

УДК 612.398.11+ 679.871

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИТА НАНОАЛМАЗ-ЛИЗОЦИМ-МИРАМИСТИН И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОТЕЗАХ СЕРДЕЧНОГО КЛАПАНА

© 2024 г. М. Г. Чернышева^{1, *}, Г. А. Бадун¹, А. Г. Попов¹, И. С. Чашин^{2,3}, Н. М. Анучина², А. В. Панченко⁴

¹МГУ имени М. В. Ломоносова, Химический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 10, Москва, 119991 Россия

²ФГБУ НМИЦ ССХ им. А. Н. Бакулева Минздрава России, Рублевское ш., д. 135, Москва, 121552 Россия

³ИНЭОС РАН, ул. Вавилова, д. 28, стр. 1, Москва, 119334 Россия

⁴ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова” Минздрава России, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, Санкт-Петербург, 197758 Россия

*e-mail: chernyshevamg@my.msu.ru

Поступила в редакцию 22.09.2023 г.

После доработки 21.10.2023 г.

Принята к публикации 21.10.2023 г.

Создание биосовместимых покрытий для ксеногенных материалов, используемых для изготовления протезов сердечных клапанов, является актуальной и, к сожалению, до сих пор не решенной задачей. Необходимо сделать биоматериал, который будет соответствовать по механическим характеристикам клапану человека, обладать антимикробными свойствами, что критически важно в первые дни после операции. С этой целью можно использовать биосовместимые покрытия, и оказалось, что для их создания подходят детонационные наноалмазы. Функционально развитая поверхность наноалмазов позволяет адсорбировать на них антибиотики, они нетоксичны и не вызывают дополнительного кальциноза. В рамках данной работы предложено получение композиционного покрытия, состоящего из наноалмазов, лизоцима и мирамистина, как антимикробных агентов широкого спектра действия. Использование меченных тритием наноалмазов позволило исследовать распределение комплексов наноалмаз–лизоцим при внутривенном введении мышам, которое показало, что большая часть материала остается в месте инъекции. Показано, что композит наноалмаз–лизоцим–мирамистин проявляет сильную антимикробную активность, в то время как комплекс наноалмаз–мирамистин не проявляет токсичности по отношению к золотистому стафилококку. Таким образом, композит наноалмаз–лизоцим–мирамистин может быть использован для создания покрытий материала протеза сердечного клапана.

Ключевые слова: наноалмазы, лизоцим, мирамистин, адсорбция.

DOI: 10.31857/S0023291224010128

ВВЕДЕНИЕ

Ксеногенные биологические протезы клапанов сердца близки по гемодинамическим свойствам с клапаном человека, а также, в отличие от механических протезов, не требуют применения длительной антикоагулянтной терапии. Поэтому они широко применяются в хирургии [1–4]. Для изготовления таких протезов используют перикард крупного скота (бычий, лошадиный или свиной), который представляет собой богатую коллагеном соединительную ткань [5]. Поэтому в качестве одного из объектов данного исследования была использована коллагеновая матрица бычьего перикарда.

Для улучшения механических свойств материала могут быть использованы наноалмазосодержащие покрытия [6]. Показано, что наноалмазы не ухудшают состояние крови [7, 8]. Функционально развитая поверхность наноалмазов детонационного синтеза позволяет наносить на их поверхность различные лекарственные средства [9–13], в том числе антибиотики, что критически важно в первое время после операции по пересадке сердечного клапана [10, 14–16]. Показана антимикробная активность карбоксилированных наноалмазов в водной суспензии в отношении *Escherichia coli* [17], которая может быть усилена использованием антибиотиков. Сильным антимикробным средством является бензилдиметил[3-(

миристоиламино)пропил]аммонийхлорид, известный под коммерческим названием Мирамистин® (структурная формула приведена на рис. 1) [18, 19]. Однако при адсорбции на наноалмазах антисептические свойства мирамистина теряются [20]. Для сохранения антимикробных свойств мирамистина в составе комплекса с наноалмазами предложено провести предварительную модификацию поверхности наноалмазов биополимерами, чтобы изменить центры взаимодействия мирамистина с поверхностью при адсорбции. Одним из возможных биополимеров может быть белок лизоцим, который обладает собственной антимикробной активностью, а также способен образовывать комплексы с мирамистином. Показано, что образование композита лизоцим–мирамистин приводит к усилению бактериолитической активности лизоцима [21].

В данной работе были получены и охарактеризованы комплексы наноалмаз–лизоцим–мирамистин. С помощью меченного тритием мирамистина исследована его адсорбция на композитах наноалмаз–лизоцим. Из комплексов наноалмаз–лизоцим–мирамистин были получены покрытия коллагеновой матрицы бычьего перикарда и исследована антимикробная активность полученных покрытий по отношению к основному возбудителю заболеваний в постоперационный период – золотистому стафилококку (*Staphylococcus aureus*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали наноалмазы детонационного синтеза, произведенные компанией PlasmaChem (Германия) и поставляемые в форме порошка марка PL-D-G01 (DND), а также наноалмазы, поставляемые в форме водной суспензии 10 масс.% (SDND). При проведении адсорбционных экспериментов суспензию разбавляли до концентрации 5 мг/мл, а из порошка готовили суспензию (5 мг/мл) диспергированием порошка в воде с помощью ультразвуковой ванны Град.

Наноалмазы были охарактеризованы с помощью ИК-спектromетрии в диапазоне 4000–1100 см⁻¹, удельную поверхность определяли с помощью анализа изотерм адсорбции/десорбции азота. Для этих экспериментов суспензию наноалмазов высушивали.

Мирамистин® (Инфамед, Россия) и лизоцим куриного яйца (MP Biomedicals, США) использовали без проведения дополнительной очистки.

Коллагеновые матрицы перикарда биопротезного клапана сердца, стабилизированные 0.625% раствором глутарового альдегида и обработанные 1% раствором додецилсульфата натрия [22] в виде пластин, были предоставлены ЦССХ им. А. Н. Бакулева.

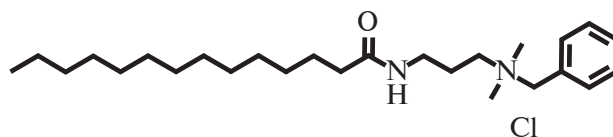


Рис. 1. Структурная формула мирамистина.

