., Nagai Y. Specific tritium labeling of glucosyl- and galactosylceramides at the 6-position of the carbohydrate moiety using CrO₃-graphite // *Anal. Biochem.* 1986. Vol. 152, № 1. P. 172–177.
203. Moser H.C., Nordin P., Senne J.K. Labeling carbohydrates by exposure to energetic tritium atoms // *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1964. Vol. 15, № 9. P. 557–559.
204. Klauschenz E. et al. Tritium labeling of gonadotropin releasing hormone in its proline and histidine residues // *Peptides*. 1981. Vol. 2, № 4. P. 445–452.
205. Bienert M. et al. Direct tritium-labelling into histidine of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and use of the tracers in studies on proteolytic breakdown // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1983. Vol. 761, № 2. P. 183–190.
206. Maxwell R.A., Anderson R.J., Schooley D.A. Simultaneous Preparation of Both Enantiomers of Juvenile Hormones Labeled at C-10 with Tritium at High Specific Activity // *Anal. Biochem.* 2002. Vol. 305, № 1. P. 40–48.
207. Alvarez R., Daniels D. V. A separation method for the assay of adenylyl cyclase, intracellular cyclic AMP, and cyclic-AMP phosphodiesterase using tritium-labeled substrates // *Anal. Biochem.* 1992. Vol. 203, № 1. P. 76–82.
208. Weissman B.P. et al. Heavy atom labeled nucleotides for measurement of kinetic isotope effects // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 2015. Vol. 1854, № 11. P. 1737–1745.
209. Matthes K.J., Abraham S., Chaikoff I.L. Hydrogen transfer in fatty acid synthesis by rat liver and mammary-gland cell-free preparations studied with tritium-labelled pyridine nucleotides and glucose // *Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Lipids Relat. Subj.* 1963. Vol. 70. P. 242–259.
210. Risseuw M.D.P. et al. Synthesis of tritium labeled KRN7000 // *Tetrahedron Lett.* 2006. Vol. 47, № 22. P. 3677–3679.
211. Matveev S. V et al. Tritium-labeled (E,E)-2,5-bis(4'-hydroxy-3'-carboxystyryl)benzene as a probe for β -amyloid fibrils // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. Vol. 24, № 23. P. 5534–5536.
212. Chernysheva M.G. et al. Self-organization of lysozyme-Ionic surfactant complexes at the aqueous-air interface as studied by tritium bombardment.

- // Colloids Surfaces, A Physicochem. Eng. Asp. Elsevier B.V., 2017. Vol. 520. P. 1–8.
213. Chernysheva M.G. et al. Lysozyme-surfactant adsorption at the aqueous-air and aqueous-organic liquid interfaces as studied by tritium probe. // Colloids Surfaces, A Physicochem. Eng. Asp. Elsevier B.V., 2018. Vol. 537. P. 351–360.
 214. Abmetko I. V et al. Tritium labelling to study humic substance-nanodiamond composites // Environ. Res. 2021. Vol. 193. P. 110396.
 215. Myasnikov I.Y. et al. Presonication of nanodiamond hydrosols in radiolabeling by a tritium thermal activation method. // Mendeleev Commun. Elsevier B.V., 2018. Vol. 28, № 5. P. 495–496.
 216. Michael J. Kuhar. Localizing Drug and Neurotransmitter Receptors in Vivo with Tritium-Labeled Tracers // Receptor Binding Radiotracers. CRC Rress, 2019. P. 37–50.
 217. Elmore C.S. Chapter 25 The Use of Isotopically Labeled Compounds in Drug Discovery / ed. Macor J.E. Academic Press, 2009. Vol. 44. P. 515–534.
 218. Harnud S., Zhang A., Yuan Z. Synthesis of tritium-labeled cyadox, a promising antimicrobial growth-promoting agent with high specific activity // Appl. Radiat. Isot. 2018. Vol. 139. P. 244–250.
 219. Lee D.Y.W., Zhang X., Ji X.S. Preparation of tritium-labeled Silybin—a protectant for common liver diseases // J. Label. Compd. Radiopharm. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 49, № 12. P. 1125–1130.
 220. Mo Dong and Guangliang Bao. Study on Chinese herbal medicine active ingredients labelled with tritium // J. Isot. 2008. Vol. 21.
