

ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 577.332.23:539.199

ОЦЕНКА МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОМЕТРИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ  
В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ ВНУТРИВЕННО ВВЕДЕННЫХ НАНОАЛМАЗОВ

© 2019 г. Е. В. Инжеваткин<sup>\*,@</sup>, А. В. Барон<sup>\*\*,\*\*\*</sup>, Н. Г. Максимов<sup>\*\*\*\*</sup>, М. Б. Волкова<sup>\*,\*\*\*</sup>,  
А. П. Пузырь<sup>\*\*,\*</sup>, В. С. Бондарь<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма  
Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр СО РАН”,  
Россия, 660036 Красноярск, Академгородок, 50

<sup>\*\*</sup>Институт биофизики СО РАН Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр СО РАН”,  
Россия, 660036 Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50

<sup>\*\*\*</sup>Сибирский федеральный университет, Россия, 660041 Красноярск, просп. Свободный, 79

<sup>\*\*\*\*</sup>Институт химии и химической технологии СО РАН Федерального исследовательского центра  
“Красноярский научный центр СО РАН”, Россия, 660036 Красноярск, Академгородок, 50, стр. 24

@E-mail: [inscience@mail.ru](mailto:inscience@mail.ru)

Поступила в редакцию 12.09.2017 г.

После доработки 27.03.2018 г.

Принята к публикации 16.04.2018 г.

С использованием электронного парамагнитного резонанса (ЭПР-спектроскопии) исследовано распределение в организме мышечной ткани внутривенно введенных модифицированных нанодiamondов (МНА) взрывного синтеза. Показано, что через 2.5 ч после инъекции МНА в хвостовую вену мышам наночастицы аккумулируются преимущественно в легких и печени животных, в почках и сердце обнаруживается на порядок меньше количество наночастиц. Наличие МНА в образцах крови, селезенки, головного мозга и мышц бедра мышечной ткани в пределах чувствительности использованного метода не выявлено.

DOI: 10.1134/S0002332919020073

Развитие нанотехнологии открывает новые возможности решения множества биомедицинских задач (Vo-Dinh, 2006; Surendiran *et al.*, 2009; Thanh, Green, 2010; Zamborini *et al.*, 2012). Прогнозируется, что применение наноматериалов разной физико-химической природы, например, в биологии, медицине, фармакологии, экологии, токсикологии позволит повысить эффективность используемых методов. Разрабатываются подходы к использованию наноматериалов в технологиях эффективного разделения и выделения биомолекул (Bondar *et al.*, 2004; Lynch, Dawson, 2008), создании средств индикации и диагностики (Artiles *et al.*, 2011; Fisher, Fadley, 2012; Lad, Agrawal, 2012; Kaur, Bada, 2013), препаратов для нейтрализации токсинов (Puzyr *et al.*, 2007a), самостоятельных терапевтических агентов (Gutwein, Webster, 2002; Tran *et al.*, 2009; Ishchenko *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Zhou, 2013; Ding *et al.*, 2016), управляемых или целевых носителей лекарств (Jin-Wook *et al.*, 2011; Plank *et al.*, 2011; Mochalis *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Исследователи, работающие в данной области, проявляют большой интерес к биомедицин-

скому применению разных форм нанодiamondа (фуллерены, нанотрубки, графен) (Lamanna *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Monaco, Giugliano, 2014; Kumar, 2015; Zhang, Naik, 2015; Kozak *et al.*, 2016; Maas, 2016). Один из перспективных материалов этой группы – нанодiamondы, получаемые методом детонационного синтеза, который был впервые разработан российскими учеными (Danilenko, 2004).

Совокупность физико-химических свойств нанодiamondов (прежде всего, химически активная полиморфная поверхность и возможности ее химической модификации, малая токсичность и высокая биосовместимость) открывает возможности и перспективы использования данных наночастиц в разнообразных биотехнологических и биомедицинских приложениях (Kueger, 2008; Schrand *et al.*, 2009; Kharisov *et al.*, 2010; Sung, Lin, 2010; Mochalis *et al.*, 2011; Say *et al.*, 2011; Shugalei *et al.*, 2013; Slegelova *et al.*, 2014), в частности в конструировании систем адресной доставки биологически активных субстанций и лекарственных препаратов, создании лечебных средств пролонгированного и комбинированного действия (Мо-

chalin *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012; Kaur, Badea, 2013; Shugalei *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Slegerova *et al.*, 2014).

