

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭПР-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НАНОАЛМАЗОВ В БИОМАТЕРИАЛАХ И ИЗУЧЕНИЯ ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Инжеваткин Е.В.^{1,2}, Барон А.В.^{1,3}, Максимов Н.Г.^{1,4}, Волкова М.Б.^{1,3}, Пузырь А.П.^{1,2}, Ронжин Н.О.¹, Бондарь В.С.¹

¹Институт биофизики Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук”

Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: inscience@mail.ru, bondvs@mail.ru

²Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук”

Академгородок, 50, г. Красноярск, 660036, РФ

³Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

⁴Институт химии и химической технологии Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук”

Академгородок, 50/24, г. Красноярск, 660036, РФ

Поступила в редакцию: 25.06.2018

Аннотация. В модельных экспериментах *in vitro* установлена применимость метода ЭПР-спектроскопии для выявления модифицированных нанодиамазов (МНА) взрывного синтеза в образцах биоматериалов (кровь и гомогенаты органов мышей). В содержащих МНА биопробах регистрируется характерный ЭПР сигнал ($g = 2,003$, $\Delta H \approx 10$ Гс), интенсивность которого линейно возрастает при концентрации наночастиц в диапазоне 1,6-200 мкг МНА на 1 мл образца. В экспериментах *in vivo* методом ЭПР установлено, что через 2.5 часа после внутривенной инъекции мышам МНА аккумулируются преимущественно в легких и печени животных – около 25 % и 20 %, соответственно, от дозы введенных наночастиц. В сердце и почках животных было обнаружено значительно меньшее (на 1-1,5 порядка) количество МНА. В крови, селезенке, головном мозге и мышцах бедра мышей наличие МНА не было выявлено в пределах чувствительности метода ЭПР. Через 10 суток после инъекции регистрируется перераспределение МНА в организме животных: количество наночастиц в легких уменьшается в 3,5 раза и увеличивается в печени практически в 3 раза, наблюдается накопление МНА в селезенке. В это время не наблюдалось изменений в содержании МНА в сердце и почках мышей. В целом, полученные данные открывают перспективы использования ЭПР-спектроскопии для изучения динамики межорганного распределения, накопления и элиминации МНА при их внутривенном введении в организм экспериментальных животных.

Ключевые слова: нанодиамазы, ЭПР-спектроскопия, биологические образцы, кровь, гомогенаты органов, динамика распределения.

Развитие нанотехнологии открывает значительные возможности для новых решений обширного спектра биомедицинских задач [1-11]. Прогнозируется, что применение наноматериалов разной физико-химической природы в биологии, медицине, экологии, фармакологии, токсикологии, и т.д. позволит расширить арсенал и повысить эффективность используемых в них методов, и будет способствовать их выходу на новый качественный уровень. В частности, одно из активно развивающихся направлений в этой области связано с изучением применимости наночастиц в создании систем избирательного (направленного) транспорта биологически активных веществ, включая лекарственные [12-14]. При этом следует сказать, что исследователи, изучающие применимость наноматериалов в биологических и медицинских приложениях, проявляют большой интерес к использованию для этих целей разных форм нанодиамазов (фуллерены, нанотрубки, графен) [6, 7, 9, 15-18]. Многообещающим материалом этой группы являются нанодиамазы, получаемые методом взрывного синтеза, который был впервые разработан российскими учеными [19]. Совокупность физико-химических свойств этих наночастиц (прежде всего, химически полиморфная, активная поверхность и возможности ее химической модификации, малая токсичность и высокая биосовместимость) позволяют прогнозировать их применимость в биотехнологических и биомедицинских целях [20-26]. Например, ученые многих стран изучают применимость нанодиамазов в качестве носителей для конструирования систем адресной доставки лекарственных препаратов [27-31]. Предполагается, что создание средств избирательного транспорта лекарств к очагам патологии позволит снизить дозы в водимых лечебных препаратов, повысит их эффективность и минимизирует риски возникновения побочных эффектов.