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

Меченные тритием наноалмазы и мирамистин получали с помощью метода термической активации трития [23, 24].

Определение адсорбции мирамистина на поверхности наноалмазов. К водной суспензии наноалмазов, содержащей 1 мг твердой фазы, добавляли раствор меченного тритием мирамистина с концентрацией от 0.02 до 2 мМ, удельная радиоактивность мирамистина менялась от 1.4 до 0.014 ТБк/моль. Суспензии инкубировали при 25°C в течение 2 суток, затем суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 12100×g, отбирали раствор над осадком и измеряли его радиоактивность с помощью метода жидкостной сцинтилляционной спектрометрии. Рассчитывали значения равновесной концентрации (C) и адсорбции (Г) по уравнениям (1) и (2) соответственно.

$$C = \frac{I}{\varepsilon \times V_1 \times a_{\text{уд}}}, \quad (1)$$

$$\Gamma = \frac{(C_0 - C) \times V}{m}, \quad (2)$$

где I – скорость счета, ε – эффективность регистрации β -излучения трития, V_1 – объем аликвоты раствора над осадком наноалмазов, $a_{\text{уд}}$ – удельная радиоактивность мирамистина, C_0 – начальная концентрация мирамистина, V – объем суспензии, m – масса наноалмазов.

Для определения количества мирамистина (Γ_1), связанного с наноалмазами, осадок декантировали, промывали водой, добавляли сцинтилляционную жидкость и проводили измерение радиоактивности.

$$\Gamma_1 = \frac{I_1}{\varepsilon \times a_{\text{уд}} \times m}, \quad (3)$$

где I_1 – регистрируемая скорость счета, величины ε , $a_{\text{уд}}$ и m – описаны в уравнениях (1) и (2).

При исследовании адсорбции мирамистина на модифицированных лизоцимом наноалмазах к суспензии наноалмазов с концентрацией 1 мг/мл добавляли лизоцим до конечной концентрации 4.7 мг/мл. Суспензии инкубировали при

25°C в течение 48 ч, затем центрифугировали при 12100×g, осадок декантировали, промывали водой. Полученные наноалмазы использовали при исследовании адсорбции мирамистина по методике, описанной выше.

Измерение ферментативной активности лизоцима.

Определение ферментативной активности лизоцима на поверхности наноалмазов по отношению к грамположительным бактериальным клеткам *Micrococcus luteus* проводили с использованием турбидиметрического метода. Для построения калибровочной зависимости активности лизоцима от его содержания готовили серию растворов лизоцима с концентрациями от 0.05 до 0.25 мг/мл. Навеску лиофилизированных клеток *M. luteus* (Sigma, США) массой 4.9 ± 0.2 мг растворяли в 1 мл воды. Для определения оптической плотности исследуемых растворов использовали спектрофотометр UV-5100 (Hitachi, Япония), оптическое поглощение регистрировали при 650 нм. Измерения проводили в кюветках с длиной оптического пути 1 см и объемом 1 мл. В кювету вносили 950 мкл воды и 30 мкл суспензии клеток и регистрировали оптическое поглощение в течение 5 мин, а затем добавляли 20 мкл раствора лизоцима. Получали калибровочную кривую зависимости изменения оптической плотности от количества лизоцима, которую использовали для расчета количества фермента на поверхности наноалмазов при их модифицировании лизоцимом.

Изучение распределения наноалмазов и комплексов наноалмаз—лизоцим *in vivo*. Эксперимент проводили на мышах—самках линии BALB/c (25–30 г) из питомника Столбовая (Московская область, Россия). Животных содержали в индивидуально-вентилируемых клетках T2 при искусственном освещении с 12-часовым режимом, со свободным доступом к полнорационному корму (ООО “Лабораторкорм”, Россия) и воде. Все исследования биораспределения проводились в одних и тех же экспериментальных условиях с тремя животными на группу. Каждой мышке вводили через хвостовую вену водную суспензию наноалмазов или комплекса наноалмаз—лизоцим в дозе по наноалмазам 5 мг/кг массы тела и радиоактивности наноалмазов 740 кБк. Через 30 мин выполняли эвтаназию гильотинированием, кровь отбирали в пробирки, содержащие K_3EDTA . Далее немедленно проводили аутопсию с изъятием органов целиком: сердце, легкие, печень, селезенка, почки, головной мозг, тимус, яичники, хвостовая вена. Органы растворяли в Solvable liquid (PerkinElmer) по методике, рекомендованной производителем. После полного растворения органа аликвоту раствора вносили в сцинтилляционную жидкость UltimaGold scintillation cocktail (PerkinElmer) и измеряли радиоактивность с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра.

Получение покрытий наноалмаз—лизоцим—мирамистин на поверхности коллагеновых матриц. Получали комплекс наноалмаз—лизоцим—мирамистин согласно методике, описанной выше. При определении количества наноалмазов на поверхности матриц использовали меченные тритием наноалмазы. После получения комплексов готовили их суспензии с конечной концентрацией наноалмазов 1 мг/мл и помещали в них коллагеновые матрицы. Матрицы в суспензиях выдерживали сутки, далее помещали в физиологический раствор. После их высушивали до постоянной массы (m_m), растворяли в азотной кислоте при кипячении. Охлаждали в морозильной камере при $-20^\circ C$ в течение 20 мин, разбавляли водой, переносили в пробирки типа Eppendorf, центрифугировали 15 мин при 12100×g и проводили измерение скорости счета осадка ($I_{осадок}$) и раствора над осадком ($I_{раствор}$).

Количество наноалмазов на поверхности биоткани (Γ_{ND}) определяли по уравнению (4)

$$\Gamma_{ND} = \frac{I_{осадок} + I_{раствор}}{\epsilon \times a_{уд} \times m_m}, \quad (4)$$

где $a_{уд}$ — удельная радиоактивность наноалмазов, ϵ — эффективность регистрации.

Для характеристики полученных покрытий методами сканирующей электронной микроскопии и определения антимикробных свойств покрытий использовали нерадиоактивные компоненты.

Определение антимикробной активности покрытий. Оценку адгезии бактерий к модифицированным и контрольным образцам коллагеновых матриц перикарда проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 11737-1–2000 [25]. В качестве тест-культур были выбраны клинические штаммы бактерий *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк), вызывающие осложнения после проведения операции по замене клапана. Все подготовительные работы и исследования проводили в стерильных условиях при температуре окружающей среды: 20–22°C.