Важно подчеркнуть, что использование наноматериалов в медицине (средства адресной доставки лекарств, терапевтические и диагностические агенты) предполагает возможность введения нанообъектов в организм пациента. При этом ключевой аспект — четкое представление о характере распределения в организме введенных наночастиц, а также гарантия их биодegradации или элиминации после выполнения терапевтической (диагностической) функции. Это особенно важно при использовании нанообъектов, которые не подвергаются биодеструкции. Поскольку нанодиагностика относится к таким нанообъектам, возникает необходимость в изучении их межорганного распределения, накопления и путей элиминации после введения в организм. Важность таких исследований определяется возможностью возникновения нежелательных последствий при накоплении наночастиц в организме.

В Институте биофизики СО РАН (Красноярск) разработаны способы получения из нанодиагностики детонационного синтеза модифицированных нанодиагностики (МНА), обеспечивающие высокую коллоидную устойчивость наночастиц в водных суспензиях (включая стерилизацию) (Bondar, Puzyr, 2004; Puzyr, Bondar, 2005). Это позволило определить перспективы их использования в биомедицинских исследованиях и изучить применимость МНА в разработке технологий разделения и очистки биомолекул (Bondar *et al.*, 2004; Puzyr *et al.*, 2007b; Purtov *et al.*, 2008; Baron *et al.*, 2014; Purtov *et al.*, 2015), конструировании индикаторных и диагностических тест-систем, включая системы многофазового действия (Ronzhin *et al.*, 2013, 2017), для связывания и нейтрализации токсикантов (Puzyr *et al.*, 2007a; Prokhorenkov *et al.*, 2014; Vasilyeva *et al.*, 2016), в создании новых лечебных средств пролонгированного и комбинированного действия (Mogilnaya, Bondar, 2012; Baron *et al.*, 2016; Medvedeva *et al.*, 2016).

Одно из перспективных биомедицинских приложений МНА связано с возможностью конструирования на их основе систем адресной доставки биологически активных веществ (Purtov *et al.*, 2010). При этом следует отметить, что оценка распределения МНА в организме, например, после их внутривенного введения животным сопряжена с определенными методическими трудностями. Существует возможность маркировки наночастиц флуоресцентными или радиоактивными метками за счет их ковалентной пришивки на МНА (Purtov *et al.*, 2015). Однако прямая детекция МНА представляется наиболее корректной, поскольку дает возможность получить объектив-

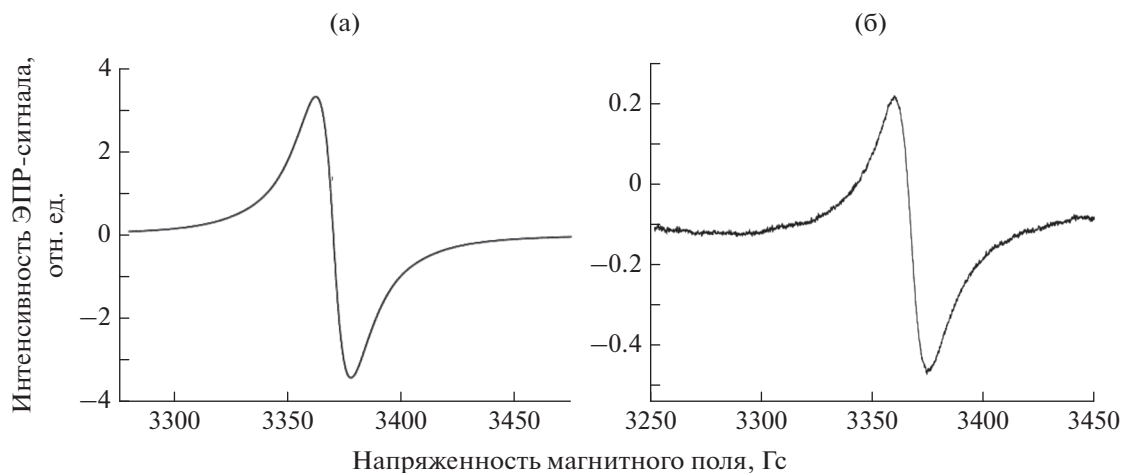
ную информацию при изучении их межорганного распределения. Она позволяет избежать ошибок в трактовке результатов, связанных с возможной десорбцией иммобилизованной метки с поверхности наночастиц в условиях биологической среды организма. Для прямой детекции МНА может быть использован метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), который позволяет выявлять наночастицы с парамагнитными центрами. Известно, что у нанодиагностики взрывного синтеза, в том числе МНА, есть парамагнитные центры (Puzyr *et al.*, 2005; Солтамова и др., 2010).