Использование наноматериалов в создании новых средств медицинского назначения (например, при конструировании систем адресной доставки лекарств на основе наночастиц) предполагает возможность их введения в организм пациента. Однако в этом случае возникает ряд вопросов, имеющих принципиальное значение и требующих всестороннего изучения. Одним из ключевых аспектов является четкое представление о

характере распределения в организме введенных наночастиц (носителя), их биодеструкции или элиминации из организма после выполнения адресной наносистемой терапевтической функции. Особенно это важно при использовании в качестве носителя создаваемой системы избирательной доставки наночастиц, которые не подвергаются биодеструкции. Поскольку детонационные наноалмазы относятся к таким нанообъектам, возникает необходимость в изучении их межорганного распределения, накопления и путей элиминации после введения в организм. Важность этих исследований определяется возможностью возникновения нежелательных последствий при накоплении наночастиц в органах и тканях. При проведении таких исследований могут применяться разные способы маркировки наноалмазов, например, флуоресцентными или радиоактивными метками посредством ковалентной иммобилизации на наночастицы предварительно маркированных этими метками органических молекул пептидной и не пептидной природы [32-34]. В то же время, детекция непосредственно наноалмазных частиц представляется наиболее корректной. Это позволяет получать более объективную информацию о межорганном распределении наноалмазов и избежать возможных ошибок при трактовке результатов их детекции, поскольку существует вероятность десорбции иммобилизованной метки с поверхности наночастиц в условиях биологической среды организма. Для детекции наноалмазов может быть использован метод ЭПР-спектроскопии, который позволяет выявлять наночастицы, имеющие парамагнитные центры. Известно, что наноалмазы взрывного синтеза содержат парамагнитные центры [35, 36].

В настоящей работе в экспериментах *in vitro* и *in vivo* мы оценивали применимость метода ЭПР-спектроскопии для выявления наноалмазов в биоматериалах и исследовали этим методом динамику распределения внутривенно введенных наночастиц в организме животных.

Исследования были выполнены с использованием модифицированных наноалмазов (МНА) со средним размером кластеров наночастиц в гидрозолях – $d_{50} = 70.6$ нм (Zetasizer Nano ZS, «Malvern Instruments Ltd.», UK), которые были получены из взрывных наноалмазов российского производства (ООО «Реал-Дзержинск») разработанным ранее способом [37, 38]. МНА обладают высокой коллоидной стабильностью в дисперсионных средах (вода, органические растворители, масла) и применимы для медико-биологических исследований [37, 39]. Для экспериментов исходный гидрозоль с концентрацией МНА 1 мг/мл получали добавлением деионизованной воды (Milli-Q system, «Millipore», US) к навеске порошка наночастиц. После этого из исходного гидрозоля последовательными разведениями деионизованной водой готовили гидрозоли МНА с концентрацией наночастиц 200, 40 и 8 мкг/мл.

В экспериментах использовали мышей ICR (самцы, масса 26-28 грамм), при работе с животными соблюдали принципы эвтаназии. При исследованиях *in vitro* для получения биообразцов мышей усыпляли эфирным наркозом и брали кровь из подключичной артерии. После этого животных умерщвляли цервикальной дислокацией и извлекали органы – для экспериментов брали печень, селезенку, почки, сердце, головной мозг, мышцы бедра и легкие. Извлеченные органы помещали на лед, удаляли примеси соединительной и жировой тканей и разрушали в дистиллированной воде с помощью ручного гомогенизатора (система стекло-стекло). В полученные образцы крови и гомогенатов добавляли гидрозоли МНА с разной концентрацией наночастиц в соотношении 1:4 (объем гидрозоля: объем образца) – финальная концентрация МНА в биоматериалах составляла 200, 40, 8 и 1,6 мкг/мл, соответственно. В контрольные образцы крови и гомогенатов вместо суспензии МНА добавляли дистиллированную воду. Все приготовленные биопробы перемешивали, помещали в пластиковые контейнеры и замораживали в жидком азоте. Замороженные образцы извлекали из контейнеров и при температуре жидкого азота помещали в специальный держатель, который устанавливали в резонатор ЭПР спектрометра Elexsys E580 («Bruker Corp.», US). Регистрацию ЭПР спектров проводили при температуре 85-90 К. В экспериментах *in vivo* гидрозоль МНА вводили в хвостовую вену мышей в дозе 40 мг наночастиц на 1 кг веса. Через 2,5 часа и 10 суток после инъекции животных использовали для исследований. Получение и подготовку биообразцов, а также их анализ методом ЭПР-спектроскопии проводил аналогичным образом, как и в исследованиях *in vitro*.