Из суточных культур готовили суспензии по Мак—Фарланду с концентрацией 10^6 клеток/мл. Исследуемые образцы коллагеновых матриц с нанесенным наноалмазосодержащим покрытием погружали в подготовленные суспензии культур и инкубировали в термостате при 37°C в течение 4 ч. По окончании экспозиции образцы извлекали и отмывали с целью удаления излишков суспензии и неадгезированных клеток культур, отмывали стерильным 0.9% NaCl и высушивали на стерильной фильтровальной бумаге. Далее делали отпечатки с опытных и контрольных образцов, последовательно прикладывая гладкую и ворсинчатую стороны коллагеновых пластин к поверхности питательной среды Хинтона—Мюллера с последующим растиранием досуха полученных отпечатков.

После проведенной аппликации каждую пластину растирали в 1 мл стерильного физиологического раствора со стерильной стеклянной крошкой. Полученные гомогенаты по 0.5 мл без разведения и с 10-кратным разведением помещали на плотную питательную среду Хинтона–Мюллера и растирали досуха стерильным шпателем. Посевы опытных и контрольных образцов на среде Хинтона–Мюллера инкубировали в термостате в течение суток при температуре 37°C. По окончании инкубации подсчитывали количество колоний жизнеспособных клеток тест-микроорганизмов на исследуемых и контрольных образцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика и анализ комплексов наноалмаз–лизоцим. В данной работе проведено детальное исследование комплекса наноалмаз–лизоцим и наноалмаз–лизоцим–мирамистин. В работе использовали наноалмазы, по функциональному составу идентичные тем, которые использовались ранее [26] (рис. 2). Удельная поверхность, определенная с помощью анализа изотерм адсорбции/десорбции азота и рассчитанная по методу БЭТ, составила 250 и 390 м²/г. Используемые в данной работе наноалмазы также отличаются зарядом поверхности: в водной суспензии значение электрокинетического потенциала DND составило $+21 \pm 2$ мВ, а SDND -41 ± 5 мВ. Адсорбция лизоцима на поверхности наноалмазов привела к увеличению электрокинетического потенциала положительно заряженных DND, который составил $+39 \pm 1$ мВ. В случае отрицательно заряженного SDND произошло изменение заряда поверхности и электрокинетический потенциал составил $+26 \pm 3$ мВ.

Расшифровку ИК-спектров проводили согласно работе [27]. В ИК-спектрах присутствует широкая полоса при 3400 см⁻¹, обусловленная наличием поверхностных гидроксильных групп и адсорбированной воды. Сигнал в области 2900 см⁻¹ указывает на C_{sp3}-H-связи. Полоса в области 1630 см⁻¹ связана с адсорбированной на поверхности водой. Сигналы 1723 см⁻¹ обусловлены растяжением связи C=O карбонильных групп, а в области 1790 см⁻¹ – растяжение C=O связей карбоксильных групп и ангидридов. Сдвиг полосы 1776 см⁻¹ в область 1782 см⁻¹ (рис. 2б) свидетельствует об участии во взаимодействии лизоцим–наноалмаз карбоксильных групп на поверхности наноалмазов. Полосы в области 1450 см⁻¹ обусловлены асимметрическими изгибами СН_x-групп. Сигналы в области 1320–1370 см⁻¹ обусловлены симметричным растяжением C=O связей. Полоса 1254 см⁻¹ обусловлена изгибом C-O связей. Полосы 1117–1120 см⁻¹ и 1063 см⁻¹ получаются из-за асимметрических изгибов связей C-O-C и растяжений связи C-O. Интенсивность второго сигнала усиливается при адсорбции лизоцима на алмазе.

В образцах, модифицированных лизоцимом, появляются полосы в области 1660 и 1525 см⁻¹, соответствующие областям амид I и амид II соответственно.

Известно, что при адсорбции на наноалмазах как на положительных, так и на отрицательных, происходит изменение структуры белка [28]. Как следует из ИК-спектров, количество лизоцима на поверхности SDND больше, по сравнению с DND, что согласуется с данными работы [26], в которой с помощью меченного тритием лизоцима показали, что адсорбция лизоцима на наноалмазах с положительным ζ-потенциалом достигает 320 ± 30 мг/г, а на отрицательных – 2060 ± 100 мг/г. ИК-спектры, полученные для положительных и отрицательных наноалмазов Aldrich [26], полностью совпадают с результатами этой работы. Поэтому для лизоцима, адсорбированного на наноалмазах PlasmaChem, мы также можем предположить конформационные изменения в петлях белка.

Поскольку данные комплексы предполагается использовать для получения антимикробных покрытий клапанных протезов, то актуален вопрос о сохранении антибактериальной активности лизоцима после его адсорбции на поверхности наноалмазов. По этому вопросу в литературе имеются достаточно противоречивые данные: с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния и сканирующей электронной микроскопии показано сохранение активности лизоцима по отношению к *E. coli* после связывания с наноалмазами [29, 30]. Однако с помощью специального набора для анализа на основе флуоресценции (EnzChek Lysozyme Assay Kit) показано уменьшение активности лизоцима после его адсорбции на наноалмазах, причем обнаружена зависимость активности от размеров наноалмазов – снижение на 80–85% для частиц 5 и 50 нм и на 30–40% для крупных частиц [31]. В нашей работе для определения ферментативной активности использовался турбодиметрический метод, который хорошо зарекомендовал себя при определении активности лизоцима в объеме раствора [32–34]. С помощью турбодиметрического метода определили количество лизоцима на поверхности наноалмазов по его ферментативной активности. Показано, что на отрицательно заряженных наноалмазах количество активного лизоцима составляет 150 ± 60 мг/г, а на положительно заряженных – 170 ± 80 мг/г. Как отмечалось выше, количество лизоцима на отрицательных наноалмазах больше, чем на положительных, а по активности количества практически одинаковые. Таким образом, активность фермента наблюдается только в поверхностном слое. Усиление антибактериальных свойств лизоцима может быть достигнуто при образовании комплекса с катионными поверхностно-активными веществами, например, мирамистин [21].

