

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ АЛМАЗА ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА И ВЫЯВЛЕНИЕ ИХ ЛОКАЛИЗАЦИИ В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА И ЛЕГКИХ МЫШЕЙ

© 2023 г. Е. К. Тарасова^{1,*}, М. В. Ерохина^{1,2}, А. Г. Масютин^{1,2},
И. В. Бочарова¹, Р. Ю. Яковлев³, А. А. Кузьмин⁴, Л. Н. Лепеха¹

¹Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ООО “Смарт Полиморф Технолоджиз”, Инновационный центр “Сколково”, Москва, Россия

⁴ЗАО “Алмаз Фарм”, Москва, Россия

*E-mail: shalioto6@gmail.com

Поступила в редакцию 19.09.2022 г.

После доработки 23.11.2022 г.

Принята к публикации 23.11.2022 г.

Получены модифицированные функциональными группами наноалмазы для адресной доставки лекарственных препаратов. Определен набор методов для идентификации наноалмазов в биологическом материале и определена их локализация в макрофагах человека и клетках легких мышей. Показано, что в легких мышей через 7 сут после введения наноалмазы интернализуются эндотелиоцитами и интерстициальными макрофагами. Как в культуре макрофагов человека, так и в клетках легких наноалмазы локализуются в фагосомах/фаголизосомах. В макрофагах человека и клетках легких мышей наноалмазы не вызывают патологических изменений. Полученные результаты позволяют рассматривать наноалмазы в качестве перспективной платформы-носителя для доставки лекарственных препаратов в первую очередь в макрофаги интерстиция респираторного отдела легких, что является актуальным при таком заболевании, как туберкулез.

DOI: 10.56304/S1992722323060134

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы существенно вырос интерес к такой области медицины, как адресная доставка лекарственных и биологически активных веществ [1]. Так называют процесс, при котором вещества закрепляются на особом носителе и доставляются непосредственно к целевому органу или ткани. Адресная доставка позволяет увеличить концентрацию лекарственного препарата в требующем лечения органе, продолжительность и эффективность действия лекарственного вещества и снизить его побочные эффекты. Данный подход особенно широко применяется в терапии опухолевых заболеваний [2] и является перспективным направлением для разработки препаратов противотуберкулезной терапии [3].

Одним из ключевых факторов эффективности адресной доставки лекарственного агента является правильный подбор платформы-носителя. Подходящими по физическим (размер, форма, заряд) и химическим параметрам (возможность функционализации поверхности) носителями для этой цели являются липосомы, полимерные и металлические наночастицы, дендримеры и дру-

гие объекты [4]. В их число входят и наноалмазы (НА), которые представляют особый интерес для исследователей благодаря своим физико-химическим свойствам.

Наноалмазы – это наноразмерные (4–100 нм) округлые частицы неправильной формы, имеющие кристаллическую структуру алмаза. Одним из преимуществ НА по сравнению с другими платформами является низкая токсичность для клеточных культур и живых организмов (мышей) [5, 6]. Другое привлекательное свойство НА – возможность направленно функционализировать поверхность частиц для дальнейшего закрепления на ней лекарственных и биологически активных веществ [7].

Функционализация – изменение химического состава поверхности НА – также может быть весьма разнообразна в зависимости от целей эксперимента [8]. Так, для адсорбции белков и нуклеиновых кислот могут использоваться НА диаметром как 80–100 нм [9], так и 5 нм [10].

Для биомедицинского применения рассматривают детонационные НА и НА, произведенные высокотемпературным методом при высоком

давлении [11]. Первый метод низкочастотный и имеет высокий выход, получаемые наночастицы имеют размер менее 10 нм и имеют низкую интенсивность автофлуоресценции. Второй метод позволяет получать НА в широком диапазоне размеров (до сотен микрометров) с низкой плотностью дефектов кристаллической решетки, однако имеет низкий выход и весьма дорогостоящ [12].

Распределение НА в организме является важным объектом интереса для научного сообщества. Так, накопление НА в органах мыши исследовалось изотопно-индикаторным методом [5]. Через 2 ч после внутритрахеального введения суспензии НА (4 мг/кг) наночастицы обнаруживались в печени, сердце, селезенке и легких. Методом трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения было показано, что через 30 мин после внутривенной инъекции раствора НА (20 мг/кг) мышам наночастицы выявляются преимущественно в печени и легких, а также в почках и селезенке [13].