 221. Filer, C. N.; Hainley, Ch.; Nugent R.P. Tritiation of dopaminergic ligands (-)-lisuride and (+/-)-nomifensine // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2006. Vol. 267, № 2. P. 345.
 222. Krueger A., Lang D. Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond // Adv. Funct. Mater. 2012. Vol. 22, № 5. P. 890–906.
 223. Reina G. et al. Chemical Functionalization of Nanodiamonds: Opportunities and Challenges Ahead // Angew. Chemie Int. Ed. 2019. Vol. 58, № 50. P. 17918–17929.
 224. Jariwala D.H., Patel D., Wairkar S. Surface functionalization of nanodiamonds for biomedical applications // Mater. Sci. Eng. C. 2020. Vol. 113. P. 110996.

225. Wang X. et al. Effective Surface Functionalization of Nanocrystalline Diamond Films by Direct Carboxylation for PDGF Detection via Aptasensor // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2012. Vol. 4, № 7. P. 3526–3534.
226. Girard H.A. et al. Surface properties of hydrogenated nanodiamonds: a chemical investigation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* The Royal Society of Chemistry, 2011. Vol. 13, № 24. P. 11517–11523.
227. Mingalev P.G., Surmillo A.S., Lisichkin G. V. Brominated Nanodiamond as a Platform for Isoniazid Immobilization // *Colloid J.* 2021. Vol. 83, № 3. P. 352–355.
228. Jung H.-S., Neuman K.C. Surface Modification of Fluorescent Nanodiamonds for Biological Applications // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, № 1.
229. Qu J. et al. Amidated nanodiamonds prepared by mechanochemical technology and their dispersion properties // *Appl. Nanosci.* 2021. Vol. 11, № 6. P. 1839–1846.
230. Zhang X. et al. PEGylation and polyPEGylation of nanodiamond // *Polymer (Guildf)*. 2012. Vol. 53, № 15. P. 3178–3184.
231. Shenderova O. et al. Hydroxylated Detonation Nanodiamond: FTIR, XPS, and NMR Studies. // *J. Phys. Chem. C*. American Chemical Society, 2011. Vol. 115, № 39. P. 19005–19011.
232. Mochalin V.N. et al. High Temperature Functionalization and Surface Modification of Nanodiamond Powders // *MRS Proc.* 2011/02/01. Cambridge University Press, 2007. Vol. 1039. P. 1003–1039.
233. Chernysheva M.G. et al. Peculiarities of atomic hydrogen interactions with detonation nanodiamonds // *Mendeleev Commun.* 2023. Vol. 33, № 2. P. 228–230.
234. John P. et al. The oxidation of (100) textured diamond // *Diam. Relat. Mater.* 2002. Vol. 11, № 3. P. 861–866.
235. Yang W. et al. Interfacial Electrical Properties of DNA-Modified Diamond Thin Films: Intrinsic Response and Hybridization-Induced Field Effects // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 16. P. 6778–6787.
236. Miller J.B., Brown D.W. Photochemical Modification of Diamond Surfaces // *Langmuir*. American Chemical Society, 1996. Vol. 12, № 24. P. 5809–5817.
237. Gunawan M.A. et al. Nanodiamond-Palladium Core–Shell Organohybrid Synthesis: A Mild Vapor-Phase Procedure Enabling Nanolayering Metal

- onto Functionalized sp³-Carbon // *Adv. Funct. Mater.* 2018. Vol. 28, № 13. P. 1705786.
238. Wang D. et al. Effect of Nanodiamond Content in the Plating Solution on the Corrosion Resistance of Nickel–Nanodiamond Composite Coatings Prepared on Annealed 45 Carbon Steel // *Coatings*. 2022. Vol. 12, № 10.
239. Chi Hian L. et al. Nanodiamond Thin Film Electrodes: Metal Electro-Deposition and Stripping Processes // *Electroanalysis*. 2003. Vol. 15, № 3. P. 169–174.
240. Gottlieb S. et al. Simultaneous synthesis of nanodiamonds and graphene via plasma enhanced chemical vapor deposition (MW PE-CVD) on copper // *Springerplus*. 2016. Vol. 5, № 1. P. 568.
241. Isakova V.G. et al. Surface Modification of Detonation Nanodiamonds with Platinum and Palladium Nanoparticles // *Int. J. Chem.* 2014. Vol. 7, № 1. P. 1–9.
