

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ НАНОАЛМАЗОВ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫСЫ МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ

Н.Т. Картель¹, Л.В. Иванов¹, А.Н. Ляпунов², О.А. Нардид³, О.В. Щербак⁴,
О.А. Гурова⁵, А.В. Окотруб⁶

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, ул. Генерала Наумова 17, Киев, 03164, Украина, e-mail: nikar@kartel.kiev.ua;

²Институт монокристаллов НАН Украины, пр. Ленина 60, Харьков, 61001, Украина;

³Институт криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская 23, Харьков, 61015, Украина, cryo@online.kharkov.ua;

⁴Харьковская зооветеринарная академия, ул. Академическая 1, пгт. Малая Даниловка, Дергачевский район, Харьковская обл., 62341, Украина, info@hdzva.edu.ua;

⁵Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, Пр. Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск 630090, Российская Федерация, niic@niic.nsc.ru;

⁶Новосибирский Государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск, Российская Федерация, 630090, rektor@nsu.ru

Методом ЭПР и спиновых зондов изучены некоторые особенности структуры детонационных алмазов (ДНА), антиоксидантные свойства и влияние наночастиц ДНА на микровязкость мембран эритроцитов крыс. Показано, что при концентрации ДНА в водной суспензии, равной 1 мг/мл происходит частичная агрегация частиц ДНА, которая исчезает при разведении суспензии. По спектрам ЭПР (восстановлению спинового зонда ТЕМПОЛ) установлено изменение антиоксидантной активности исследуемых ДНА со временем, что позволяет использовать метод ЭПР для быстрого тестирования образцов ДНА различных фирм-производителей. Расчет параметров спектров ЭПР показал, что присутствие в суспензии эритроцитов в концентрации 25 мкг/мл ДНА не влияет на время корреляции зонда в мембране в пределах ошибки эксперимента, а, соответственно, и на микровязкость мембран эритроцитов, что указывает на низкую цитотоксичность ДНА при этих концентрациях.

Ключевые слова: спиновый зонд, детонационные наноалмазы, электронный парамагнитный резонанс, парамагнитные центры, свободнорадикальные процессы, микровязкость мембран, биодоступность

Введение

В последние годы в качестве носителей лекарственных веществ (ЛВ) стали применяться детонационные наноалмазы (ДНА). Ранее были разработаны технологии, обеспечивающие высокую коллоидную устойчивость наноалмазов в водных суспензиях, включая их стерилизацию. Это открыло новые возможности для использования наноалмазов в качестве адресных носителей фармацевтических субстанций [1 – 5].

Применение не биodeградируемых наночастиц в медицинских целях предполагает необходимость изучения их межорганного распределения и накопления после введения в

организм и возможности последующей элиминации из организма. В случае наноалмазов для изучения этих аспектов может быть использован метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Данный метод обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять наночастицы, имеющие парамагнитные центры. Известно, что парамагнитные центры есть в наноалмазах взрывного синтеза [6, 7]. Преимущества метода ЭПР состоят в возможности детектировать наноалмазы без их дополнительной маркировки, например, флуоресцентными или радиоактивными метками. В модельных экспериментах *in vitro* показана возможность детектирования наноалмазов в биоматериалах методом ЭПР [8, 9]. В работе [8] методом ЭПР диагностировали влияние элементоорганических соединений бора и фосфора, содержащихся во взрывчатом веществе, на парамагнитные свойства детонационных наноалмазов. Показано, что допирование (внедрение) бора и фосфора в кристаллическую решетку ДНА приводит к сужению собственного синглета ДНА.

Методом ЭПР-спектроскопии исследовано распределение модифицированных наноалмазов (МНА) взрывного синтеза в органах и тканях мышей после внутривенного введения. Показано, что ДНА, введенные в хвостовую вену животных, через 2,5 ч аккумулируются преимущественно в легких и печени. В почках и сердце животных обнаруживается значительно меньшее (на 1 – 1,5 порядка) количество ДНА. Полученные результаты открывают перспективы для применения метода ЭПР в изучении распределения, накопления и элиминации наноалмазов взрывного синтеза при их внутривенном введении экспериментальным животным [10]. Установлено, что суспензии ДНА с концентрацией <0,1 г/л (меньше 100 мкг/мл) практически не влияют на жизнеспособность клеток нейтрофилов; что частица ДНА, взаимодействуя с живой иммунной клеткой (нейтрофилом человека), проникает внутрь клетки посредством фагоцитоза и трансмембранной диффузии. Алмазы не токсичны, не являются канцерогенами и не вызывают мутации генов, они не растворяются в биологических жидкостях. Биологическая активность ДНА еще недостаточно изучена.