Отдельно опубликованы исследования о накоплении, выведении и токсичности НА, выполненные на легких мышей [14]. В работе использовали детонационные НА диаметром 4 и 50 нм, полученные путем размалывания макрокристаллов, синтезированных высокотемпературным методом при высоком давлении. Было показано, что оба типа НА не токсичны для мышей при интратрахеальном введении и наночастицы обнаруживаются в легких даже спустя 28 дней после введения. Это позволило предположить, что носители лекарств на основе НА могут быть особенно эффективны при терапии легочных заболеваний. Однако в данной работе использовались методы световой микроскопии, которые при изучении наночастиц могут иметь низкую репрезентативность из-за малых размеров искомого объекта. Следовательно, вопрос локализации НА в легких нуждается в дальнейшем рассмотрении с применением более точных методов детекции НА. Такими, в частности, являются методы стандартной и аналитической электронной микроскопии.

Известно, что при поступлении в организм инородных частиц в первую очередь на них реагируют нейтрофилы и макрофаги, которые осуществляют фагоцитоз данных частиц и их последующее разрушение [15]. В норме в легких существуют две основных популяции резидентных макрофагов – бронхиальные/альвеолярные и интерстициальные (гистиоциты). Также в интерстиций мигрируют из крови макрофаги воспаления при развитии патологического процесса [16]. Для оценки точности адресной доставки необходимо быть уверенными, что после введения в организм потенциальная платформа-носитель выявляется и накапливается в органах и клетках-мишенях. Кроме того, взаимодействие НА с мак-

рофагами человека нуждается в дополнительном изучении, в частности недостаточно данных о влиянии НА с положительным поверхностным потенциалом, так как большинство работ посвящено НА, функционализированным кислотными группами [17]. Таким образом, цель работы – идентифицировать НА детонационного синтеза и определить их локализацию в макрофагах человека и в клетках легких мышей в моделях *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наноалмазы. В работе использовали НА, произведенные методом детонационного синтеза – детонационный наноалмаз (ДНА) марки УДА-ТАН (ФГУП СКТБ Технолог, Санкт-Петербург, Россия). Для применения в биомедицинских целях компанией ЗАО “Алмаз Фарм” выполнена стандартизация ДНА. Стандартизация наночастиц заключалась в трех последовательных стадиях. На первой проводили дополнительную очистку ДНА. Она заключалась в последовательной промывке 1 М соляной кислотой и 1 М гидроксидом натрия для удаления с поверхности ионов железа, нитрат-анионов и серосодержащих соединений, в том числе сульфатов. После очистки наночастицы промывали большим количеством воды и высушивали [18].

На второй стадии проводили модифицирование поверхности частиц ДНА путем газовой фазной обработки порошка ДНА водородом при температуре 800°C в течение 2 ч. В результате обработки получали НА, имеющие бифункциональную поверхность из –ОН- и –Н-групп (ДНА-Н) [19].

На третьей стадии диспергировали ДНА-Н в воде с помощью ультразвукового диспергатора (Мэлфиз, Россия) и удаляли крупную фракцию агрегатов ДНА-Н центрифугированием при 6000 g в течение 10 мин.

По данным производителей первичные НА имеют размеры 4–6 нм, размеры агрегатов ДНА-Н в воде составляли 50 нм. Гидрозоль представлял собой непрозрачную серую жидкость. Гидрозоль на просвет был прозрачным, голубовато-коричневого цвета. Стандартизованный гидрозоль частиц ДНА-Н использовали в дальнейших биомедицинских исследованиях.

Культивирование клеток. В качестве модельного объекта использовали клеточную линию ТНР-1 (Российская коллекция клеточных культур, Санкт-Петербург, НИИ цитологии). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (PanEco company, Москва, Россия) с добавлением 2 мМ L-глутамина (PanEco company, Москва, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Инкубацию клеток проводили при 37°C и 5% CO₂. Экспериментальная концентрация клеток составляла 500 000 клеток на 1 мл среды.

Макрофагальную дифференцировку индуцировали добавлением в среду культивирования 10^{-7} М форболового эфира (Sigma, США). Наночастицы в виде водной суспензии (50 мкг/мл) добавляли к клеткам через 72 ч дифференцировки согласно ранее полученным данным о фагоцитарной активности макрофагов ТНР-1 [20]. Клетки инкубировали с наночастицами в течение 10 сут.