На начальном этапе исследований было показано (рис. 1А), что в ЭПР спектрах образцов замороженных гидрозолей МНА наблюдается характерный сигнал ($g = 2,003$, $\Delta H \approx 10$ Гс). Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований, в которых было показано, что в образцах МНА с разными размерами кластеров детектируется симметричный ЭПР сигнал при $g = 2,003$, связанный с наличием в наночастицах парамагнитных центров [35]. Было установлено, что величина ЭПР сигнала, регистрируемого в гидрозолях МНА, практически линейно зависит от концентрации наночастиц в диапазоне 1,6-200 мкг/мл (рис. 1Б). Полученные результаты явились основанием для оценки применимости метода ЭПР-спектроскопии для выявления и количественной оценки МНА в биоматериалах.

В предварительных экспериментах было установлено, что важным условием эффективного применения метода ЭПР для детекции МНА в образцах биоматериалов (кровь и гомогенаты органов) является их глубокое замораживание при низких температурах и увеличение объема образца.

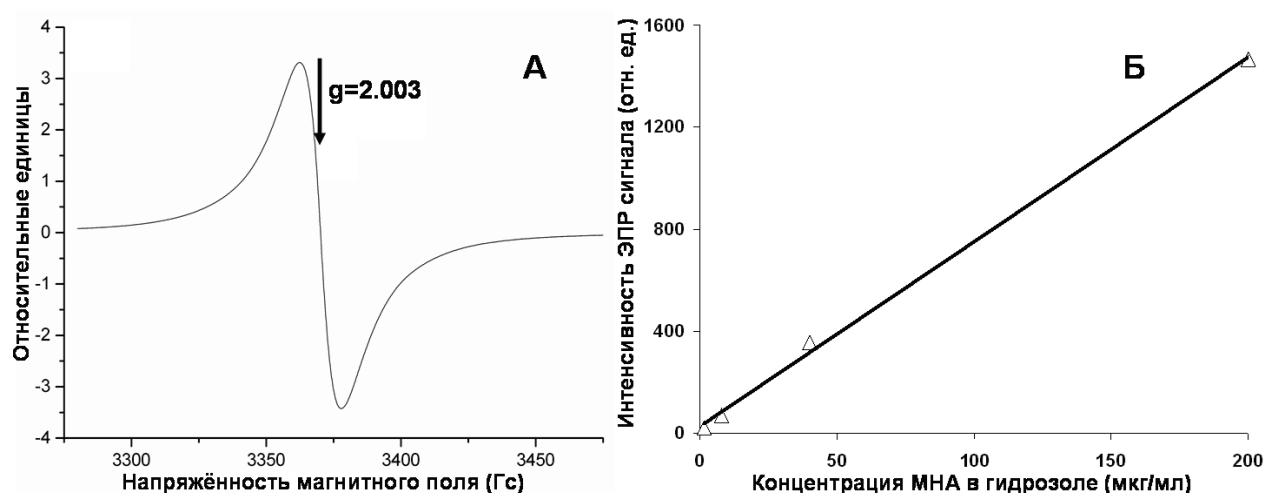


Рисунок 1. Типичный ЭПР сигнал, регистрируемый в образцах замороженных гидрозолей МНА (А), интенсивность ЭПР сигнала в зависимости от концентрации МНА в гидрозоле (Б)

Благодаря этим исследованиям, были разработаны оригинальные контейнеры, обеспечивающие замораживание образцов в жидком азоте, и специальный держатель, позволяющий переносить замороженные образцы из контейнеров при температуре жидкого азота. В свою очередь, применение созданного держателя позволило использовать безампульный способ фиксации образца в резонаторе ЭПР спектрометра и увеличить объем изучаемых проб биоматериалов.