Кристаллы ДНА обладают химически пассивным ядром классического алмаза почти круглой или овальной формы и достаточно химически активной поверхностной «бахромой» из не опасных для живого организма функциональных групп, придающих поверхности гидрофильные свойства. Кроме того, каждый кристалл ДНА имеет большое число неспаренных электронов и, по сути, представляет множественный радикал. Наноалмазы относятся к принципиально новым противоопухолевым препаратам. Их можно рассматривать как полифункциональные надмолекулярные структуры с полярными группами OH, NH₂, C(O)NH₂, обуславливающими их антиоксидантную активность и способность участвовать в свободнорадикальных процессах в живых клетках. Множество функциональных групп на поверхности частиц ДНА может обеспечивать как дополнительное генерирование, так и обезвреживание избыточных радикалов в метаболических процессах, стать основой их противоопухолевого действия. В то же время, в ряде работ получены доказательства физико-химической и биологической неэквивалентности промышленных марок ДНА компаний-производителей «PlasmaChem» (ФРГ), «Adamas nanotechnologies» (США), ЗАО «Алмазный центр» (РФ) [1, 3, 5, 11], что, возможно, связано с разным составом полярных химически активных групп, антиоксидантной активностью и разным количеством парамагнитных центров на поверхности частиц ДНА разных компаний-производителей ДНА.

Целью работы явилось изучение особенностей структуры поверхности ДНА методом ЭПР, а также исследование влияния ДНА на микровязкость мембран эритроцитов крысы методом спиновых зондов. Микровязкость мембран клеток является важным параметром мембран клеток, так как ферментативная активность мембранных ферментов, структура и функционирование ионных каналов в мембране, проницаемость мембран, биодоступность лекарственных веществ, скорость прохождения нервного импульса в нейронах напрямую зависят от микровязкости мембран клеток.

Материалы и методы исследований

В работе использован метод спиновых зондов, который давно успешно применяется в молекулярной биологии, фармакологии и медико-биологических исследованиях. Метод спиновых зондов и меток по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильного нитроксильного радикала (зонда), вводимого в биообъект, позволяет судить о микровязкости и полярности микроокружения зонда, конформационных изменениях в белках и мембранах, текучести липидов мембран и целостности мембран клеток, митохондриальной активности различных тканей, сродстве веществ и ЛВ к мембранам и белкам, топографии больших и сложных ферментов [12, 13]. В работе по спектрам ЭПР нитроксильных радикалов на основе пальмитиновой кислоты (что позволяет им внедриться в липофильный слой мембран эритроцитов) оценивали время корреляции броуновской вращательной диффузии зондов в мембранах клеток. Для изучения микровязкости мембран эритроцитов в присутствии растворителей и полимеров был выбран спиновый зонд 2 на основе пальмитиновой кислоты. Зонд 2 – нитроксильный радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмоний)-ТЕМПО – содержит в своём составе четвертичный аммониевый фрагмент, благодаря чему может рассматриваться как ионогенное ПАВ.

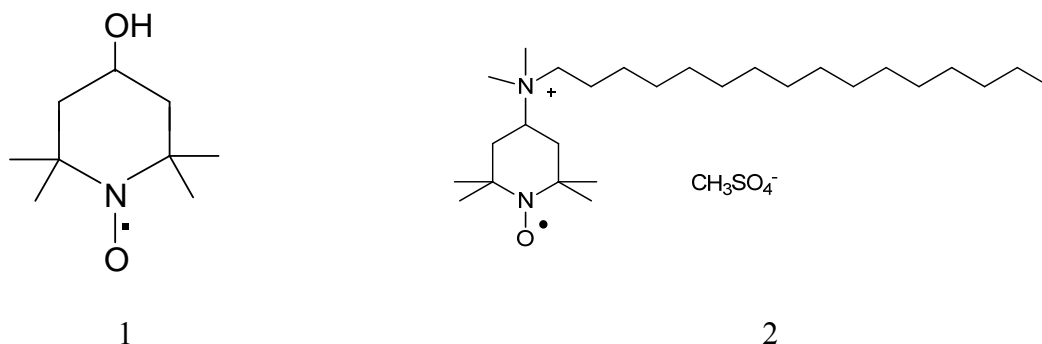


Рис. 1. Спиновые зонды 1 и 2.

Для изучения антиоксидантной активности водной взвеси ДНА использовали водорастворимый спиновый зонд 1 ТЕМПОЛ, который восстанавливается до гидроксиламина в присутствии в среде доноров электронов – сигнал ЭПР исчезает по экспоненте [14]. Зонд 2 синтезирован по схеме [15, 16]. Введение зонда 2 в водную взвесь эритроцитов осуществляли добавлением концентрированного раствора зонда в ДМСО таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО во взвеси эритроцитов была в пределах 0,5 – 1%. Регистрацию спектров ЭПР осуществляли на радиоспектрометре «ESR Spectrometer CMS8400». Оценка микровязкости мембран эритроцитов проводилась на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров нитроксильных радикалов – спинового зонда 2, находящегося в липидном бислое мембран эритроцитов [12, 13]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ) используются такие характеристики спектров: ширина центральной компоненты (ΔH_0), интенсивности компонентов спектра ЭПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) с магнитным квантовым числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$), изотропная константа расщепления ($A_{\text{изо}}$). Базовым уравнением для оценки вязкости любых сред является уравнение Стокса – Эйнштейна