Цель работы — оценить применимость метода ЭПР-спектроскопии для анализа распределения МНА в организме мышей после внутривенного введения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были использованы МНА со средним размером кластеров в гидрозолях  $d_{50} = 70.6$  нм (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Англия), полученные из взрывных нанодиагностики российского производства (ООО «Реал-Дзержинск») разработанным ранее способом (Bondar, Puzyr, 2004; Puzyr, Bondar, 2005). Исходный гидрозоль с концентрацией наночастиц 1 мг/мл готовили добавлением деионизованной воды (Milli-Q-system, Millipore, США) к навеске порошка МНА. Для модельных экспериментов *in vitro* из исходного гидрозоля МНА последовательными разведениями деионизованной водой готовили также ряд суспензий с уменьшающейся концентрацией наночастиц. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* использовали мышей ICR (самцов массой 26–28 г), при работе с животными соблюдали принципы эвтаназии.

Модельные эксперименты *in vitro* проводили следующим образом: мышей усыпляли эфирным наркозом, и брали кровь из подключичной артерии. Затем животных умерщвляли цервикальной дислокацией и извлекали органы с помощью пластиковых и керамических инструментов для исключения контаминации биоматериалов частями металла. Для исследований брали печень, селезенку, почки, сердце, головной мозг, мышцы бедра и легкие. Извлеченные органы помещали на лед и после удаления примесей соединительной и жировой тканью разрушали в дистиллированной воде с помощью ручного гомогенизатора (система стекло–стекло). При гомогенизации использовали следующие соотношения масса органа–объем воды: печень 1 : 1, селезенка 1 : 10, почки 1 : 4, сердце 1 : 10, головной мозг 1 : 3, мышцы бедра 1 : 3, легкие 1 : 6. К полученным гомогенатам и образцам крови добавляли приготовленные гидрозоли МНА с разной концентрацией наночастиц в соотношении 1 : 4 – 200 мкл гидрозоля к



**Рис. 1.** ЭПР-спектры водного золя модифицированных наноалмазов (МНА) (а) и гомогенатов селезенки (б) с добавлением МНА (концентрация наночастиц 0.04 мг/мл).

800 мкл образца биоматериала. При этом финальная концентрация МНА в образцах составляла 200, 40, 8 и 1.6 мкг/мл. В контрольные образцы биоматериалов (гомогенаты и кровь) вместо суспензии МНА добавляли дистиллированную воду в указанном выше соотношении. Все образцы перемешивали, помещали в пластиковые контейнеры и замораживали в жидком азоте. После этого замороженные образцы извлекали из контейнеров и помещали при температуре жидкого азота в специальный держатель, который переносили в резонатор ЭПР-спектрометра Elexsys E580 (Bruker, Германия), и регистрировали ЭПР-спектры при температуре 85–90 К. ЭПР-исследования были выполнены в ЦКП ФИЦ КНЦ СО РАН.

В экспериментах *in vivo* водную суспензию МНА вводили мышам в хвостовую вену в дозе 40 мг наночастиц на 1 кг массы животного. Оценку распределения МНА в организме животных проводили через 2.5 ч после инъекции наночастиц. Получение образцов биоматериалов (кровь и гомогенаты органов) и регистрацию ЭПР-спектров осуществляли так, как отмечено выше.

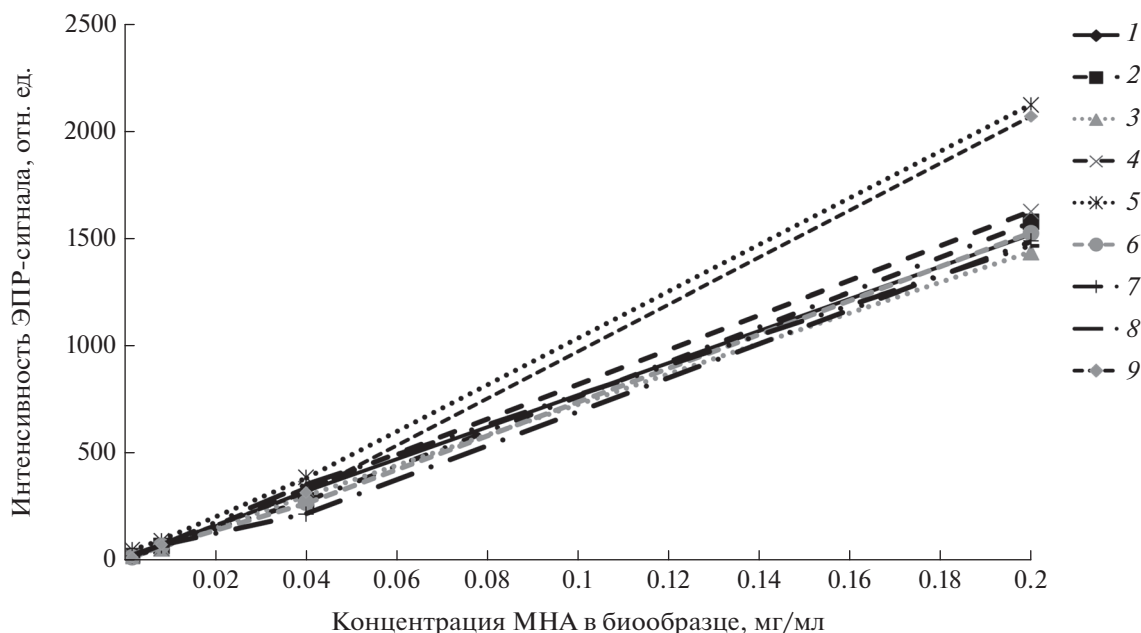
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных экспериментах *in vitro* мы установили, что для выявления МНА в биоматериалах методом ЭПР-спектроскопии важное условие — глубокое замораживание исследуемого образца при низких температурах и увеличение его объема. В связи с этим были разработаны оригинальные пластиковые контейнеры, которые позволяют замораживать образцы в жидком азоте, и специальный держатель, позволяющий осуществлять перенос замороженных образцов из