В исследованиях *in vitro* было установлено, что в замороженных образцах всех изучаемых биоматериалов, содержащих МНА (кровь и гомогенаты органов животных), также регистрируется симметричный ЭПР сигнал ($g = 2,003$, $\Delta H \approx 10$ Гс). При этом было показано, что интенсивность детектируемых в образцах ЭПР сигналов прямо пропорционально зависит от концентрации МНА. В качестве примера приведены ЭПР сигналы, регистрируемые в образцах крови с разной концентрацией МНА (рис. 2А, Б). Следует сказать, что ЭПР исследования не содержащих МНА контрольных образцов всех биоматериалов выявили в них наличие собственных парамагнитных центров (радикалы, гем-содержащие белки и др.), сигналы от которых накладываются на сигналы от МНА. Однако было установлено, что при использованных в экспериментах объемах биообразцов величины ЭПР сигналов, регистрируемых от их собственных парамагнитных центров, как правило, невелики (рис. 2В). Тем не менее, для большей корректности тестирования мы вычитали из ЭПР сигнала опытного образца ЭПР сигнал контрольного образца – это позволило определять наночастицы в биоматериалах с большей точностью. Как и при исследовании гидрозолей МНА (см. выше), в экспериментах *in vitro* было установлено, что в содержащих МНА биоматериалах интенсивность регистрируемых ЭПР сигналов линейно возрастает при увеличении концентрации МНА от 1,6 до 40 мкг и более (до 200 мкг) на 1 мл образца (рис. 3). Полученные зависимости могут быть использованы в качестве калибровочных кривых для количественной оценки наноалмазов в биологических материалах с помощью ЭПР анализа. В целом, результаты проведенных экспериментов демонстрируют перспективность использования метода ЭПР-спектрометрии в исследованиях *in vivo* для выявления детонационных наноалмазов в органах и тканях экспериментальных животных после внутривенного введения наночастиц.

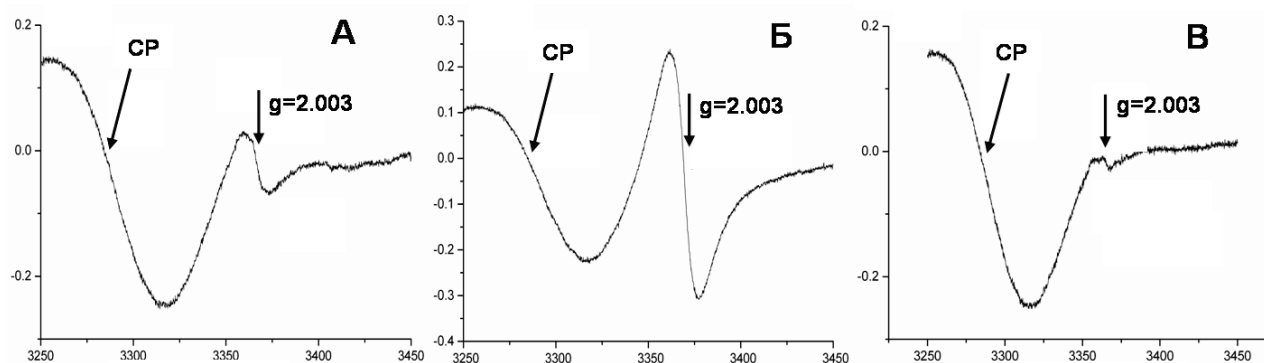


Рисунок 2. ЭПР спектры образцов крови мышей: А и Б – опытные образцы с концентрацией МНА 10 и 80 мкг/мл, соответственно; В – контрольный образец (без МНА): обозначения осей на графиках такие же, как на рисунке 1А; СР – часть спектра церулоплазмينا

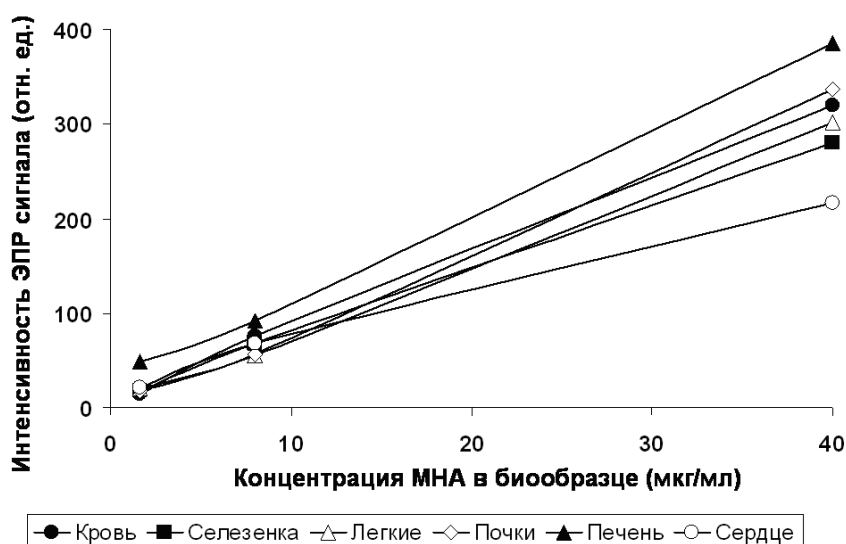


Рисунок 3. Интенсивность ЭПР сигналов в зависимости от концентрации МНА в образцах биоматериалов