Введение наночастиц экспериментальным животным. Была подготовлена гидрозоль ДНА-Н с концентрацией 4 мг/мл в физиологическом растворе. Введение выполняли на мышах линии BALB/c однократно, медленно, в латеральную хвостовую вену, в объеме 200 мкл на мышшь. В экспериментальной группе было семь, в контрольной – пять животных. Выведение животных из эксперимента проводилось через 7 сут после введения наночастиц.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Для морфологического и химического анализа наночастиц, локализованных в макрофагах, клетки фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом (Ted Pella, INC) на 0.1 М фосфатном буфере в течение 2 ч, затем дофиксировали 1%-ным раствором тетраоксида осмия (OsO_4) в течение 2 ч при $+4^{\circ}C$. Обезвоживание образцов проводили в спиртах восходящей концентрации и ацетоне по стандартной методике [21]. После обезвоживания образцы заключали в эпоксидную смолу. Срезы с блоков получали на ультратомографе LEICA UCT 4 (Leica, Германия) и окрашивали по Рейнольдсу (полное контрастирование). Для первичного поиска наночастиц на ультратонких срезах отдельные образцы не подвергали контрастированию по Рейнольдсу (неполное контрастирование). Полученные препараты исследовали с помощью аналитического электронного микроскопа JEM-2100 (Jeol, Япония). Поиск наночастиц проводили в клетках респираторного отдела.

Дифракция электронов. Ультратонкие срезы клеток и легких анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-2100, 200 кВ, non-coated, катод LaB_6 (Jeol, Япония). Использовали камеру Gatan FT1000 2k (Gatan, США). Глубина камеры – 20 см. Дифракцию электронов анализировали у выявленных электронно-плотных включений в клетках респираторного отдела.

Стандартная гистология. Образцы фиксировали в 10%-ном забуференном формалине (Бювитрум, Россия). Дегидратация гистологического материала осуществлялась по стандартному протоколу в серии спиртов от 70 до 96%, 100%-ный этанол был заменен на изопропиловый спирт. После изопропилового спирта образцы были заключены в парафин “Nystomix” (Бювитрум, Россия). Срезы толщиной 5 мкм получали на микротоме Leica (Германия). Препараты окрашивали

гематоксилином (по Карацци) и эозином (0.1%-ный водный раствор) и заключали в канадский бальзам. В дальнейшем анализ изображений проводили на световом микроскопе Leica DM 1000 LED с объективами N Plan 4x, 20x, 40x и 100x/1.25 oil.

Полутонкие срезы. Для полутонких срезов использовали материал, подготовленный для электронной микроскопии. Срезы толщиной 1 мкм получали на ультратоме Leica EM UC7 и анализировали на световом микроскопе Leica DM1000 (Leica, Германия) с использованием дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (ДИК).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика наноалмазов. Методом ТЭМ были получены изображения скоплений и индивидуальных НА (рис. 1а). Наночастицы округлой, неправильной формы с характерной для кристаллических объектов исчерченностью (рис. 1б). Также была получена электронограмма НА (рис. 1в). Кольца на электронограмме четкие, соответствуют своим положениям, характерным для алмаза [22]. Размер наночастиц составил 3–10 нм (было измерено 50 наночастиц на ТЭМ-изображениях).

Анализ захвата и локализации наноалмазов в макрофагах ТНР-1. Методом ДИК показано, что после инкубации макрофагов с НА в течение 10 сут клетки сохраняют свою морфологию – в культуре выявляются клетки округлой формы, веретеновидные и хорошо распластанные, в цитоплазме определяются многочисленные включения (рис. 2а, 2б).

При анализе ультраструктуры макрофагов были обнаружены многочисленные филоподии, окружающие наночастицы (рис. 2в, 2д), и инвагинации плазматической мембраны (рис. 2г, 2е), внутри которых выявляются наночастицы. Присутствуют также скопления наночастиц, расположенные внеклеточно (рис. 2в, показано стрелкой).

Цитоплазма клеток содержит многочисленные фагосомы/фаголизосомы с наночастицами (рис. 3). Вариантов иной внутриклеточной локализации НА – в других органеллах или свободно в цитоплазме – выявлено не было.