$$\tau_c = 4\pi a^3 \cdot \eta / 3k_B T, \quad (1)$$

где τ_c – время корреляции спинового зонда (время, за которое спиновый зонд поворачивается на 1 радиан, 57°), η – вязкость среды, a – эффективный радиус спинового зонда, определяемый по спектрам ЭПР [12, 13];

$$1/\tau_{c (+1)} = 2 \cdot 10^8 / [(h_0/h_{+1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ с}^{-1}, \quad (2 \text{ а})$$

$$1/\tau_{c (-1)} = 3,6 \cdot 10^9 / [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ с}^{-1}, \quad (2 \text{ б})$$

$$\tau_{c (+1/-1)} = 6,65 \cdot 10^{-10} [(h_{+1}/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_{+1} \text{ с}^{-1}. \quad (2 \text{ в})$$

Для тонкой оценки структуры ДНА использовали параметр анизотропии спектров ЭПР зондов в липидах мембран ε . В работе [12] рассмотрено влияние анизотропии тензора вращательной диффузии нитроксильных радикалов (спиновых зондов) на параметры их спектров ЭПР. Теория спектров ЭПР связывает экспериментальный параметр анизотропии спектров (ε) с величиной анизотропии вращательной диффузии радикала. Анизотропия спектров ЭПР определяется из спектров ЭПР согласно следующей формуле:

$$\varepsilon = [(h_0 / h_{+1})^{1/2} - 1] / [(h_0 / h_{-1})^{1/2} - 1]$$

Эритроциты крыс для исследований получали из крови крыс самцов трехкратной отмывкой физиологическим раствором (0,89 % хлорид натрия), приготовленном на натрий-фосфатном буфере (5 ммоль/л), рН 7,2 – 7,4 путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин [15, 16]. Детонационные наноалмазы УДА-Ф9 со средним размером агрегатов около 20 нм произведены в г. Бийск.

Результаты и обсуждение

На рис. 2. представлен спектр ЭПР ДНА, который, как описано в литературе, является синглетом с шириной линии ΔH_0 около 10 Гс. Синглет изучаемого ДНА имеет ширину 7,61 Гс. Для разных образцов ДНА ширина синглета ДНА колеблется около 10 Гс [5, 8, 16, 18], причем допирование (внедрение) в кристаллическую решетку ДНА атомов других элементов, например бора или фосфора, приводит к сужению синглета ДНА [8]. Возможно, в изучаемых частицах ДНА такой эффект присутствует или свободные радикалы в парамагнитных центрах находятся на близких расстояниях и при обменном взаимодействии синглет сужается. Наличие синглета свидетельствует об обменном взаимодействии между свободными радикалами парамагнитных центров на поверхности ДНА или слипании частиц ДНА (концентрация ДНА в водной взвеси 1 мг/мл), когда расстояние между свободными радикалами очень близкое, в пределах 3 – 5 Å. Добавление во взвесь ДНА 0,1 мл парамагнитного уширителя феррицианида калия с конечной концентрацией феррицианида во взвеси ДНА равной 0,1 М/л приводило к небольшому уширению синглета с 7,6 Гс до 8,0 Гс, т.е. $\Delta H_0 = 0,4$ Гс. Это свидетельствует о небольшой доступности воды к свободным радикалам, возможно, парамагнитные центры ДНА находятся в прилегающих к поверхности наночастицы областях.

Для исключения фактора слипания частиц ДНА при концентрации 1 мг/мл водную взвесь ДНА разбавляли водой в 10 раз. Этот спектр ЭПР представлен на рис. 3 и демонстрирует наличие синглета небольшой интенсивности (разбавление). Сохраняются также другие низкопольные и высокопольные сопутствующие линии ЭПР, которые присутствовали в спектре исходной, неразбавленной водной взвеси ДНА. Однако ширина синглета ΔH_0 ДНА после разбавления составила 10,6 Гс, что ближе к литературным данным, т.е. фактор слипания в исходной взвеси ДНА все-таки присутствует. Возможно, при разбавлении исходной взвеси агрегаты ДНА разрушаются, сужение синглета вследствие обменного уширения пропадает и оставшиеся наночастицы демонстрируют немного уширенный синглет вследствие диполь-дипольного уширения свободных радикалов в парамагнитном центре. На рис. 4 представлен спектр ЭПР водной взвеси ДНА разбавленной водой еще в 2 раза (концентрация взвеси ДНА равна 50 мкг/мл).

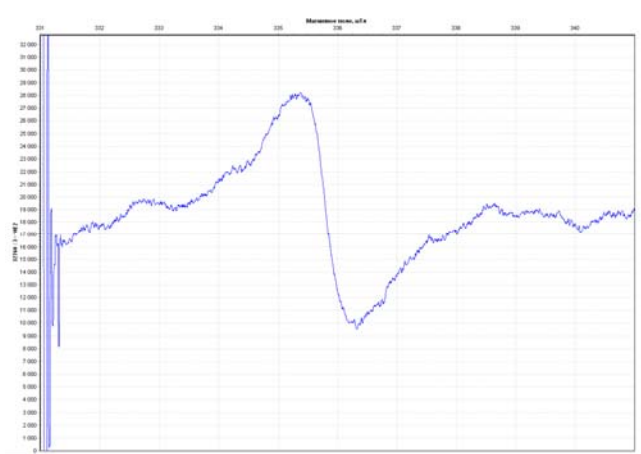


Рис. 2. Собственный спектр ЭПР водной взвеси изучаемых ДНА при концентрации частиц 1 мг/мл.