контейнеров при температуре жидкого азота. Применение держателя дало возможность использовать безампульный способ фиксации образца в резонаторе ЭПР-спектрометра и увеличить объем проб биоматериалов.

На начальном этапе исследований было показано (рис. 1а), что в ЭПР-спектрах гидрозолей МНА наблюдается характерный сигнал ( $g = 2.003$ ,  $\Delta H \approx 10$  Гс). Ранее мы отмечали (Puzyr *et al.*, 2005), что в образцах МНА с разными размерами кластеров регистрируется симметричный ЭПР-сигнал при  $g = 2.003$ , который связан с наличием парамагнитных центров в данных наночастицах. Как следует из модельных экспериментов *in vitro* (рис. 1б), при добавлении суспензии МНА в образцы крови и гомогенатов органов мышей ЭПР-сигнал сохраняет свои основные характеристики. Это свидетельствует о том, что метод ЭПР-спектроскопии позволяет обнаруживать МНА в биологических материалах.

При ЭПР-исследованиях контрольных (не содержащих МНА) образцов всех биоматериалов в них было выявлено наличие собственных парамагнитных центров (радикалы, гемсодержащие белки и др.), сигналы которых накладываются на сигнал МНА. В то же время было установлено, что при тех объемах биообразцов, которые были использованы в экспериментах, значения их собственных ЭПР-сигналов, как правило, невелики и не оказывают влияния на точность детекции наночастиц. Тем не менее для большей корректности определения МНА в биоматериалах мы вычитали из значения ЭПР-сигнала опытного образца (с добавлением МНА) значение ЭПР-сигнала контрольного образца (без МНА).



**Рис. 2.** Интенсивность ЭПР-сигнала в зависимости от концентрации модифицированных наноалмазов (МНА) в гидрозолях, крови и гомогенатах тканей животных. 1 — головной мозг, 2 — селезенка, 3 — легкие, 4 — почки, 5 — печень, 6 — мышцы, 7 — сердце, 8 — вода, 9 — кровь.

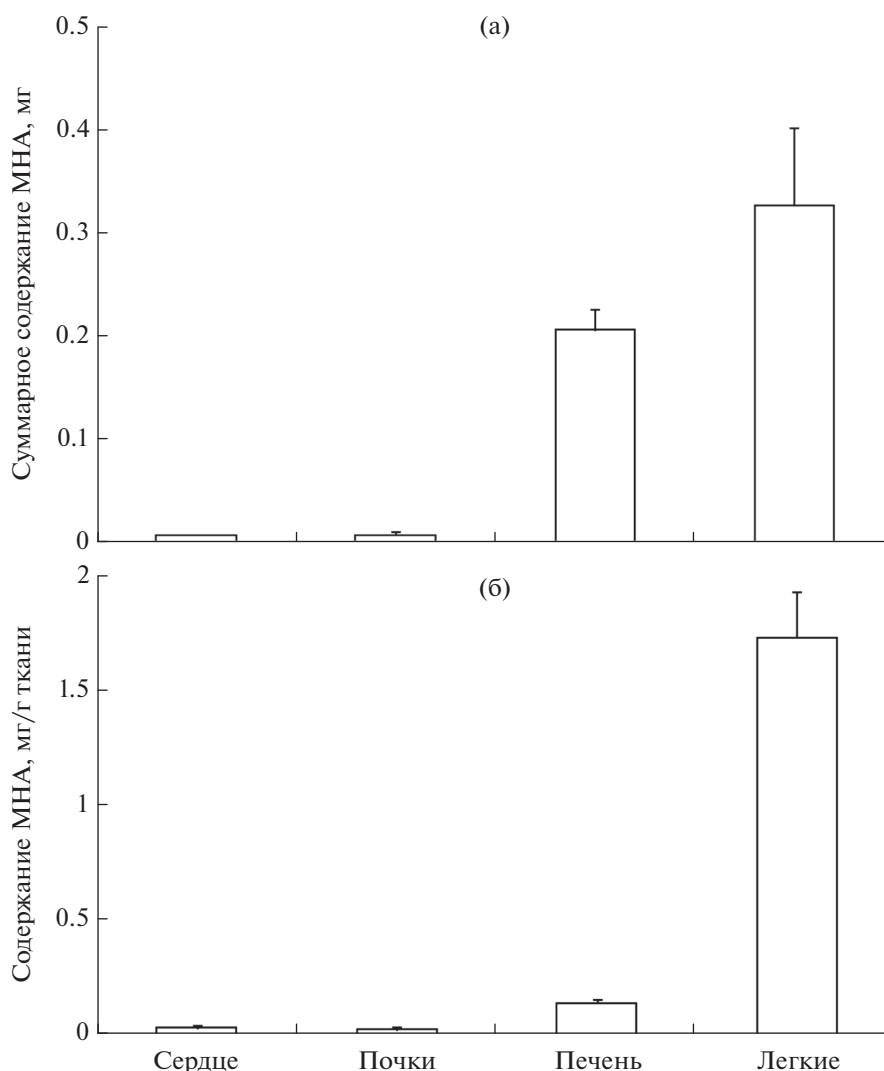
В модельных экспериментах *in vitro* было установлено также, что интенсивность регистрируемого ЭПР-сигнала пропорциональна концентрации МНА как в гидрозолях, так и в образцах изучаемых биоматериалов (рис. 2). Как следует из представленных данных, линейность сигнала сохраняется в широком диапазоне концентраций МНА в биологических образцах — от 1.6 до 200 мкг наночастиц на 1 мл образца. Это дает возможность проводить количественную оценку содержания МНА в биоматериалах.