Отметим, что клетки сохраняют свои ультраструктурные особенности после инкубации с НА в течение 10 сут, и признаки патологических изменений на ультраструктурном уровне не были обнаружены.

Анализ локализации наноалмазов в легких мышей. При гистологическом исследовании показано, что респираторный отдел легких экспериментальных животных сохраняет воздушность, не имеет признаков эмфиземы и ателектаза (рис. 4а, 4б). После введения наночастиц в легких мышей определяются очаговые кровоизлияния, выход

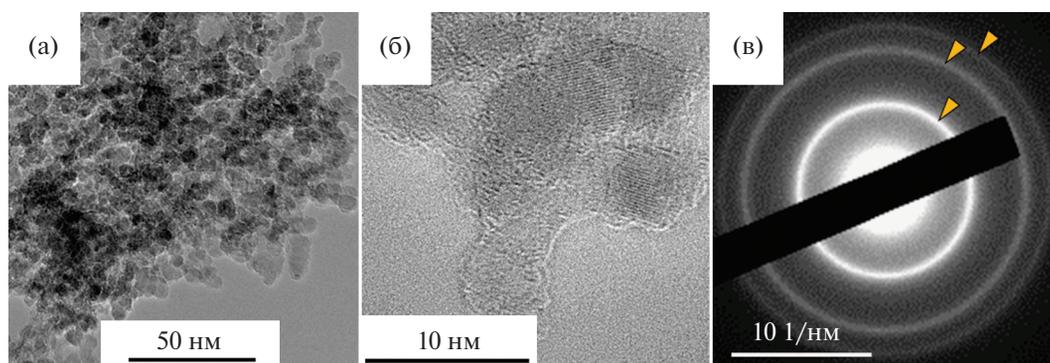


Рис. 1. Экспериментальные НА: а – конгломерат частиц, б – индивидуальные наночастицы, в – дифракция электронов, стрелками показаны дифракционные кольца (ТЭМ).