В экспериментах *in vivo* методом ЭПР-спектрометрии нами было установлено, что через 2,5 часа после внутривенной инъекции МНА аккумулируются преимущественно в легких и печени животных. Как показали расчеты с использованием полученных в экспериментах *in vitro* калибровочных зависимостей величины ЭПР сигнала от концентрации МНА в биообразцах (рис. 3), в тканях легких и печени через этот период времени аккумулируется около 25 % и 20 % МНА, соответственно, от дозы введенных наночастиц. При этом расчеты удельного содержания наночастиц на единицу массы органа (рис. 4), проведенные на основании данных ЭПР анализа образцов биоматериалов, свидетельствуют о гораздо большей (практически на порядок) эффективности накопления МНА в легочной ткани, по сравнению с тканью печени. На этом сроке исследований в сердце и почках животных методом ЭПР было зарегистрировано значительно меньшее (на 1-1,5 порядка) количество МНА, по сравнению с легкими и печенью. Через 2,5 часа после инъекции в образцах крови, селезенки, головного мозга и мышц бедра наличие МНА не было выявлено в пределах чувствительности использованного метода.

Как показали дальнейшие исследования *in vivo*, метод ЭПР-спектрометрии позволил зарегистрировать перераспределение МНА в организме животных через 10 суток после инъекции наночастиц. Из данных по удельному содержанию МНА в органах мышей видно (рис. 4), что этот показатель в легких снижается более чем в 3 раза, увеличивается в печени более чем в 2 раза, отмечается аккумуляция МНА в селезенке. При этом не было выявлено значимых изменений общего содержания МНА в сердце и почках мышей, по сравнению с этим показателем для данных органов через 2,5 часа после инъекции. Следует сказать, что на данном сроке исследований МНА вновь не были зарегистрированы методом ЭПР в образцах крови, головного мозга и мышц бедра животных.

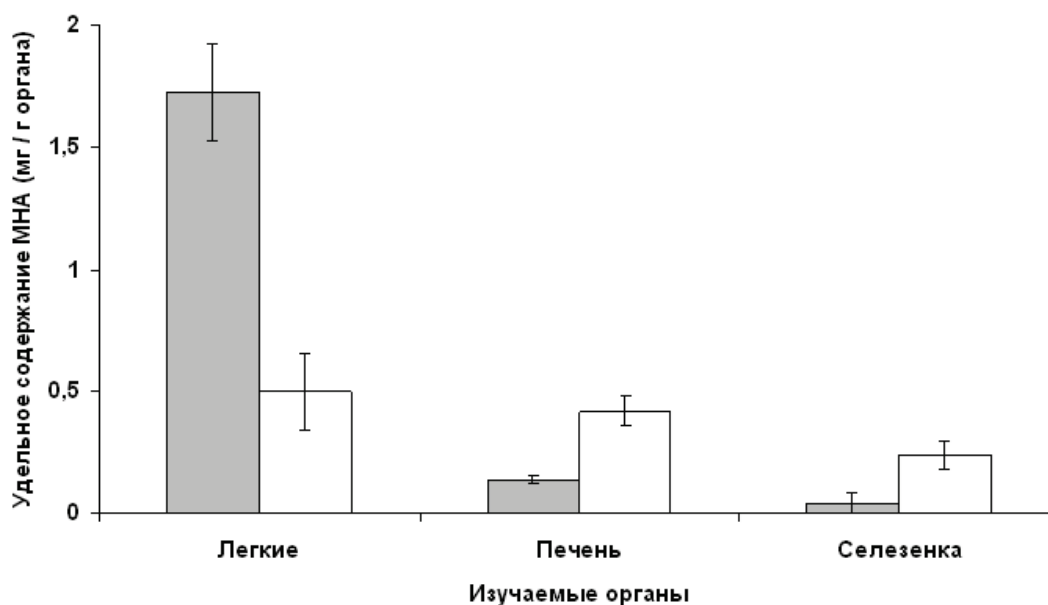


Рисунок 4. Распределение МНА в организме мышей через 2,5 часа (темные столбцы) и 10 суток (светлые столбцы) после внутривенной инъекции — приведено удельное содержание наночастиц в органах животных: данные представлены в виде $M \pm m$, $n = 4$ для каждого определения