Из представленных на рис. 2 данных видно, что при одинаковых концентрациях МНА в опытных образцах крови и гомогенатов печени регистрируются более высокие значения сигналов ЭПР по сравнению с другими исследованными образцами. При этом в большей степени такие различия проявляются при высокой (200 мкг/мл) концентрации наночастиц в образце биоматериала. Причины наблюдаемых различий пока неясны. Вероятно, они могут быть связаны с дополнительным образованием в образцах крови и гомогенатов печени собственных парамагнитных центров под действием МНА. Например, это может происходить при деструкции белых и красных клеток крови. В экспериментах *in vitro* ранее мы показали, что воздействие наноалмазов на красные и белые клетки крови вызывает их деструкцию и активацию образования активных радикалов кислорода

клетками белого ряда (Puzyr *et al.*, 2004). При этом было установлено, что эффект стимуляции образования радикалов кислорода дозозависим. Отмеченные факты позволяют предположить, что образование дополнительных парамагнитных центров в образцах крови и гомогенатах печени может происходить за счет увеличения пула свободного гемоглобина при деструкции эритроцитов и возрастания пула радикалов кислорода при деструкции клеток белого ряда.

Мы полагаем, что эта версия правомочна в обоих рассматриваемых случаях. Общеизвестно, что печень хорошо снабжается кровью, и гомогенаты этого органа могут содержать большое количество ее форменных элементов, а также, что в гепатоцитах содержится большое количество цитохромов, способных продуцировать кислородные радикалы. Тем не менее упомянутые выше предположения требуют отдельного анализа.

В наших исследованиях *in vivo* было показано (рис. 3а), что через 2.5 ч после внутривенной инъекции МНА мышам наибольшее их количество регистрируется методом ЭПР-спектрометрии в легких и печени животных. Расчеты, проведенные с учетом зависимостей ЭПР-сигналов от концентрации МНА в биобразцах (рис. 2), свидетельствуют о том, что от суммарной дозы введенных наночастиц через указанное время в легких и печени мышей их аккумулируется до 24 и



**Рис. 3.** Суммарное (а) и расчетное (б) содержание модифицированных наноалмазов (МНА) в органах и в 1 г ткани органов животных соответственно через 2.5 ч после внутривенного введения.

18% соответственно. Согласно полученным данным в сердце и почках животных выявляется значительно меньшее (на 1–1.5 порядка) количество наночастиц (рис. 3а). МНА в образцах крови, селезенки, головного мозга и мышц бедра в пределах чувствительности использованного ЭПР-метода не выявлены.