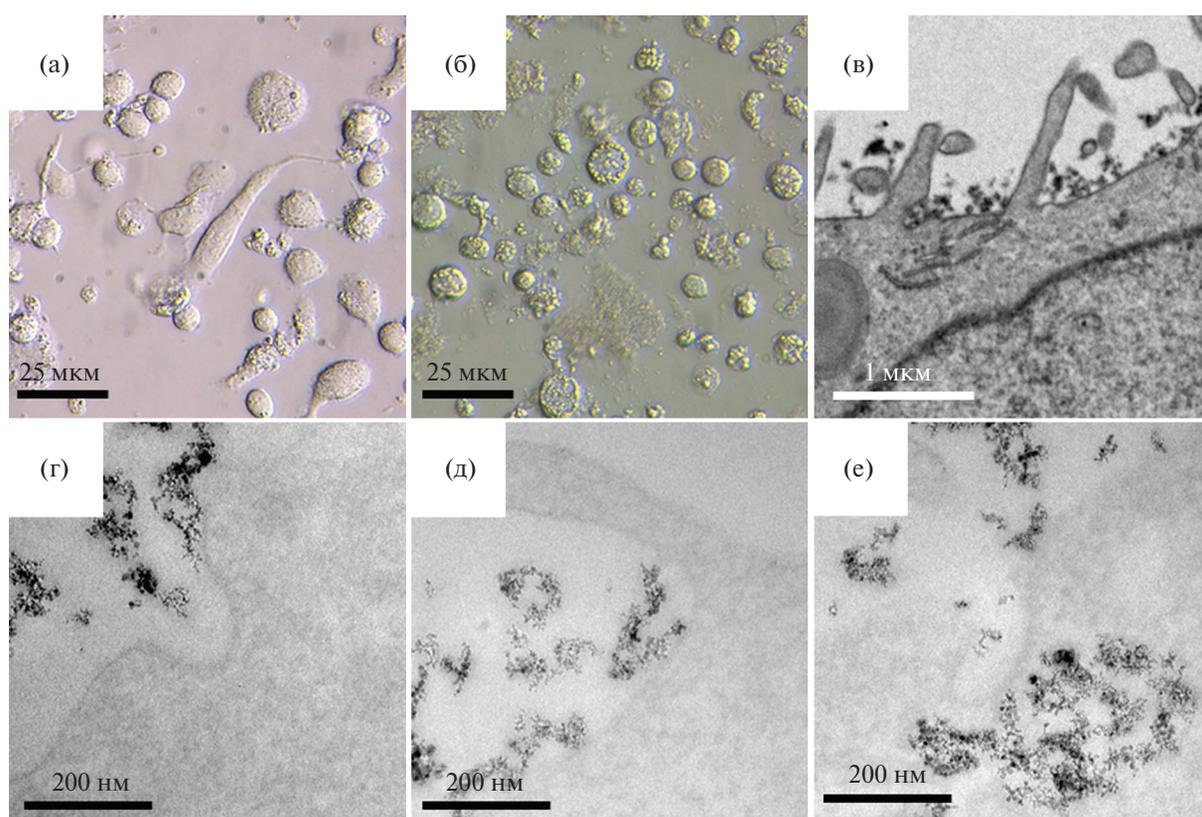


Рис. 2. Локализация наноалмазов в макрофагах ТНР-1: а – макрофаги ТНР-1 после трех суток дифференцировки, б – макрофаги ТНР-1 после 10 сут инкубации с НА, в – НА возле поверхности макрофага ТНР-1, г–е – НА в момент захвата макрофагом ТНР-1; а, б – ДИК, в–е – ТЭМ, в – полное контрастирование, г, е – неполное контрастирование.

отдельных эритроцитов во внутриальвеолярное пространство (рис. 4б, желтые стрелки). Межалвеолярные перегородки не утолщены. В интерстиции альвеол выявляются крупные скопления темного цвета (рис. 4б). На полутонких срезах при больших увеличениях такие скопления можно идентифицировать как НА (рис. 4в, желтые стрелки). При этом анализ при помощи световой микроскопии не позволяет точно идентифициро-

вать клетки, в которых локализованы наночастицы, и подтвердить их химическую природу.

Проведенный ультраструктурный анализ показал, что наночастицы образуют электронноплотные компактные агрегаты в эндотелиальных клетках и в гистиоцитах (интерстициальные макрофаги) (рис. 5).

Детекция наноалмазов в макрофагах ТНР-1 и легких мышей. Детекция НА в биологических об-

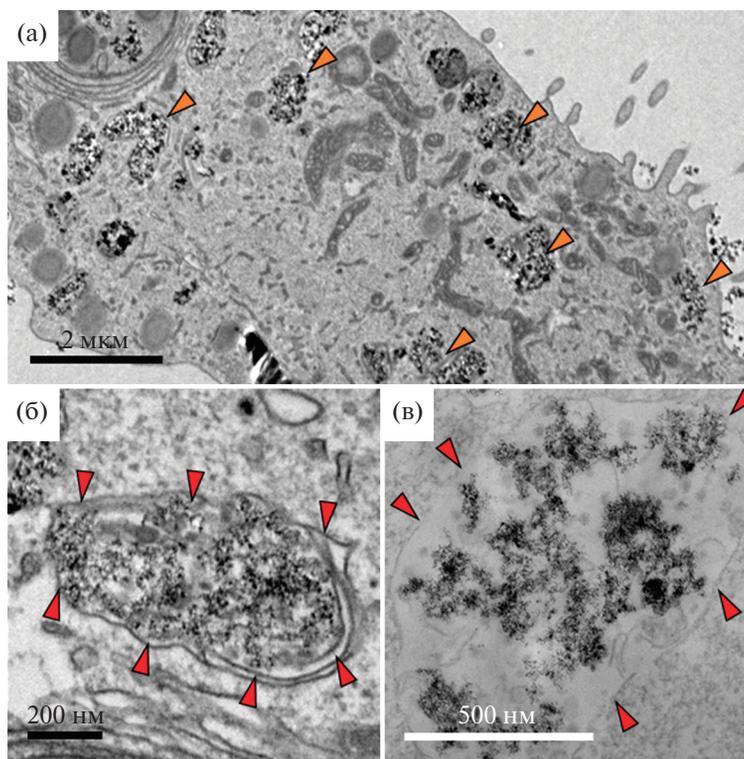


Рис. 3. Локализация наноалмазов в макрофагах ТНР-1: а – общий вид макрофага, стрелками показаны фагосомы с НА; б, в – фагосомы с НА, стрелками показаны границы фагосом. ТЭМ, полное контрастирование.