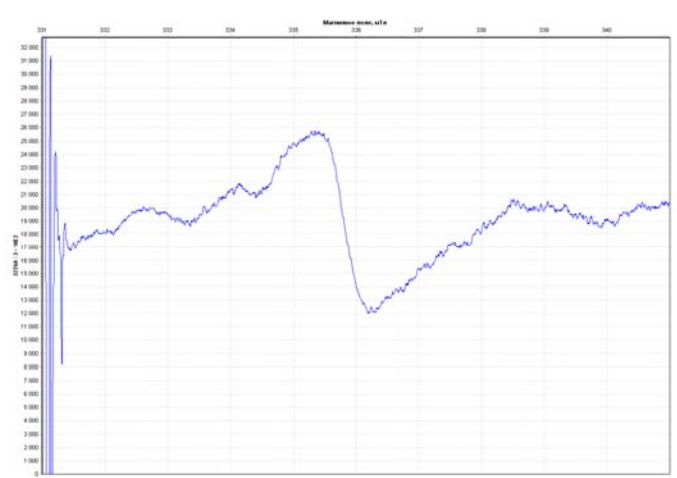


Рис. 3. Собственный спектр ЭПР водной взвеси ДНА (1 мг/мл) после добавления 0,1 мл парамагнитного уширителя феррицианида калия (1 м/л).

Анализ спектров ЭПР, представленных на рис. 5 и 6, показывает, что инкубация зонда ТЕМПОЛ с исходной взвесью ДНА в течение 1 ч приводит к уменьшению интенсивности синглета ДНА в 1,42 раза: интенсивность синглета снижается со 100% до 71,4 %. Это свидетельствует о значительной антиоксидантной активности изучаемого НДА и демонстрирует возможность метода ЭПР быстро количественно определять различие в антиоксидантной активности образцов ДНА различных фирм-производителей ДНА.

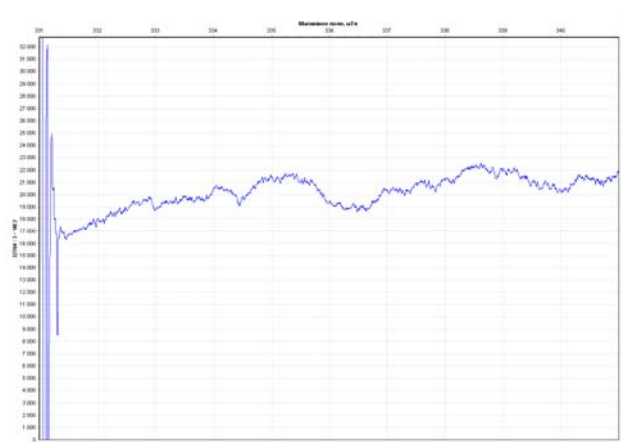


Рис. 4. Собственный спектр ЭПР водной взвеси ДНА, разбавленной в 10 раз (концентрация ДНА 100 мкг/мл).

Анализ данных, приведенных в таблице, показал, что в течение 1 ч заметно (на 34%) снижается параметр анизотропии спектров ЭПР зонда ТЕМПОЛ. Это свидетельствует о существенном изменении предпочтительной оси вращательной

диффузии зонда во взвеси ДНА, что предполагает взаимодействие зонда с поверхностью наночастиц ДНА.

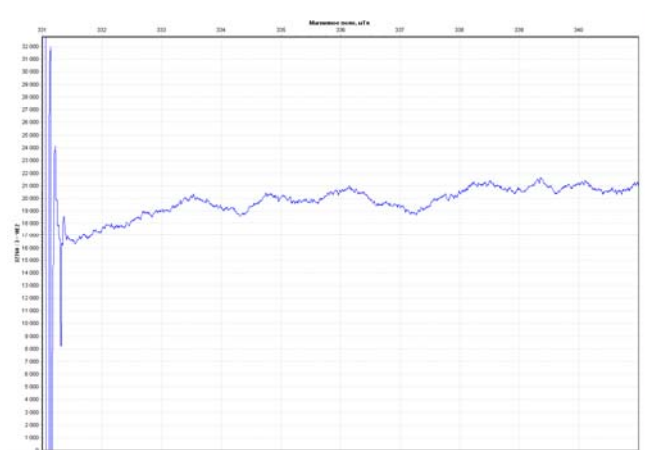


Рис. 5. Собственный спектр ЭПР водной взвеси ДНА с концентрацией частиц 50 мкг/мл.