242. Chi Hian L. et al. Nanodiamond Thin Film Electrodes: Metal Electro-Deposition and Stripping Processes // *Electroanalysis*. John Wiley & Sons, Ltd, 2003. Vol. 15, № 3. P. 169–174.
243. Zhang Y. et al. Oxygen reduction on Au nanoparticle deposited boron-doped diamond films // *Electrochim. Acta*. 2003. Vol. 48, № 6. P. 741–747.
244. Ohnishi K. et al. Electrochemical Glucose Detection Using Nickel-Implanted Boron-Doped Diamond Electrodes // *Electrochem. Solid-State Lett.* The Electrochemical Society, Inc., 2002. Vol. 5, № 3. P. D1.
245. Spataru N. et al. Electrochemical Behavior of Cobalt Oxide Films Deposited at Conductive Diamond Electrodes // *J. Electrochem. Soc.* The Electrochemical Society, Inc., 2003. Vol. 150, № 7. P. E337.
246. Ferro S., De Battisti A. Electrocatalysis and Chlorine Evolution Reaction at Ruthenium Dioxide Deposited on Conductive Diamond // *J. Phys. Chem. B*. American Chemical Society, 2002. Vol. 106, № 9. P. 2249–2254.
247. Chu, Ya-Qing and Tong, Yi and Huang, Feng-Lei and Zhang T.-L. Structure and properties of boundary layer between nanodiamond and resin matrix // *Trans. Beijing Inst. Technol.* 2013. Vol. 33, № 1. P. 1–5.
248. Wang J. et al. No Title // *Sci. Eng. Compos. Mater.* 2017. Vol. 24, № 2. P. 271–278.
249. Wenjun W.L.D.J.L.X.H.F. Research on the surface modification of diamond with silane coupling agent // *J. Hunan Univ.* 2013. Vol. 40, № 4. P. 71–74.

250. Grimme, Stefan and Antony, Jens and Schwabe, Tobias and Muck-Lichtenfeld C. Density functional theory with dispersion corrections for supramolecular structures, aggregates, and complexes of (bio) organic molecules // *Org. Biomol. Chem.* 2007. Vol. 5, № 5. P. 741–758.
251. Шэнь Т., Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Попов А.Г., Михеев И.В., Чащин И.С., Анучина Н.М. Б.Н.П. Комплексы наноалмазов с лекарственными средствами для ксеногенных протезов сердечного клапана // *Сборник тезисов докладов Международной конференции Нанюглерод и Наноалмаз.* 2024. Vol. O5, № 5. P. 4.
252. Chernysheva M.G. et al. Preparation of Nanodiamond–Lysozyme–Miramistin Composite and Prospects of Its Application in Heart Valve Prosthetics // *Colloid J.* 2024. Vol. 86, № 1. P. 120–129.
253. Perevedentseva E. et al. Characterizing Protein Activities on the Lysozyme and Nanodiamond Complex Prepared for Bio Applications // *Langmuir.* American Chemical Society, 2011. Vol. 27, № 3. P. 1085–1091.
254. Bondar' V.S., Pozdnyakova I.O., Puzyr' A.P. Applications of nanodiamonds for separation and purification of proteins // *Phys. Solid State.* 2004. Vol. 46, № 4. P. 758–760.
255. Huang H. et al. Active Nanodiamond Hydrogels for Chemotherapeutic Delivery // *Nano Lett.* American Chemical Society, 2007. Vol. 7, № 11. P. 3305–3314.
256. Li J. et al. Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug // *Biomaterials.* 2010. Vol. 31, № 32. P. 8410–8418.
257. Liu K.-K. et al. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy. // *Nanotechnology.* Institute of Physics Publishing, 2010. Vol. 21, № 31. P. 315106/1-315106/14.
258. Chaschin I.S. et al. Coating based on chitosan/vancomycin nanoparticles: Patterns of formation in a water-carbon dioxide biphasic system and in vivo stability // *Int. J. Biol. Macromol.* 2024. Vol. 278. P. 134940.
259. Perepelkin E.I. et al. Composite chitosan-based nanoparticles as a basis for innovative antimicrobial coating for bioprosthesis: Preparation and application using carbonic acid as a “green” self-neutralizing solvent // *Eur. Polym. J.* 2023. Vol. 193. P. 112104.