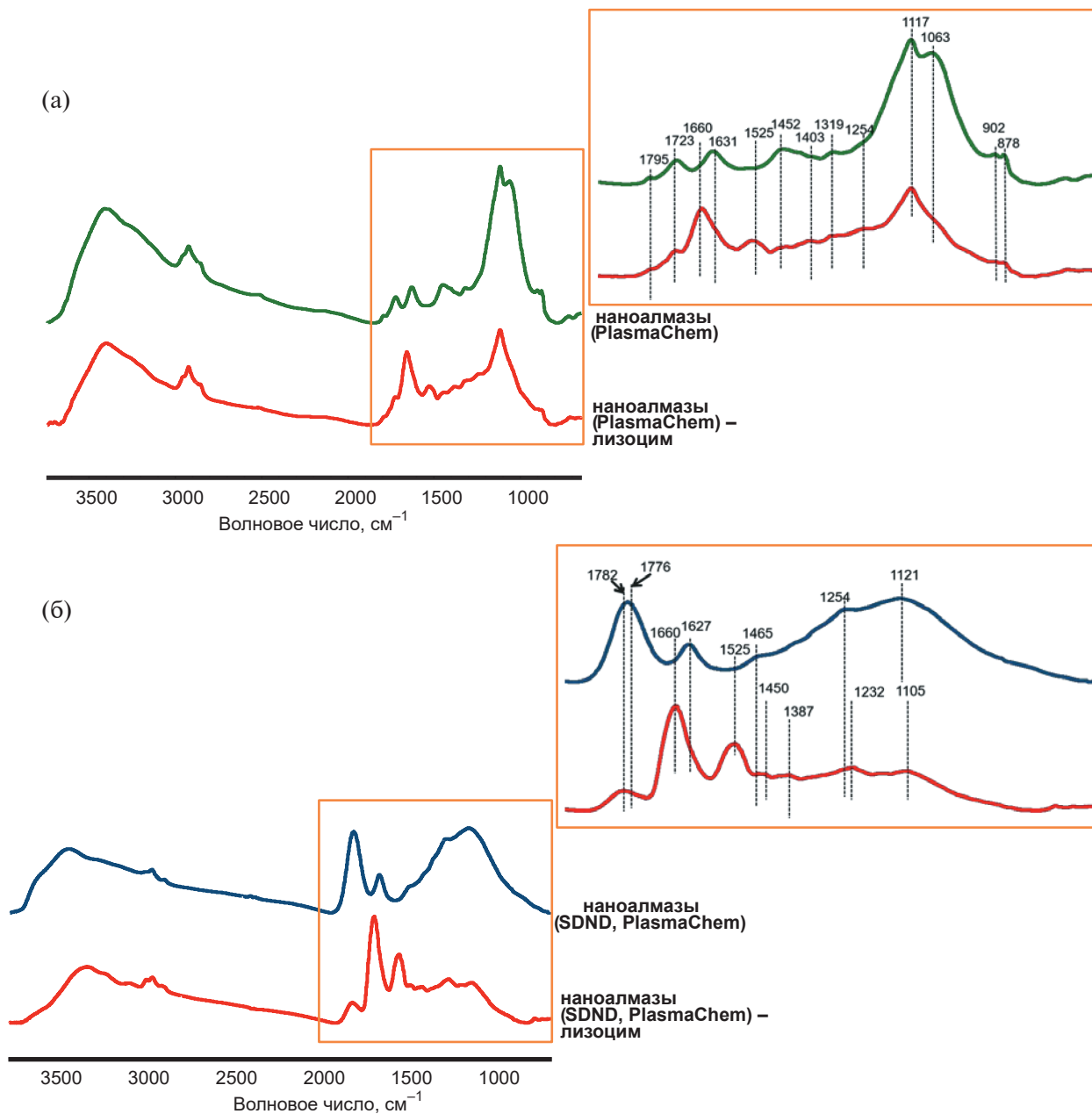


Рис. 2. ИК-спектр наноалмазов до и после модификации лизоцимом (а) DND, PlasmaChem и (б) SDND, PlasmaChem.

Зависимости адсорбции мирамистина на наноалмазах, модифицированных лизоцимом, от его равновесной концентрации приведены на рис. 3.

Адсорбция мирамистина на исходных наноалмазах приводила к изменению седиментационной устойчивости водных суспензий: в случае DND электрокинетический потенциал оставался положительным и возрастал от +20 до +40 мВ; в случае SDND (ζ -потенциал немодифицированных наноалмазов –30 мВ) при адсорбции около 100 мкмоль/г значение электрокинетического

потенциала приближалось к нулю, что объясняется полной компенсацией заряда поверхности наноалмаза. С ростом поверхностной концентрации мирамистина происходила смена заряда на положительный и при адсорбции свыше 120 мкмоль/г наблюдалось образование устойчивых суспензий, электрокинетический потенциал которых составлял +25 мВ.

Для наноалмазов, предварительно модифицированных лизоцимом, найдено, что адсорбция мирамистина (в области плато на изотерме) на