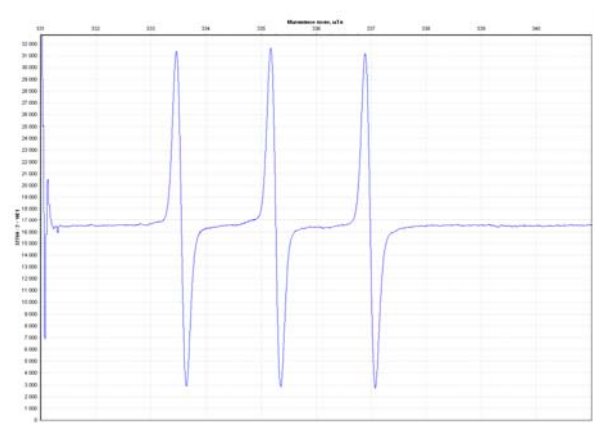


Рис. 6. Спектр ЭПР водорастворимого спинового зонда ТЕМПОЛ в исходной водной взвеси ДНА (1 мг/мл).

Таблица. Изменение параметров спектра ЭПР зонда ТЕМПОЛ в водной взвеси ДНА в течение 1 ч

Образец	$A_{\text{изо}}$ (Гс)	τ_{+1} , с 10^{10}	τ_{-1} , с 10^{10}	$\tau_{+/-1}$, с 10^{10}	ϵ	Форма спектра
Темпол	17,21	0,59	0,03	-0,01	1,08	Триплет
Темпол через 1 ч	17,19	0,44	0,03	0,02	0,71	Триплет

На рис. 7 и 8 представлены спектры ЭПР липофильного зонда 2 в мембранах эритроцитов в отсутствие и в присутствии ДНА. Время корреляции для исходного спектра ЭПР составило $\tau^{+1} \cdot 10^9 = 6,05 \pm 0,5$ с. Расчет параметров ЭПР этих спектров показал, что присутствие во взвеси эритроцитов 25 мкг/мл ДНА не влияет на время корреляции зонда в мембране в пределах ошибки эксперимента, а следовательно, и на микровязкость мембран эритроцитов. Это совпадает с результатами других исследователей о том, что ДНА в концентрации меньше 100 мкг/мл не влияют на выживаемость нейтрофилов человека [1]. Возможно эта концентрация ДНА не является цитотоксичной для эритроцитов.

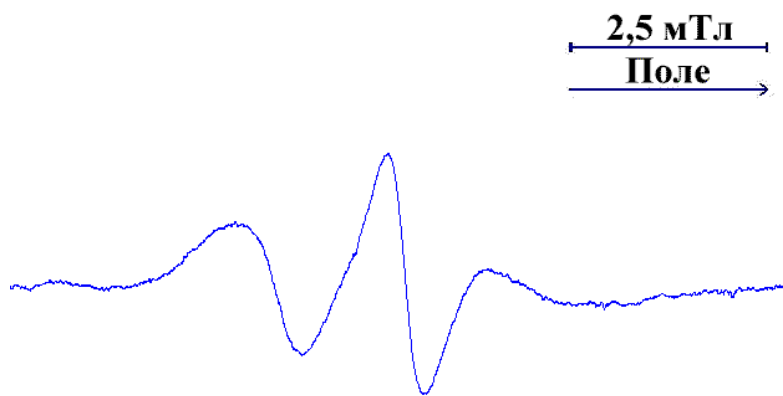


Рис. 7. Сектр ЭПР зонда 2 в мембране эритроцитов.

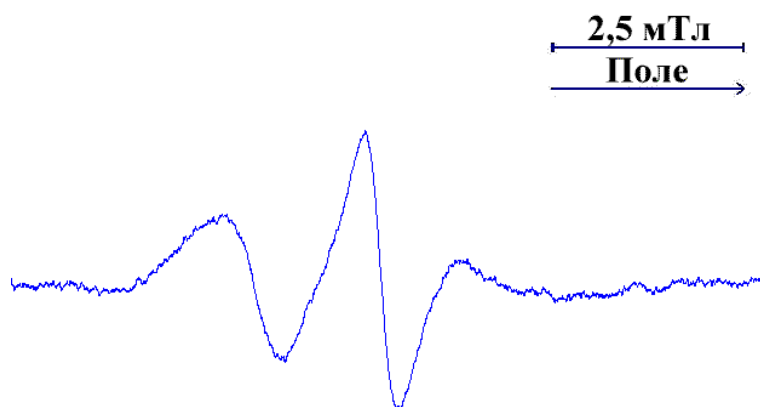


Рис. 8. Спектр ЭПР спинового зонда в присутствии НДА (25 мкг/мл).