В пользу значительно большей эффективности накопления МНА в легочной ткани животных по сравнению с тканями других изучаемых органов свидетельствуют и расчеты содержания наночастиц на единицу массы органа (рис. 3б). Из них следует, что в ткани легкого МНА аккумулируются практически на порядок эффективнее, чем в ткани печени. Кроме того, наименьшая эффективность накопления МНА наблюдается в тканях почек и сердца.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в модельных экспериментах *in vitro* установлена применимость метода ЭПР-спектromетрии для детекции и количественной оценки МНА в биологических материалах. Показано, что в содержащих МНА образцах крови и гомогенатах органов мышей наблюдается характерный ЭПР-сигнал ( $g = 2.003$ ,  $\Delta H \approx 10$  Гс), амплитуда которого линейно зависит от концентрации наночастиц (1.6–200 мкг на 1 мл биообразца). Методом ЭПР в биоматериалах выявлено наличие собственных парамагнитных центров, сигналы которых накладываются на сигнал МНА. Однако показано, что интенсивность данных сигналов мала, и это позволяет регистрировать МНА в биоматериалах методом ЭПР-спектromетрии с необходимой точностью. В исследованиях *in vivo* про-

демонстрирована возможность регистрации методом ЭПР-спектроскопии распределения МНА в организме животных после внутривенного введения наночастиц. Показано, что через 2.5 ч после инъекции МНА в хвостовую вену мышам наночастицы аккумулируются преимущественно в легких и печени животных. В почках и сердце обнаруживается значительно меньшее (на порядок) количество наночастиц. МНА в образцах крови, селезенки, головного мозга и мышц бедра мышей методом ЭПР-спектроскопии не выявлены. Полученные данные открывают перспективы использования метода ЭПР для изучения динамики межорганного распределения, накопления и элиминации наноалмазов взрывного синтеза после их внутривенного введения в организм экспериментальных животных.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-00999).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Солтамова А.А., Ильин И.В., Шахов Ф.М., Кидалов С.В., Вуль А.Я., Явкин Б.В., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Баранов П.Г.* Обнаружение методом электронного парамагнитного резонанса гигантской концентрации азотно-вакантных дефектов в детонационных наноалмазах, подвергнутых спеканию // Письма в ЖЭТФ. 2010. Т. 92. Вып. 2. С. 106–110.
- Artiles M., Rout C.S., Fisher T.S.* Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. V. 63. P. 1352–1360.
- Baron A.V., Osipov N.V., Olkhovskiy I.A., Puzyr A.P., Bondar V.S.* Binding the immunoglobulins of human serum by nanodiamonds // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2014. V. 457. P. 158–159.
- Baron A.V., Osipov N.V., Yashchenko S.V., Kokotukha Yu.A., Baron I.I., Puzyr A.P., Olkhovskiy I.A., Bondar V.S.* Adsorption of viral particles from the blood plasma of patients with viral hepatitis on nanodiamonds // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 469. P. 244–246.
- Bondar V.S., Puzyr A.P.* Nanodiamonds for biological investigations // *Phys. Solid State.* 2004. V. 46. P. 716–719.
- Bondar V.S., Pozdnyakova I.O., Puzyr A.P.* Applications of nanodiamonds for separation and purification of proteins // *Phys. Solid State.* 2004. V. 46. P. 758–760.
- Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications* / Eds Zhang M., Naik R.R., Dai L. N.Y.: Springer, 2016. 576 p.