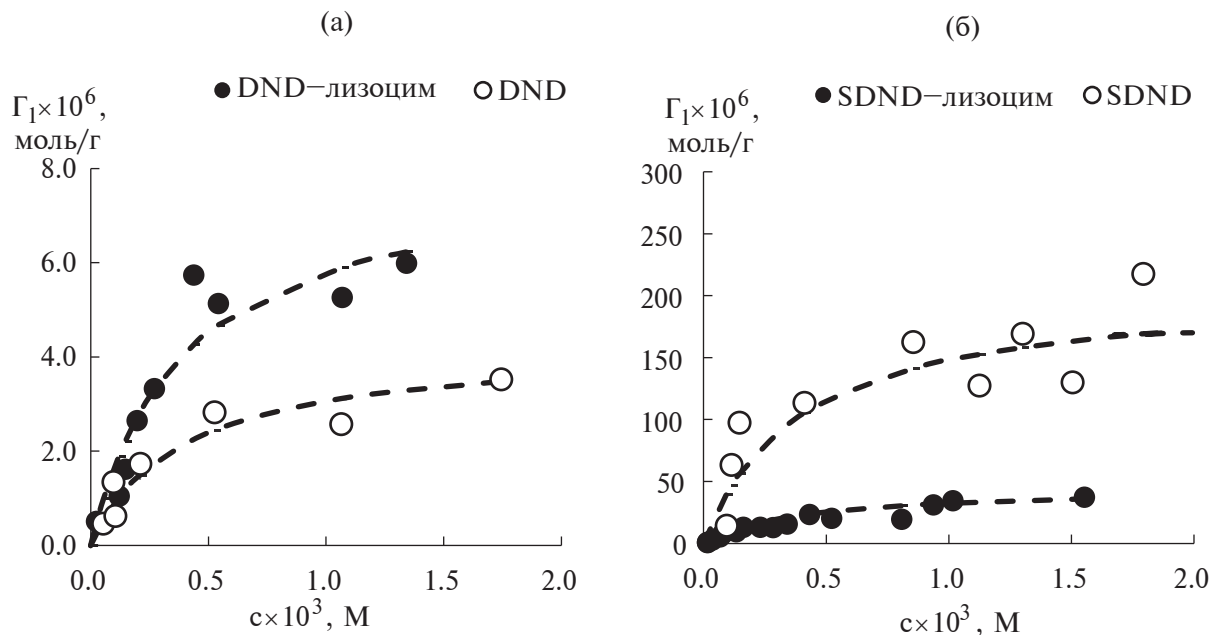


Рис. 3. Зависимость адсорбции мирамистина от его равновесной концентрации в суспензии на наноалмазах DND (а) и SDND (б). о — исходные наноалмазы; • — наноалмазы с адсорбированным лизоцимом.

комплексе наноалмаз–лизозим приводит к сильному снижению электрокинетического потенциала для SDND–лизозим от 26 ± 3 до 5 ± 3 мВ. Для комплекса DND–лизозим уменьшение электрокинетического потенциала было не столь сильным: от 39 ± 1 до 34 ± 2 мВ.

Для сравнения результатов по адсорбции мирамистина на разных типах наноалмазов зависимости адсорбции мирамистина от его равновесной концентрации описали уравнением, аналогичным уравнению адсорбции Ленгмюра.

$$\Gamma_1 = \Gamma_{max} \frac{KC}{1 + KC}, \quad (5)$$

где Γ_{max} — значение максимальной адсорбции, K — константа, аналогичная константе адсорбционного равновесия в уравнении Ленгмюра.

Аппроксимация полученных зависимостей, показанная на рис. 3 пунктирными линиями, получена с помощью подбора параметров методом наименьших квадратов. Рассчитанные параметры и коэффициенты корреляции приведены в табл. 1.

Показано, что предварительное модифицирование поверхности наноалмазов DND лизоцимом повышает адсорбцию мирамистина, в то время как на модифицированных лизоцимом SDND адсорбция мирамистина снижается по сравнению с немодифицированным SDND. Однако адсорбция мирамистина на SDND даже после нанесения лизоцима все равно выше, чем на DND.

Поскольку образование комплексов мирамистин–лизозим в объеме раствора приводит к увеличению ферментативной активности лизоцима [20], в данной работе проверили изменение активности, когда фермент находится на поверхности наноалмазов с помощью турбодиметрического метода. Измерение проводили для максимальной поверхностной концентрации мирамистина (табл. 2). Полученный комплекс наноалмаз–лизозим–мирамистин был использован для получения покрытия коллагеновой матрицы бычьего перикарда.

Количественный состав покрытия (табл. 2) был определен с помощью меченых соединений (наноалмаз, мирамистин) и бактериолитической активности (лизозим).

При сравнении результатов с ранее полученными данными [35] было отмечено, что присутствие слоя лизоцим–мирамистин снижает количество DND (положительные наноалмазы) на поверхности матрицы по сравнению с немодифицированным наноалмазом; напротив, адсорбция SDND (отрицательные наноалмазы) на поверхности наноалмазов возрастает.

Матрицы с нанесенным наноалмазным слоем были проанализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 4), которая выявила образование крупных агрегатов на обеих сторонах коллагеновой ткани. Показано, частицы алмаза покрывают обе стороны коллагеновой матрицы, причем покрытие DND оказалось более равномерным по сравнению с SDND, о чем также