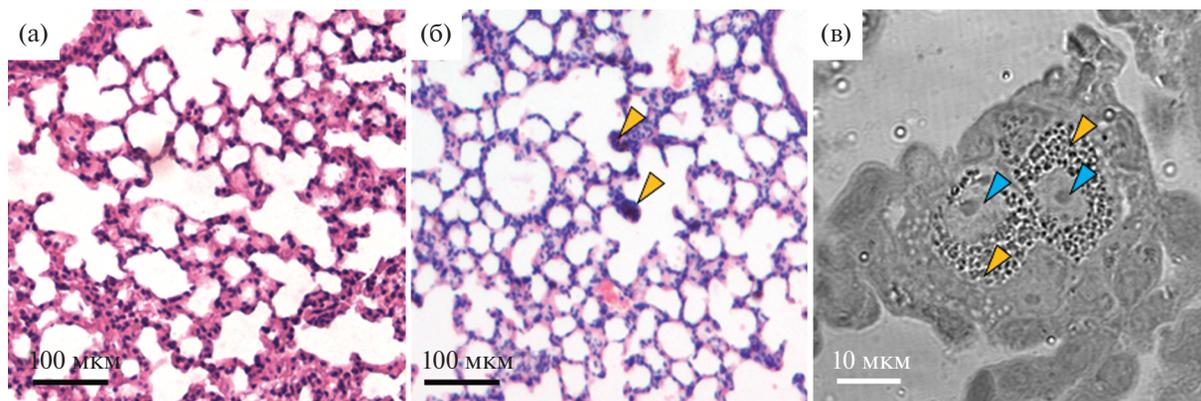


Рис. 4. Респираторный отдел легких мыши после введения наноалмазов: а – контроль, б, в – темные включения в интерстиции респираторного отдела, 7 дней после введения. Желтыми стрелками показаны включения, голубыми – ядра гистиоцитов; а, б – окрашивание гематоксилин-эозином, в – ДИК-микроскопия, полутонкий срез.

разцах сопряжена с определенным количеством трудностей. Из-за размеров НА – 3–10 нм – наночастицы можно различить только при помощи метода электронной микроскопии высокого разрешения. При исследовании на микрофотографиях скопления НА представляют собой электронно-плотные кластеры. Уточнить их природу возможно только с помощью метода дифракции электронов. На рис. 6 и 7 приведены примеры анализа кристаллической структуры и

химической природы электронно-плотных включений, выявляемых в макрофагах (рис. 6) или в легких мышей (рис. 7) после введения НА. Все полученные электронограммы электронно-плотных включений внутри фагосом совпадают с эталонной электронограммой НА, приведенной на рис. 1в. Это подтверждает, что все выявленные включения в фагосомах/фаголизосомах являются НА.