- Danilenko V.V.* On the history of the discovery of nanodiamond synthesis // *Phys. Solid State.* 2004. V. 46. P. 595–599.
- Ding X., Liu J., Li J., Wang F., Wang Y., Song S., Zhang H.* Polydopamine coated manganese oxide nanoparticles with ultrahigh relaxivity as nanotheranostic agents for magnetic resonance imaging guided synergetic chemophotothermal therapy // *Chem. Sci.* 2016. V. 7. P. 6695–6700.
- Fisher P., Fadley C.S.* Probing nanoscale behavior of magnetic materials with soft X-ray spectroscopy // *Nanotech. Rev.* 2012. V. 1. P. 5–15.
- Gutwein L.G., Webster T.J.* Osteoblast and chondrocyte proliferation in the presence of alumina and titania nanoparticles // *J. Nanopart. Res.* 2002. V. 4. P. 231–238.
- Ishchenko L.A., Stolyar S.V., Ladygina V.P., Raikher Yu.L., Balasoiu M., Bayakov O.A., Iskhakov R.S., Inzhevatkin E.V.* Magnetic properties and application of biomineral particles produced by bacterial culture // *Phys. Procedia.* 2010. V. 9. P. 279–282.
- Jin-Wook Y., Nishit D., Samir M.* Adaptive micro and nanoparticles: temporal control over carrier properties of facilitate drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. V. 63. P. 1247–1256.
- Kaur P., Badea I.* Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging // *Int. J. Nanomed.* 2013. V. 8. P. 203–220.
- Kharisov B.I., Kharissova O.V., Chavez-Guerrero L.* Synthesis techniques, properties, and applications of nanodiamonds // *Synth. React. Inorg., Metal-Org., Nano-Metal Chem.* 2010. V. 40. P. 84–101.
- Kozak O., Sudolska M., Pramanik G. Cigler P., Otyepka M., Zbořil R.* Photoluminescent carbon nanostructures // *Chem. Mater.* 2016. V. 28. P. 4085–4128.
- Krueger A.* New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials // *Chem. Eur. J.* 2008. V. 14. P. 1382–1390.
- Kumar A.* Fullerenes for biomedical applications // *J. Environ. Appl. Biores.* 2015. V. 3. P. 175–191.
- Lad A., Agrawal Y.K.* Nanodevices for monitoring toxicological behavior of therapeutic agent // *Rev. Nanosci. Nanotech.* 2012. V. 1. P. 217–227.
- Lamanna G., Battigelli A., Menard-Moyon C., Bianco A.* Multifunctionalized carbon nanotubes as advanced multimodal nanomaterials for biomedical applications // *Nanotech. Rev.* 2012. V. 1. P. 17–29.
- Lynch I., Dawson K.A.* Protein-nanoparticle interactions // *Nano Today.* 2008. V. 3. P. 40–47.
- Maas M.* Carbon nanomaterials as antibacterial colloids // *Materials.* 2016. V. 9. P. 617–636.
- Medvedeva N.N., Zhukov E.L., Inzhevatkin E.V., Bezzabotnov V.E.* Antitumor properties of modified detonation nanodiamonds and sorbed doxorubicin on the model of Ehrlich Ascites Carcinoma // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 160. P. 372–375.
- Mendes R.G., Bachmatiuk A., Buchner B.* Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms // *J. Mater. Chem. B.* 2013. V. 1. P. 401–428.
- Mochalin V.N., Shenderova O., Ho D., Gogotsi Y.* The properties and applications of nanodiamonds // *Nat. Nanotechnol.* 2011. V. 7. P. 11–23.
- Mogilnaya O.A., Bondar V.S.* Antibacterial properties of lysozyme immobilized on nanodiamonds // *Micro Nanosyst.* 2012. V. 4. P. 41–47.
- Monaco A.M., Giugliano M.* Carbon-based smart nanomaterials in biomedicine and neuroengineering // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014. V. 5. P. 1849–1863.