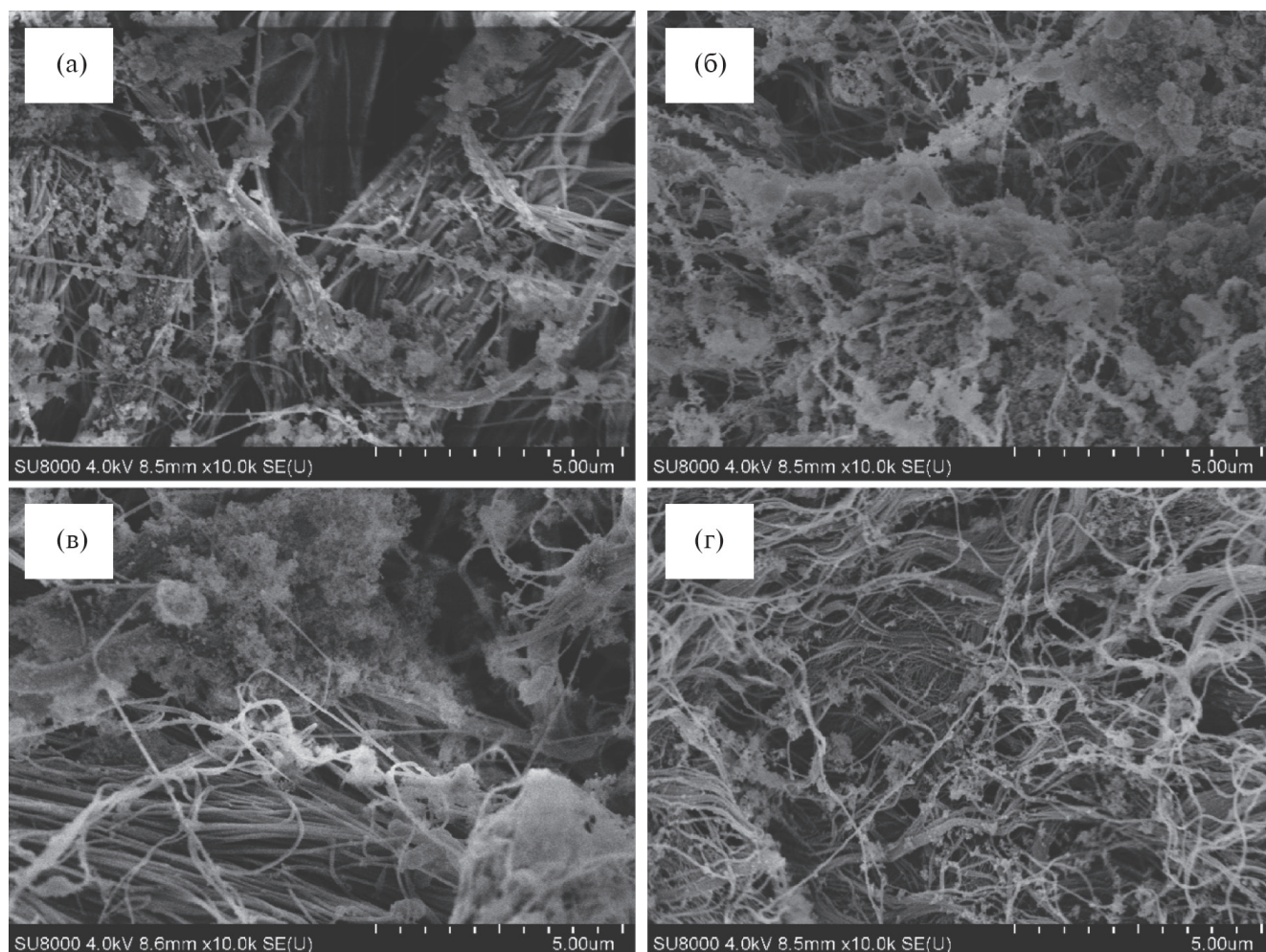


Рис. 4. СЭМ-изображения наноалмазсодержащих покрытий коллагеновой ткани бычьего перикарда: (а, в) – ворсистая сторона, (б, г) – гладкая сторона. (а, б) – DND, (в, г) – SDND.

Таблица 1. Параметры уравнения (5) для адсорбции мирамистина на разных типах наноалмазов

Параметр уравнения адсорбции	Тип наноалмазов			
	DND	DND–лизоцим	SDND	SDND–лизоцим
Γ_{\max} , моль/г	4.3×10^{-6}	8.0×10^{-6}	2.1×10^{-4}	4.5×10^{-5}
K , л/ммоль	2.6×10^3	2.6×10^3	2.6×10^3	2.6×10^3
R ($\alpha=0.05$; $n=3$)	0.951	0.954	0.875	0.958

Таблица 2. Состав наноалмазного покрытия коллагеновой матрицы

Состав слоя на поверхности матрицы	Наноалмазы	
	SDND	DND
мг наноалмаза/ г матрицы	4.2 ± 2.0	1.6 ± 0.5
мг лизоцима*/ г матрицы	0.017 ± 0.010	0.48 ± 0.07
моль мирамистина/ г матрицы	$(1.9 \pm 0.4) \times 10^{-7}$	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-8}$

* Приведено содержание активного фермента.

Адгезия



Выживаемость



Рис. 5. Изображения образцов с бактериями *Staphylococcus aureus* после антибактериального теста. Слева показан контрольный образец – матрица без покрытия. 1 – SDND, 2 – SDND–лизоцим–мирамистин, 3 – DND, 4 – DND–лизоцим–мирамистин.

свидетельствует большой доверительный интервал при определении количества по радиоактивности (табл. 2).

Антимикробную активность полученных покрытий проверяли по отношению к *Staphylococcus aureus* – самому распространенному возбудителю инфекций в постоперационном периоде. Антимикробную активность характеризовали по двум параметрам: “адгезия” – инкубирование тест-объектов в суспензиях клеток в течение 4 ч и “выживаемость” – бактерии, выжившие на исследуемых коллагеновых матрицах за 24 ч.

На рис. 5 приведены изображения образцов с бактериями золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* после антибактериального теста.

Результаты измерения представлены в табл. 3. Показано, что при использовании комплекса наноалмаз–лизоцим–мирамистин бактерии адгезировались на коллагеновую матрицу на 2–4 порядка меньше, чем на контрольный образец без покрытия. Количество выживших бактерий также снизилось на 1–2 порядка. Необходимо отметить, что мирамистин при адсорбции на наноалмазы теряет токсичность по отношению к различным возбудителям [21]. Причина того, что комплекс наноалмаз–мирамистин нетоксичен, вероятно, связана с особенностью адсорбции катионных ПАВ на наноалмазах: адсорбция происходит за счет электростатического притяжения положительно

заряженной группы четвертичного аммониевого основания и отрицательно заряженных центров на поверхности наноалмазов [36]. Дополнительное модифицирование поверхности наноалмазов лизоцимом привело к изменению ориентации молекулы мирамистина на поверхности, что позволяет ему проявлять антисептические свойства.

Известно, что покрытия бычьего перикарда наноалмазами практически не подвергаются разрушению длительное время в организме животного в условиях максимально приближенных к применению [35]. Тем не менее необходимо определить судьбу наноалмазов, если они будут высвобождаться из покрытия и попадать в кровоток. Для проверки вопроса о миграции наночастиц по организму в случае разрушения покрытия был проведен анализ распределения комплекса наноалмаз–лизоцим в организме мыши при внутривенном введении, обеспечивающем максимальную биодоступность материала. Вводили суспензии положительно и отрицательно заряженных [^3H] наноалмазов, а также их адсорбционные комплексы с лизоцимом, распределение наночастиц в органах мышей показано на рис. 6.

Большая часть наноалмазов и комплекса наноалмаз–лизоцим остается в хвостовой вене. Значительное количество наноалмазов как исходного, так и модифицированного было обнаружено в печени и селезенке. Модифицирование поверхности наноалмаза лизоцимом приводит к снижению

Таблица 3. Антимикробная активность покрытий коллагеновой матрицы бычьего перикарда

Образец покрытия	Параметр антимикробности, lg КОЕ	
	Адгезия*	Выживаемость**
матрица без покрытия	5.0	5.0
SDND	4.1	2.4
SDND–мирамистин	4.2	2.7
SDND–LSZ–мирамистин	3.1	1.5
DND	3.9	2.0
DND–мирамистин	4.4	2.5
DND–LSZ–мирамистин	2.7	1.7

* Наименее значимое различие ($\alpha=0.05$) LSD=0.8.