Таким образом, результаты проведенных исследований *in vitro* и *in vivo* демонстрируют применимость ЭПР-спектрометрии для выявления наноалмазов взрывного синтеза в биоматериалах и открывают перспективы использования данного метода для изучения динамики межорганный распределения, накопления и элиминации наноалмазов при их внутривенном введении в организм экспериментальных животных.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-00999).

Список литературы / Referebces:

1. Vo-Dinh Tuan *Nanotechnology in Biology and Medicine: methods, devices, and applications*. Taylor & Francis Group, LLC: New York, 2006, 762 p.
2. Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Ind. J. Med. Res.*, 2009, vol. 130, pp. 689-701.
3. Tran P.A., Zhang L., Webster T.J. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, vol. 61, pp. 1097-1114.
4. Thanh N.T.K., Green L.A.W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 2010, vol. 5, pp. 213-230.
5. Zamborini F.P., Bao L., Dasari R. Nanoparticles in measurement science. *Anal. Chem.*, 2012, vol. 84, pp. 541-576.
6. Monaco A.M., Giugliano M. Carbon-based smart nanomaterials in biomedicine and neuroengineering. *Beilstein J. Nanotech.*, 2014, vol. 5, pp. 1849-1863.
7. *Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications*. Springer, ed. M. Zhang, R.R. Naik, L. Dai, 2015, 587 p.
8. Yin M., Zhao L., Wei Q., Li H. Rapid colorimetric detection of melamine by H₂O₂-Au nanoparticles. *RSC Adv.*, 2015, vol. 5, pp. 32897-32901.
9. Kumar A. Fullerenes for biomedical applications. *J. Environ. Appl. Biores.*, 2015, vol. 3, pp. 175-191.
10. Wang Y., Hu S. Applications of carbon nanotubes and graphene for electrochemical sensing of environmental pollutants. *J. Nanosci. Nanotech.*, 2016, vol. 16, pp. 7852-7872.
11. 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 chemo-/photothermal therapy. *Chem. Sci.*, 2016, vol. 7, pp. 6695-6700.
12. 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, vol. 63, pp. 1247-1256.
13. Plank C., Zelphati O., Mykhalik O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, vol. 63, pp. 1300-1331.
14. Morachis J.M., Mahmoud E.A., Almutairi A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacol. Rev.*, 2012, vol. 64, pp. 505-519.
15. Lamanna G., Battigelli A., Menard-Moyon C., Bianco A. Multifunctionalized carbon nanotubes as advanced multimodal nanomaterials for biomedical applications. *Nanotech. Rev.*, 2012, vol. 1, pp. 17-29.
16. Mendes R.G., Bachmatiuk A., Buchner B. Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms. *J. Mater. Chem. B.*, 2013, vol. 1, pp. 401-428.
17. Kozak O., Sudolska M., Pramanik G., Cigler P., Otyepka M., Zboril R. Photoluminescent carbon nanostructures. *Chem. Mater.*, 2016, vol. 28, pp. 4085-4128.
18. Maas M. Carbon nanomaterials as antibacterial colloids. *Materials*, 2016, vol. 9, pp. 617-636.
19. Danilenko V.V. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. *Phys. Solid State*, 2004, vol. 46, pp. 595-599.
20. Krueger A. New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials. *Chem. Eur. J.*, 2008, vol. 14, pp. 1382-1390.
21. Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A. Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, 2009, vol. 34, pp. 18-74.
22. 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, vol. 40, pp. 84-101.
23. Sung J.C., Lin J. *Diamond Nanotechnology: syntheses and applications*. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.: Singapore, 2010, 258 p.
24. Say J.M., van Vreden C., Reilly D.J., Brown L.J., Rabeau J.R., King N.J.C. Luminescent nanodiamonds for biomedical applications. *Biophys. Rev.*, 2011, vol. 3, pp. 171-184.
25. Mochalin V.N., Shenderova O., Ho D., Gogotsi Y. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat. Nanotech.*, 2011, vol. 7, pp. 11-23.
26. 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, vol. 83, pp. 851-883.
27. 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, vol. 5, pp. 631-636.
28. El-Say Kh.M. Nanodiamond as a drug delivery system: applications and prospective. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2011, vol. 1, pp. 29-39.