260. Morimune S. et al. Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites with Nanodiamond // *Macromolecules.* American Chemical Society, 2011. Vol. 44, № 11. P. 4415–4421.

261. Bilal M. et al. Bio-applications and biotechnological applications of nanodiamonds // *J. Mater. Res. Technol.* 2021. Vol. 15. P. 6175–6189.
262. Barras A. et al. Functionalization of Diamond Nanoparticles Using “Click” Chemistry // *Langmuir*. American Chemical Society, 2010. Vol. 26, № 16. P. 13168–13172.
263. Mochalin V.N., Gogotsi Y. Wet Chemistry Route to Hydrophobic Blue Fluorescent Nanodiamond // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2009. Vol. 131, № 13. P. 4594–4595.
264. Lee S., Shin J.Y., Lee S. Ionic CNT-supported Ru–carbene complex for recyclable ring-closing metathesis // *Tetrahedron Lett.* 2013. Vol. 54, № 7. P. 684–687.
265. Nishikawa M. et al. Thorough elucidation of synthesis and structure of poly(glycerol) functionalized nanodiamonds // *Carbon N. Y.* 2023. Vol. 205. P. 463–474.
266. Синолиц А.В. Адсорбционная модификация наноалмазов меченными тритием катионными поверхностно-активными веществами и полисахаридами. 2022. 169 p.
267. Стерилизация медицинских изделий МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ Часть 1 Оценка популяции микроорганизмов на продукции // ГОСТ Р ИСО 11737-1-2000. 2014.
268. Chaschin I.S. et al. Structural and mechanical characteristics of collagen tissue coated with chitosan in a liquid CO₂/water system at different pressures. // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* Elsevier Ltd., 2019. Vol. 94. P. 213–221.
269. 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.
270. 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.
271. Chaschin I.S. et al. Modification of the Collagen Tissue of the Bioprosthesis of Heart Valves in a Solution of Carbonic Acid: Effect of Pressure on Adsorption of Chitosan and the Structure of the Tissue // XIV International Scientific and Practical Conference “New Polymer Composite Materials.” Trans Tech Publications Ltd, 2018. Vol. 935. P. 100–107.

272. Abukhadra M.R. et al. Enhanced adsorption of toxic and biologically active levofloxacin residuals from wastewater using clay nanotubes as a novel fixed bed: Column performance and optimization. // ACS Omega. American Chemical Society, 2020. Vol. 5, № 40. P. 26195–26205.
273. Hu Q., Zhang Z. Application of Dubinin–Radushkevich isotherm model at the solid/solution interface: A theoretical analysis // J. Mol. Liq. 2019. Vol. 277. P. 646–648.
274. Chabani M., Amrane A., Bensmaili A. Kinetic modelling of the adsorption of nitrates by ion exchange resin // Chem. Eng. J. 2006. Vol. 125, № 2. P. 111–117.
275. Atkins P. P.J. de. Atkins' Physical chemistry - Eight Edition. 8th ed. Oxford University Press, 2006.
276. Petit T., Puskar L. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. // Diam. Relat. Mater. Elsevier B.V., 2018. Vol. 89. P. 52–66.
277. Vasilica Țucureanu A.M., Avram A.M. FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study // Crit. Rev. Anal. Chem. Taylor & Francis, 2016. Vol. 46, № 6. P. 502–520.
278. Wolff M. et al. Prosthetic valve endocarditis in the ICU. Prognostic factors of overall survival in a series of 122 cases and consequences for treatment decision // Chest. 1995. Vol. 108, № 3. P. 688–694.
279. Yu V.L. et al. Prosthetic valve endocarditis: superiority of surgical valve replacement versus medical therapy only // Ann. Thorac. Surg. 1994. Vol. 58, № 4. P. 1073–1077.
280. Broussou D.C. et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing Staphylococcus aureus Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model // Front. Microbiol. 2018. Vol. 9.
281. Скребкова А. С. Особенности взаимодействия лизоцима с мирамистином, амикацином, левофлоксацином и даларгином по данным радиохимических и спектроскопических методов анализа. 2023. 158 p.
282. Бадун Г.А., Лукашина, Е.В. Ксенофонов А.Л.Ф.В.М. Кинетические закономерности образования меченых продуктов при действии атомарного трития на замороженные растворы и лиофилизованные смеси аминокислот // Радиохимия. 2001. Vol. 43, № 3. P. 272–276.