- Morachis J.M., Mahmoud E.A., Almutairi A.* Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles // *Pharmacol. Rev.* 2012. V. 64. P. 505–519.
- Nanotechnology in biology and medicine: methods, devices, and applications / Ed. Vo-Dinh T. N.Y.: *CRC Press.*, 2006. 792 p.
- Plank C., Zelphati O., Mykhalik O.* Magnetically enhanced nucleic acid delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. V. 63. P. 1300–1331.
- Prokhorenkov V.I., Vasil'eva E.Yu., Puzyr A.P., Bondar V.S.* Effects of nanodiamonds of explosive synthesis on the skin of experimental animals locally exposed to cobalt and chrome ions // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. V. 158. P. 264–267.
- Purtov K., Petunin A., Inzhevatin E., Burov A., Ronzhin N., Puzyr A., Bondar V.* Biodistribution of different sized nanodiamonds in mice // *J. Nanosci. Nanotech.* 2015. V. 15. P. 1070–1075.
- Purtov K.V., Burakova L.P., Puzyr A.P., Bondar V.S.* Interaction of linear and ring forms of DNA molecules with nanodiamonds synthesized by detonation // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. P. 1–3.
- Purtov K.V., Petunin A.I., Burov A.E., Puzyr A.P., Bondar V.S.* Nanodiamonds as a carriers for address delivery of biologically active substances // *Nanoscale Res. Lett.* 2010. V. 5. P. 631–636.
- Puzyr A.P., Bondar V.S.* Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability // RU Patent № 2252192. 2005. Bull. № 14.
- Puzyr A.P., Bondar V.S., Bukayemsky A.A., Selyutin G.E., Kargin V.F.* Physical and chemical properties of modified nanodiamonds // *NATO Sci. Ser. II. Math. Phys. Chem.* 2005. V. 192. P. 261–270.
- Puzyr A.P., Neshumayev D.A., Tarskikh S.V., Makarskaya G.V., Dolmatov V.Yu., Bondar V.S.* Destruction of human blood cells in interaction with detonation nanodiamonds in experiments in vitro // *Diam. Relat. Mater.* 2004. V. 13. P. 2020–2023.
- Puzyr A.P., Purtov K.V., Shenderova O.A., Luo M., Brenner D.W., Bondar V.S.* The adsorption of aflatoxin B1 by detonation-synthesis nanodiamonds // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007a. V. 417. P. 299–301.
- Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S.* Nanodiamonds with novel properties: a biological study // *Diam. Relat. Mater.* 2007b. V. 16. P. 2124–2128.
- Ronzhin N.O., Puzyr A.P., Bondar V.S.* On the applicability of nanodiamonds produced by detonation synthesis for phenol testing in aqueous media // *Dokl. Chem.* 2017. V. 475(1). P. 155–158.
- Ronzhin N.O., Baron A.V., Mamaeva E.S., Puzyr A.P., Bondar V.S.* Nanodiamond-based tests systems for biochemical determination of glucose and cholesterol // *J. Biomater. Nanobiotech.* 2013. V. 4. P. 242–246.
- Say J.M., van Vreden C., Reilly D.J., Brown L.J., Rabreau J.R., King N.J.C.* Luminescent nanodiamonds for biomedical applications // *Biophys. Rev.* 2011. V. 3. P. 171–184.
- Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A.* Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications // *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 2009. V. 34. P. 18–74.
- Shugalei I.V., Voznyakovskii A.P., Garabadzhiu A.V., Tselinskii I.V., Sudarikov A.M., Ilyushin M.A.* Biological activity of detonation nanodiamond and prospects in its medical and biological applications // *Rus. J. Gen. Chem.* 2013. V. 83. P. 851–883.
- Slegerova J., Rehor I., Havlik J., Raabova H., Muchova E., Cigler P.* Nanodiamonds as intracellular probes for imaging in biology and medicine // *Fundamental Biomedical Technologies 7, Intracellular Delivery II* / Eds Prokop A., Iwasaki Y., Harada A. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2014. P. 363–401.
- Sung J.C., Lin J.* Diamond nanotechnology: syntheses and applications. Singapore: Pan Stanford Publ. Pte. Ltd, 2010. 258 p.
- Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Adithan C.* Novel applications of nanotechnology in medicine // *Indian J. Med. Res.* 2009. V. 130. P. 689–701.
- Thanh N.T.K., Green L.A.W.* Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications // *Nano Today.* 2010. V. 5. P. 213–230.
- Tran P.A., Zhang L., Webster T.J.* Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. V. 61. P. 1097–1114.
- Vasilyeva E.Yu., Prokhorenkov V.I., Puzyr A.P., Bondar V.S.* The effects of nanodiamonds at the action of colored metal ions on the skin of Guinea pigs // *J. Biomater. Nanobiotech.* 2016. V. 7. P. 214–224.
- Wang D.X., Tong Y.L., Li Y.Q., Tian Z.M., Cao R.X., Yang B.S.* PEGylated nanodiamond for chemotherapeutic drug delivery // *Diam. Relat. Mater.* 2013. V. 36. P. 26–34.
- Xiao J., Duan X., Yin Q., Zhang Z., Yu H., Li Y.* Nanodiamonds-mediated doxorubicin nuclear delivery to inhibit lung metastasis of breast cancer // *Biomater.* 2013. V. 34. P. 9648–9656.
- Zamborini F.P., Bao L., Dasari R.* Nanoparticles in measurement science // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 541–576.
- Zhang X., Wang A.Q., Liu M., Hui J., Yang B., Tao L., Wei Y.* Surfactant-dispersed nanodiamond: biocompatibility evaluation and drug delivery applications // *Toxicol. Res.* 2013. V. 2. P. 335–342.
- Zhou Z.* Liposome formulation of fullerene-based molecular diagnostic and therapeutic agents // *Pharmaceutics.* 2013. V. 5. P. 525–541.
- Zhu Y., Li J., Zhang Y., Yang X., Chen N., Sun Y., Zhao Y., Fan C., Huang Q.* The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems // *Teranostics.* 2012. V. 2. P. 302–312.

## Using EPR-Spectrometry for the Investigation of Biodistribution of Nanodiamonds in Mice after Intravenous Injection

**E. V. Inzhevatkin<sup>1, #</sup>, A. V. Baron<sup>2, 3</sup>, N. G. Maksimov<sup>4</sup>, M. B. Volkova<sup>1, 3</sup>, A. P. Puzyr<sup>2</sup>, and V. S. Bondar<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*International Scientific Center for Studies of Extreme States of Organism, Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center”, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Biophysics, Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center”, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

<sup>3</sup>*Siberian Federal University, pr. Svobody 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

<sup>4</sup>*Institute of Chemistry and Chemical Technology, Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center”, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/24, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: inscience@mail.ru*

Using electron paramagnetic resonance (EPR-spectrometry) it was investigated the distribution of modified nanodiamonds (MNDs) in mice after intravenous injection. It was shown that 2.5 h after injection of MNDs into the tail vein of mice, nanoparticles accumulate mainly in the lungs and liver of animals. A smaller amount of nanoparticles is found in the kidneys and in the heart. The presence of MNDs in blood samples, spleen, brain and thigh muscles was not identified.