Выводы

Методом ЭПР и спиновых зондов изучены некоторые особенности структуры НДА, антиоксидантные свойства и влияние наночастиц НДА на микровязкость мембран эритроцитов крысы. Показано, что при концентрации ДНА в водной взвеси равной 1 мг/мл происходит частичная агломерация частиц ДНА, которая исчезает при разбавлении взвеси. По спектрам ЭПР (восстановлению спинового зонда ТЕМПОЛ) установлена антиоксидантная активность изучаемых ДНА со временем, что позволяет использовать метод ЭПР для быстрого тестирования образцов ДНА разных фирм-производителей. Введение ДНА во взвесь эритроцитов в концентрации 25 мкг/мл не приводит к существенным изменениям в микровязкости мембран эритроцитов, что указывает на низкую цитотоксичность ДНА при этих концентрациях.

Литература

1. Яковлев Р.Ю., Соломатин А.С., Леонидов Н.Б., Кулакова И.И., Лисичкин Г.В. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ // Рос. хим. ж. – 2012. – Т. 56 № 3–4. – С. 114–125.

2. Badun G.A., Chernysheva M.G., Yakovlev R.Y., Leonidov N.B., Semenenko M.N., Lisichkin G.V. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method // Radiochim. Acta. – 2014. – V. 102 N 10. – P. 941–946.

3. Yakovlev R.Y., Lisichkin G.V., Leonidov N.B. Development and investigation of functionalized nanodiamonds for pharmaceutical and medical applications // Mediterranean – East-Europe Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed 2011. – Uzhgorod, 2011. – P. 169–170.

4. *Yakovlev R.Yu., Badun G.A., Chernysheva M.G., Leonidov N.B., Lisichkin G.V.* Tritium labeling nanodiamond and its applications in transmembrane diffusion and biodistribution studies // Int. Conf. Diamond and Carbon Materials, – Riva del Garda, 2013. – Poster 1.096.

5. *Долматов В.Ю.* Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза: свойства и применение // Успехи химии. – 2001. Т. 70. С. 687–708.

6. *Долматов В. Ю, Ngyuen B. T. T., Лапчук Н. М., Козлов А. С. Островский В. А.* Исследование допированных детонационных наноалмазов методом электронного парамагнитного резонанса // Материалы и структуры современной электроники : сб. науч. тр. VII Междунар. науч. конф., посвящ. 50-летию каф. физики полупроводников и наноэлектроники, Минск, 12–13 окт. 2016 г. // Минск : Изд. центр БГУ, – 2016. – С. 234–237.

7. *Инжесваткин Е.В., Барон А.В., Максимов Н.Г., Волкова М.Б., Пузырь А.П., Ронжин Н.О., Бондарь В.С.* Использование ЭПР-спектроскопии для выявления наноалмазов в биоматериалах и изучения их распределения в организме животных после внутривенного введения // Акт. вопр. биол. физ. и хим.– 2018. – Т.3, №1. – С. 183–188.

8. *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.

9. *Солматова 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 // Письма в ЖЭТФ. – 2010. Т 92: С. 106–109.

10. *Барон А.В., Максимов Н.Г., Инжесваткин Е.В., Волкова М.Б., Пузырь А.П., Бондарь В.С.* Применение метода ЭПР для определения наноалмазов в биологических материалах // Тезисы докладов XVIII Всероссийского симпозиума с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях» // Красноярск: Изд-во СФУ, – 2016. 13 с.

11. *Чиганова Г.А.* Исследование поверхностных свойств ультрадисперсных алмазов. // Коллоид, журн. 1994. Т. 56. № 2.– С. 266–268.

12. *Лихтенштейн Г.И.* Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – С. 12–24.

13. *Берлинер Л., Нордио П.Л., Дж. Фрид и др.* Метод спиновых меток. Теория и применения // Москва: Мир, 1979. – 639 с.

14. *Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Картель Н.Т., Нардид О.А., Окотруб А.В., Кирилюк И.А., Черкашина Я.О.* Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови // Поверхность. – 2014. Вып. 6. № 21. С. 292–304.

15. *Картель Н.Т., Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Нардид О.А., Окотруб А.В., Кирилюк И.А., Черкашина Я.О.* Оценка влияния углеродных нанотрубок на микровязкость мембран эритроцитов // Доповіди Нац. акад. наук України.– 2015. № 3. – С. 114–121.

16. *Shames A.I., Osipov V.Yu., Aleksenskiy A.E., Osawa E., Vul. A. Ya.* Locating inherent unpaired orbital spin in detonation nanodiamonds through the targeted surface decoration by paramagnetic problems // Diam. Relat. Mater. – 2011 V. 20, – 318 p.

17. *Осипов В.Ю., Шахов Ф.М., Ефимов Н.Н., Минин В.В., Кидалов С.В., Вуль А.Я.* Идентификация парамагнитных центров азота (P1) в алмазных кристаллитах, получаемых спеканием детонационных наноалмазов при высоком давлении и температуре // Физика твердого тела. – 2017, Т. 59, № 6.

18. Kartel N.T., Ivanov L.V., Nardyd O.A., Cherkashyna Ya.O., Okotrub A.V., Derymedved L.V. The evaluation of carbon nanotubes impact on mitochondrial activity of cells in different organs tissues by means of spin probes method // Modern Science- Moderni Veda.– Praha.– 2016. N 2. – P. 123–129.