** Наименее значимое различие ($\alpha=0.05$) LSD=0.7.

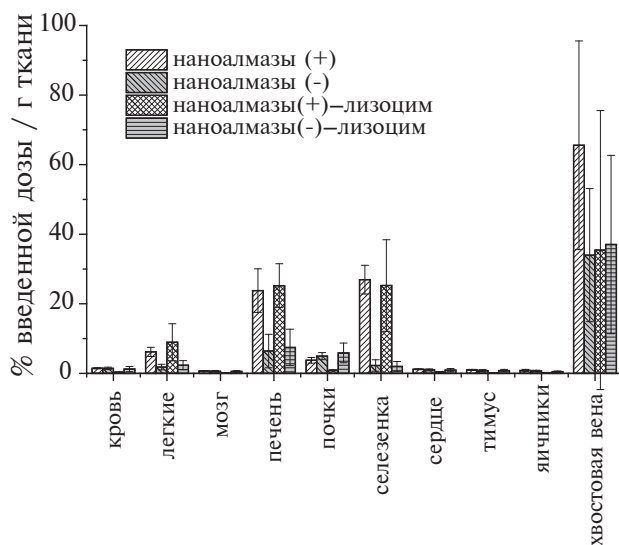


Рис. 6. Процент введенной дозы на грамм ткани через 30 мин после внутривенного введения положительно (+) и отрицательно (-) заряженных наноалмазов и комплексов наноалмазы–лизоцим.

концентрирования “положительного” наноалмаза в хвостовой вене, однако такого эффекта не было в случае “отрицательного” образца. Некоторое количество наноалмазов и их комплексов с лизоцимом обнаружено в печени, селезенке и в меньшем количестве в легких и почках. Было обнаружено меньшее количество отрицательно заряженных наноалмазов во всех тканях, в том числе наблюдалось снижение в 3.5 раза для легких и печени, а для селезенки уменьшение концентрации наночастиц

в случае отрицательного наноалмаза было в 11 раз. Модифицирование лизоцимом влияло только на концентрирование исходного наноалмаза в месте введения, как отмечалось выше, и не влияло на концентрирование в других тканях. Таким образом, показано, что лизоцим может быть использован как модифицирующий агент поверхности наноалмазов для снижения их агрегирования в месте введения и подавления адсорбции компонентов биологических жидкостей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе получены комплексы наноалмазов с лизоцимом и мирамистином. Показано, что в комплексах наноалмаз–лизоцим бактериолицидная активность сохраняется в поверхностном слое, но может быть усилена при адсорбции мирамистина. При анализе распределения комплексов наноалмаз–лизоцим в организме животного найдено, что модифицирование наноалмазов лизоцимом влияет только на его концентрирование в месте введения и не сказывается на концентрировании в других тканях. Более того, обнаружено снижение концентрации наночастиц в случае отрицательно заряженного материала.

Показано, что предварительное модифицирование поверхности наноалмазов лизоцимом существенно влияет на адсорбцию мирамистина: для DND адсорбция возрастает, для SDND снижается. Изотермы адсорбции описаны уравнением, аналогичным уравнению Ленгмюра. Установлено, что адсорбция мирамистина (в области плато на изотерме) на комплексе наноалмаз–лизоцим приводит к сильному снижению электрокинетического потенциала для SDND–лизоцим от 26 ± 3 до 5 ± 3 мВ, что свидетельствует от его низкой агрегационной устойчивости в суспензии и, как следствие, лучшему удерживанию на поверхности коллагеновой матрицы. Для комплекса DND–лизоцим уменьшение электрокинетического потенциала было не столь сильным: от 39 ± 1 до 34 ± 2 мВ. Полученные комплексы наноалмаз–лизоцим–мирамистин обладают антимикробной активностью. При введении этих комплексов в состав коллагеновых матриц в 100–10 000 раз уменьшается адгезия бактерий золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* и 10–100 раз падает выживаемость этих бактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 22–23–00019).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с мышами проводили согласно Приложению А “Руководство по уходу за лаборатор-

ными животными и их использованию” Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (СЕД 123). Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова (№ 14 от 30 октября 2018 г).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bloomfield P. Choice of heart valve prosthesis // *Heart*. 2002. V. 87. № 6. P. 583–589. <https://doi.org/10.1136/heart.87.6.583>
2. Shao Z., Tao T., Xu H. et al. Recent progress in biomaterials for heart valve replacement: Structure, function, and biomimetic design // *View*. 2021. V. 2. № 6. P. 20200142. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200142>
3. Ekser B., Cooper D.K.C., Tector A.J. The need for xenotransplantation as a source of organs and cells for clinical transplantation // *International Journal of Surgery*. 2015. V. 23. P. 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2015.06.066>
4. Findeisen K., Morticelli L., Goecke T. et al. Toward acellular xenogeneic heart valve prostheses: Histological and biomechanical characterization of decellularized and enzymatically deglycosylated porcine pulmonary heart valve matrices // *Xenotransplantation*. 2020. V. 27. № 5. P. e12617. <https://doi.org/10.1111/xen.12617>
5. Zilla P., Brink J., Human P. et al. Prosthetic heart valves: Catering for the few // *Biomaterials*. 2008. V. 29. № 4. P. 385–406. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.033>
6. Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Синолиц А.В. и др. Биоматериал для изготовления протезов клапанов сердца и способ получения биоматериала. Патент РФ RU2711544. РФ, 2020.
7. Tsai L.W., Lin Y.C., Perevedentseva E. et al. Nanodiamonds for medical applications: Interaction with blood in vitro and in vivo // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. V. 17. № 7. P. 5–9. <https://doi.org/10.3390/ijms17071111>
8. Mona J., Kuo C.-J., Perevedentseva E. et al. Adsorption of human blood plasma on nanodiamond and its influence on activated partial thromboplastin time // *Diamond and Related Materials*. 2013. V. 39. P. 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2013.08.001>
9. Turcheniuk V., Raks V., Issa R. et al. Antimicrobial activity of menthol modified nanodiamond particles // *Diamond and Related Materials*. 2015. V. 57. P. 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2014.12.002>
10. Xiao J., Duan X., Yin Q. et al. Nanodiamonds-mediated doxorubicin nuclear delivery to inhibit lung metastasis of breast cancer // *Biomaterials*. 2013. V. 34. № 37. P. 9648–9656. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.056>
11. Huang H., Pierstorff E., Osawa E. et al. Protein-mediated assembly of nanodiamond hydrogels into a bio-compatible and biofunctional multilayer nanofilm // *ACS Nano*. 2008. V. 2. № 2. P. 203–212. <https://doi.org/10.1021/nn7000867>
12. Schrand A.M., Hens S.A., Shenderova O.A. Nanodiamond particles: Properties and perspectives for bioapplications // *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. 2009. V. 34. № 1–2. P. 18–74. <https://doi.org/10.1080/10408430902831987>
13. Tinwala H., Wairkar S. Production, surface modification and biomedical applications of nanodiamonds: A sparkling tool for theranostics // *Materials Science and Engineering: C*. 2019. V. 97. P. 913–931. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.073>
14. Vijayanthimala V., Lee D.K., Kim S.V. et al. Nanodiamond-mediated drug delivery and imaging: challenges and opportunities // *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015. V. 12. № 5. P. 735–749. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.992412>
15. Chen M., Pierstorff E.D., Lam R. et al. Nanodiamond-mediated delivery of water-insoluble therapeutics // *ACS Nano*. 2016. V. 3. № 7. P. 2016–2022. <https://doi.org/10.1021/nn900480m>
16. Perevedentseva E., Lin Y.-C., Cheng C.-L. A review of recent advances in nanodiamond-mediated drug delivery in cancer // *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021. V. 18. № 3. P. 369–382. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1832988>
17. Chatterjee A., Perevedentseva E., Jani M. et al. Antibacterial effect of ultrafine nanodiamond against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* // *Journal of Biomedical Optics*. 2014. V. 20. № 5. P. 051014. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.5.051014>
18. Мосолова А.В., Климова Л.Г., Суковатых Б.С. и др. Оценка биоцидной активности нового шовного материала, импрегнированного мирамистином // *Вестник ВолГМУ*. 2021. V. 18. № 1. P. 31–35. [https://doi.org/10.19163/1994-9480-2021-1\(77\)-31-35](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2021-1(77)-31-35)
19. Дунаевский А.М., Кириченко И.М. Клиническое обоснование использования препарата Мирамистин в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний респираторной системы. Обзор литературы // *Поликлиника*. 2013. P. 6–12.
20. Chernysheva M.G., Melik-Nubarov N.S., Grozdova I.D. et al. Reduction of cytotoxicity of Myramistin by adsorption on nanodiamonds // *Mendelev Communications*. 2017. V. 27. № 4. P. 421–423. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.07.036>
21. Chernysheva M.G., Shnitko A.V., Skrabkova H.S. et al. Peculiarities of alkylamidopropyl dimethylbenzylammonium (Miramistin) in the relationship to lysozyme