283. Сидоров Г.В. et al. Сравнительное изучение реакций термически активированного трития и твердофазной каталитической гидрогенизации тритием с сахарами и диазинами // Радиохимия. 2005. Vol. 47, № 3. P. 284–288.
284. Бадун Г.А. et al. Сравнительное исследование взаимодействия атомарного трития с глюкозамином и аминокислотами // Радиохимия. 2005. Vol. 47, № 3. P. 281–283.
285. Хамизов Р.Х. О кинетическом уравнении псевдо-второго порядка в сорбционных процессах // Журнал физической химии. Russ. Acad. Sci. 2020. Vol. 94, № 1. P. 125–130.
286. Masse M. et al. Evaluation of the stability of vancomycin solutions at concentrations used in clinical services // Eur. J. Hosp. Pharm. BMJ Specialist Journals, 2020. Vol. 27, № e1. P. e87--e92.
287. Cauda V. et al. Large antibiotic molecule diffusion in confined mesoporous silica with controlled morphology // J. Mater. Chem. The Royal Society of Chemistry, 2008. Vol. 18, № 48. P. 5888–5899.
288. Jia Z. et al. Vancomycin: ligand recognition, dimerization and super-complex formation // FEBS J. 2013. Vol. 280, № 5. P. 1294–1307.
289. Carmona P., Rodriguez M.L. Hydrogen bonding between phosphate and amino acid side chains // J. Mol. Struct. 1986. Vol. 143. P. 365–368.
290. Salter C.J., Mitchell R.C., Drakeb A.F. Infrared spectroscopic studies of vancomycin and its interactions with. 1995.
291. Nouruzi E. et al. Effect of poly (lactic-co-glycolic acid) polymer nanoparticles loaded with vancomycin against Staphylococcus aureus biofilm // BMC Biotechnol. 2023. Vol. 23, № 1. P. 39.
292. Socrates G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. 3rd ed. / ed. Journal of Raman Spectroscopy. John Wiley & Sons, 2001. 347 p.
293. Chaschin I.S. et al. Chitosan/hyaluronic acid polyanion bilayer applied from carbon acid as an advanced coating with intelligent antimicrobial properties for improved biological prosthetic heart valves // Int. J. Biol. Macromol. 2022. Vol. 222. P. 2761–2774.
294. Zhang X. et al. Surfactant-dispersed nanodiamond: biocompatibility evaluation and drug delivery applications // Toxicol. Res. (Camb). 2013. Vol. 2, № 5. P. 335–342.
295. Setyawati M.I., Mochalin V.N., Leong D.T. Tuning Endothelial Permeability with Functionalized Nanodiamonds // ACS Nano. American Chemical Society, 2016. Vol. 10, № 1. P. 1170–1181.

296. Badun G.A. et al. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method // *Radiochim. Acta*. 2014. Vol. 102, № 10. P. 941–946.
297. Khokhlova M.A., Gallyamov M.O., Khokhlov A.R. Chitosan nanostructures deposited from solutions in carbonic acid on a model substrate as resolved by AFM // *Colloid Polym. Sci.* 2012. Vol. 290, № 15. P. 1471–1480.
298. Arcidiacono G., Corvi A., Severi T. Functional analysis of bioprosthetic heart valves // *J. Biomech.* 2005. Vol. 38, № 7. P. 1483–1490.
299. Parry D.A.D. The molecular fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue // *Biophys. Chem.* 1988. Vol. 29, № 1. P. 195–209.
300. Cohn D. et al. Mechanical behaviour of isolated pericardium: species, isotropy, strain rate and collagenase effect on pericardial tissue // *Clin. Mater.* 1987. Vol. 2, № 2. P. 115–124.
301. Gallyamov M.O. et al. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2014. Vol. 37. P. 127–140.
302. Zhu Y. et al. Excessive Sodium Ions Delivered into Cells by Nanodiamonds: Implications for Tumor Therapy // *Small*. 2012. Vol. 8, № 11. P. 1771–1779.
303. Kaur R., Badea I. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems // *Int. J. Nanomedicine*. Dove Medical Press, 2013. Vol. 8. P. 203–220.
304. 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.