References

1. Yakovlev R.Yu., Solomatina A.S., Leonidov N.B., Kulakova I.I., Lisichkin G.V. Detonation nanodiamond - a promising carrier for the creation of drug delivery systems. *Russ. Chem. J.* 2012. **56**(3–4): 114. [in Russian].
2. Badun G.A., Chernysheva M.G., Yakovlev R.Y., Leonidov N.B., Semenenko M.N., Lisichkin G.V. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method. *Radiochim. Acta.* 2014. **102**(10): 941.
3. Yakovlev R.Y., Lisichkin G.V., Leonidov N.B. Development and investigation of functionalized nanodiamonds for pharmaceutical and medical applications. In: *Mediterranean – East-Europe Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed 2011.* (Uzhgorod, 2011). P. 169.
4. Yakovlev R.Yu., Badun G.A., Chernysheva M.G., Leonidov N.B., Lisichkin G.V. Tritium labeling nanodiamond and its applications in transmembrane diffusion and biodistribution studies. In: *International Conference on Diamond and Carbon Materials.* (Riva del Garda, 2013).
5. Dolmatov V.Yu. Ultradispersed diamonds of detonation synthesis: properties and applications. *Uspekhi Khimii.* 2001. **70**: 687. [in Russian].
6. Dolmatov V.Yu., Nguyen B.T.T., Lapchuk N.M., Kozlov A.S. Ostrovsky V.A. Study of doped detonation nanodiamonds by electron paramagnetic resonance. Materials and structures of modern electronics: collection of articles. scientific tr. VII International scientific conf., dedicated. 50th anniversary of the Department. semiconductor physics and nanoelectronics, Minsk, 12–13 oct. 2016. *Minsk: Ed. Center of BSU.* 2016. P. 234. [in Russian].
7. Inzhevatin E.V., Baron A.V., Maksimov N.G., Volkova M.B., Puzyr A.P., Ronzhin N.O., Bondar V.S. Using EPR spectrometry to detect nanodiamonds in biomaterials and to study their distribution in animals after intravenous administration. *Aktual'nyye voprosy biologicheskoy fiziki i khimii.* 2018. **3**(1): 183. [in Russian].
8. 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. **192**: 261.
9. Solmatova A.A., Il'in I.V., Shakhov F.M., Kidalov S.V., Vul A.Ya., Yavkin B.V., Mamin G.V., Orlinsky S.B., Baranov P.G. Detection by electron paramagnetic resonance of a giant concentration of nitrogen-vacant defects in detonation nanodiamonds. *Lett. JETP.* 2010. **92**: 106. [in Russian].
10. Baron A.V., Maksimov N.G., Inzhevatin E.V., Volkova M.B., Puzyr A.P., Bondar V.S. Application of the EPR method for the determination of nanodiamonds in biological materials. *Abstracts of the XVIII All-Russian Symposium with international participation “Complex systems under extreme conditions”.* (Krasnoyarsk: Publishing House SFU, 2016). [in Russian].
11. Chiganova G.A. Investigation of the surface properties of ultrafine diamonds. *Colloid J.* 1994. **56**(2): 266. [in Russian].
12. Liechtenstein G.I. *The method of spin labels in molecular biology.* (Moscow: Nauka, 1974). [in Russian].
13. Berliner L., Nordio P.L., Fried J. *The method of spin labels. Theory and Applications.* (Moscow: Mir, 1979). [in Russian].

14. Ivanov L.V., Lyapunov A.N., Kartel N.T., Nardid O.A., Okotrub A.V., Kirilyuk I.A., Cherkashina Ya.O. Delivery of lipophilic spin probes with carbon nanotubes to erythrocytes and blood plasma. *Surface*. 2014. **6**(21): 292. [in Russian].
15. Kartel N.T., Ivanov L.V., Lyapunov A.N., Nardid O.A., Okotrub A.V., Kirilyuk I.A., Cherkashina Ya.O. Evaluation of the effect of carbon nanotubes on the microviscosity of erythrocyte membranes. *Dopovidi Nat. Acad. Sciences of Ukraine*. 2015. **3**: 114. [in Russian].
16. Shames A.I., Osipov V.Yu., Aleksenskiy A.E., Osawa E., Vul A.Ya. Locating inherent unpaired orbital spin in detonation nanodiamonds through the targeted surface decoration by paramagnetic problems. *Diamond. Relat. Mater.* 2011 **20**: 318.
17. Osipov V.Yu., Shakhov F.M., Efimov N.N., Minin V.V., Kidalov S.V., Vul A.Ya. Identification of paramagnetic centers of nitrogen (P1) in diamond crystallites obtained by sintering detonation nanodiamonds under high pressure and temperature. *Fizika Tverdogo Tela*. 2017: **59**(6). [in Russian].
18. Kartel N.T., Ivanov L.V., Nardid O.A., Cherkashina Ya.O., Okotrub A.V., Derymedved L.V. The evaluation of carbon nanotubes impact on mitochondrial activity of cells in different organs tissues by means of spin probes method. *Modern Science – Moderní věda*. 2016. **2**: 123.

ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРИ НАНОАЛМАЗІВ І ЇХ ВПЛИВУ НА МІКРОВ'ЯЗКІСТЬ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

Н.Т.Картель¹, Л.В.Іванов¹, А.Н.Ляпунов², О.А.Нардід³, О.В.Щербак⁴,
О.А.Гурова^{5,6}, А.В.Окотруб^{5,6}

¹Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова 17, Київ, 03164, Україна, e-mail: nikar@kartel.kiev.ua;

²Інститут монокристалів НАН України, пр. Леніна 60, Харків, 61001, Україна;

³Інститут кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська 23,
Харків, 61015, Україна, cryo@online.kharkov.ua;

⁴Харківська зооветеринарна академія, вул. Академічна 1, смт. Мала Данилівка,
Дергачівський район, Харківська обл., 62341, Україна, info@hdzva.edu.ua;

⁵Інститут неорганічної хімії ім. А.В. Миколаєва СВ РАН, Пр. Академіка
Лаврентьєва, 3, Новосибірськ 630090, Російська Федерація, niic@niic.nsc.ru;

⁶Новосибірський Державний університет, вул. Пирогова, 2, Новосибірськ,
Російська Федерація, 630090, rektor@nsu.ru

Методом ЕПР і спінових зондів вивчені деякі особливості структури ДНА, антиоксидантні властивості і вплив наночастинок ДНА на мікров'язкість мембран еритроцитів щурів. Показано, що при концентрації ДНА в водній суспензії, яка дорівнює 1 мг/мл відбувається часткова агрегація частинок ДНА, яка зникає при розведенні суспензії. За спектрами ЕПР (відновленню спінового зонда ТЕМПОЛ) встановлено зміну антиоксидантної активності досліджуваних ДНА з часом, що дозволяє використовувати метод ЕПР для швидкого тестування зразків ДНА різних фірм-виробників. Розрахунок параметрів спектрів ЕПР показав, що присутність у суспензії еритроцитів 25 мкг/мл ДНА не впливає на час кореляції зонда в мембрані в межах помилки експерименту, а, відповідно, і на мікров'язкість мембран еритроцитів. Введення ДНА в суспензію еритроцитів в концентрації 25 мкг/мл не призводить до суттєвих змін в мікров'язкості мембран еритроцитів, що вказує на низьку цитотоксичність ДНА при цих концентраціях.

Ключові слова: спіновий зонд, детонаційні наноалмази, електронний парамагнітний резонанс, парамагнітні центри, вільнорадикальні процеси, мікров'язкість мембран, біодоступність

STUDYING THE STRUCTURE OF NANODIAMONDS AND THEIR INFLUENCE ON THE MICROVISCOSITY OF RAT ERYTHROCYTE MEMBRANES BY THE METHOD OF SPIN PROBES

N.T.Kartel¹, L.V. Ivanov¹, A.N. Lyapunov², O.A.Nardid³, O.V. Scherbak⁴,
O.A.Gurova^{5,6}, A.V.Ototrub^{5,6}

¹*Chuyko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, e-mail: nikar@kartel.kiev.ua;*

²*Institute of Monocrystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, 60 Lenin Ave.,
Kharkov, 61001, Ukraine;*

³*Institute of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, ul.
Pereyaslavskaya 23, Str., Kharkiv, 61015, Ukraine, cryo@online.kharkov.ua;*

⁴*Kharkov Veterinary Academy, 1 Academic Str., smt. Malaya Danilovka, Dergachevsky district,
Kharkiv region, 62341, Ukraine, info@hdzva.edu.ua;*

⁵*Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, SB RAS, 3 Pr. Academician
Lavrentieva, Novosibirsk 630090, Russian Federation, niic@niic.nsc.ru;*

⁶*Novosibirsk State University, 2 Pirogov Str, Novosibirsk,
Russian Federation, 630090, rektor@nsu.ru*

Some features of the NDA structure, antioxidant properties, and the effect of NDA nanoparticles on the microviscosity of rat erythrocyte membranes were studied using the EPR method and spin probes. It is shown that when the concentration of DND in a water suspension equal to 1 mg/ml, partial agglomeration of DND particles occurs, which disappears when the suspension is diluted. The EPR spectra (recovery of the TEMPOL spin probe) revealed a change in the antioxidant activity of the studied DND with time, which allows the use of the EPR method for rapid testing of DND samples from different manufacturers. The calculation of the parameters of the EPR spectra showed that the presence of 25 µg/ml of DND in a suspension of red blood cells does not affect the correlation time of the probe in the membrane within the experimental error, and consequently, the microviscosity of the red blood cell membranes. The introduction of DND into a suspension of erythrocytes at a concentration of 25 µg/ml does not lead to significant changes in the microviscosity of erythrocyte membranes, which indicates a low cytotoxicity of DND at these concentrations.

Keywords: *spin probe, detonation nanodiamonds, electron paramagnetic resonance, paramagnetic centers, free radical processes, membrane microviscosity, bioavailability*