- in comparison with quaternary ammonium surfactants: Coadsorption at the interfaces, enzymatic activity and molecular docking // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021. V. 629. P. 127503.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127503>
22. Chaschin I.S., Badun G.A., Chernysheva M.G. et al. Structural and mechanical characteristics of collagen tissue coated with chitosan in a liquid CO₂/water system at different pressures // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2019. V. 94. P. 213–221.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.03.012>
23. Badun G.A., Chernysheva M.G., Yakovlev R.Y. et al. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method // *Radiochimica Acta*. 2014. V. 102. № 10. P. 941–946.
<https://doi.org/10.1515/ract-2013-2155>
24. Бадун Г.А., Чернышева М.Г. Метод термической активации трития. Особенности применения, современные достижения и дальнейшие перспективы развития // *Радиохимия*. 2023. V. 65. № 2. P. 158–171.
<https://doi.org/10.31857/S0033831123020053>
25. Стерилизация медицинских изделий. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. Часть 1. Оценка популяции микроорганизмов на продукции // ГОСТ Р ИСО 11737–1–2000, 2014.
26. Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Синолиц А.В. et al. Метод тритиевого зонда в исследовании адсорбционных слоев лизоцима на поверхности детонационных наноалмазов // *Радиохимия*. 2021. V. 63. № 2. P. 185–192.
<https://doi.org/10.31857/S0033831121020118>
27. Petit T., Puskar L. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation // *Diamond and Related Materials*. 2018. V. 89. P. 52–66.
<https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.08.005>
28. Aramesh M., Shimoni O., Ostrikov K. et al. Surface charge effects in protein adsorption on nanodiamonds // *Nanoscale*. 2015. V. 7. № 13. P. 5726–5736.
<https://doi.org/10.1039/C5NR00250H>
29. Perevedentseva E., Cheng C.-Y., Chung P.-H. et al. The interaction of the protein lysozyme with bacteria *E. coli* observed using nanodiamond labelling // *Nanotechnology*. 2007. V. 18. № 31. P. 315102.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/31/315102>
30. Liu Y.L., Sun K.W. Protein functionalized nanodiamond arrays // *Nanoscale Research Letters*. 2010. V. 5. № 6. P. 1045–1050.
<https://doi.org/10.1007/s11671-010-9600-7>
31. Perevedentseva E., Cai P.-J., Chiu Y.-C. et al. Characterizing protein activities on the lysozyme and nanodiamond complex prepared for bio applications // *Langmuir*. 2011. V. 27. № 3. P. 1085–1091.
<https://doi.org/10.1021/la103155c>
32. Levashov P.A., Sedov S.A., Shlpovskov S. et al. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic Gram-negative bacteria lysis // *Analytical Chemistry*. 2010. V. 82. № 5. P. 2161–2163.
<https://doi.org/10.1021/ac902978u>
33. Матолыгина Д.А., Душутина Н.С., Овчинникова Е.Д. и др. Единый подход для расчета скорости ферментативного лизиса живых бактериальных клеточных субстратов турбидиметрическим методом // *Вестн. Моск. Ун-та*. 2018. V. 59. № 2. P. 125–131.
34. Lu W.-J., Smirnov S.A., Levashov P.A. General characteristics of the influence of surfactants on the bacteriolytic activity of lysozyme based on the example of enzymatic lysis of *Lactobacillus plantarum* cells in the presence of Tween 21 and SDS // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021. V. 575. P. 73–77.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.060>
35. Chernysheva M.G., Chaschin I.S., Badun G.A. et al. Novel nanodiamond coatings for durable xenogenic heart valve prostheses: Mechanical properties and in vivo stability // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2023. V. 656. P. 130373.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130373>
36. Badun G.A., Chernysheva M.G., Gus'kov A.V. et al. Adsorption of alkyltrimethylammonium bromides on nanodiamonds // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2020. V. 28. № 5. P. 361–367.
<https://doi.org/10.1080/1536383X.2019.1685982>