29. 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, vol. 2, pp. 302-312.
30. 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, vol. 2, pp. 335-342.
31. Kaur P., Badea I. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging. *Int. J. Nanomed.*, 2013, vol. 8, pp. 203-220.
32. Chang I.P., Hwang K.C., Chiang C.S. Preparation of fluorescent magnetic nanodiamonds and cellular imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, vol. 130, pp. 15476-15481.
33. Salaam A.D., Hwang P., McIntosh R., Green H.N., Jun H.-W., Dean D. Nanodiamond-DGEA peptide conjugates for enhanced delivery of doxorubicin to prostate cancer. *Beilstein J. Nanotech.*, 2014, vol. 5, pp. 937-945.
34. Purtov K., Petunin A., Inzhevatkina E., Burov A., Ronzhin N., Puzyr A., Bondar V. Biodistribution of different sized nanodiamonds in mice. *J. Nanosci. Nanotech.*, 2015, vol. 15, pp. 1070-1075.
35. 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, vol. 192, pp. 261-270.
36. Solmatova A.A., Il'in I.V., Shakhov F.M., Kidalov S.V., Vul' A.Ya., Yavkin B.V., Mamin G.V., Orlinskii S.B., Baranov P.G. Electron paramagnetic resonance detection of the giant concentration of nitrogen vacancy defects in sintered detonation nanodiamonds. *JETP Lett.*, 2010, vol. 92, pp. 102-106.
37. Bondar V.S., Puzyr A.P. Nanodiamonds for biological investigations. *Phys. Solid State*, 2004, vol. 46, pp. 716-719.
38. Puzyr A.P., Bondar V.S. *Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability*. RU Patent No. 2252192, 2005, bull. no. 14.
39. 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.*, 2007, vol. 16, pp. 2124-2128.

BIOMATERIALS AND TO STUDY THEIR DISTRIBUTION IN THE BODY OF ANIMALS AFTER INTRAVENOUS INJECTION

Inzhevatkina E.V.^{1,2}, Baron A.V.^{1,3}, Maksimov N.G.^{1,4}, Volkova M.B.^{1,3}, Puzyr A.P.^{1,2}, Ronzhin N.O.¹, Bondar V.S.¹

¹Institute of Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: inscience@mail.ru, bondvs@mail.ru

²International Scientific Center for Studies of Extreme States of Organism, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³Siberian Federal University

Svobodny Av., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

⁴Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

Akademgorodok, 50/24, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Abstract. In the model experiments *in vitro*, the applicability of EPR spectrometry for the detection of the modified detonation nanodiamonds (MNDs) in biomaterial samples (blood and homogenates of mouse organs) was established. The intensity of a characteristic EPR signal ($g = 2.003$, $\Delta H \approx 10$ G) registered in the samples increases linearly at MNDs concentrations in the range of 1.6-200 $\mu\text{g/ml}$. It was established in experiments *in vivo* that 2.5 hours after an intravenous injection to mice MNDs were mainly accumulated in the lungs and liver of animals – about 25 % and 20 % of the injected dose, respectively. A much smaller amount of MNDs (by 1-1.5 orders of magnitude) was found in the heart and kidneys. The presence of MNDs in the blood, spleen, brain and hip muscles was not detected within the sensitivity of the EPR method. Ten days after injection, the redistribution of MNDs was recorded: the amount of nanoparticles in the lungs decreases 3.5 fold and increases practically 3 fold in the liver. There was also registered the accumulation of MNDs in the spleen. At the same time, no change in the content of MNDs in the heart and kidneys was observed. In general, the obtained results open up the prospects for using EPR spectrometry to study the dynamics of inter-organs distribution, accumulation and elimination of MNDs after intravenous injection to the body of experimental animals.

Key words: nanodiamonds, EPR spectrometry, biological samples, blood, organs homogenates, distribution dynamics.