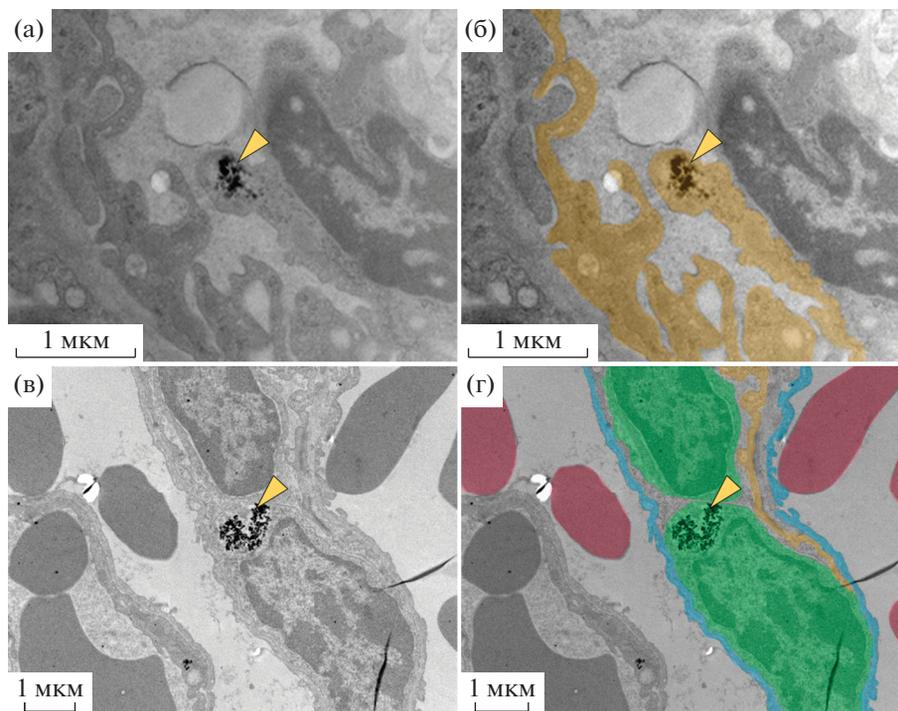


Рис. 5. Наночастицы в цитоплазме эндотелиальной клетки (а, б) и гистиоците, 7 дней после введения (в, г). Зеленым цветом показан гистиоцит, желтым — эндотелиоцит, красным — эритроциты, голубым — альвеолоцит. Стрелками показаны скопления наночастиц. ТЭМ, неполное контрастирование.

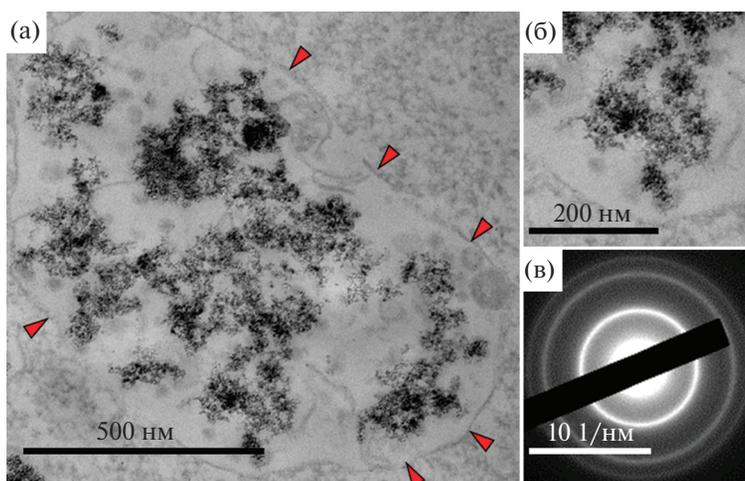


Рис. 6. Фагосома с нанодиамазами в макрофаге THP-1: а — общий вид фагосомы, стрелками показаны границы фагосомы, б — крупный фрагмент фагосомы, в — электронограмма с выделенного участка. ТЭМ, полное контрастирование.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методами световой и электронной микроскопии установлено, что НА выявляются внутри фагосом/фаголизосом макрофагов человека и в клетках (эндотелии и гистиоцитах) легких мышей. В модели *in vitro* показано, что макрофаги человека захватывают наночастицы двумя способами. Первый заключается в образовании фило-

подий, второй — в формировании инвагинаций плазматической мембраны. Полученные результаты согласуются с данными [23] — макрофаги поглощают НА путем клатрин-зависимого эндоцитоза, для которого характерна электронно-микроскопическая картина с образованием инвагинаций плазматической мембраны. В то же время образование филоподий макрофагами и захват ими скоплений НА были продемонстрированы в

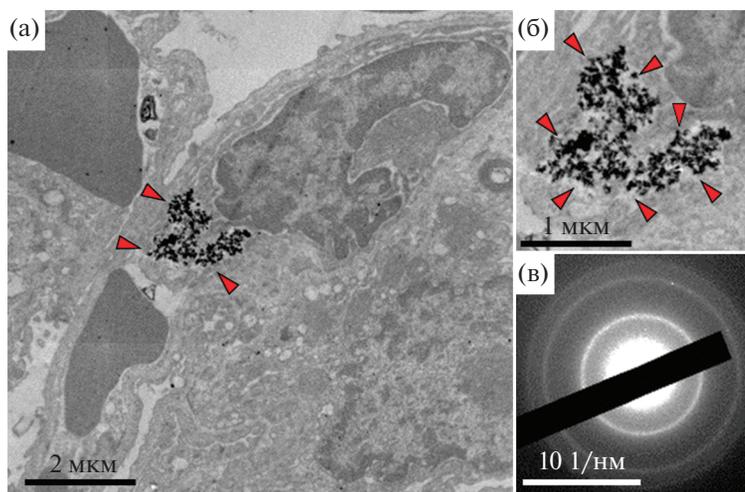


Рис. 7. Фагосома с наноалмазами в гистиоците, 7 дней эксперимента, стрелками показаны границы фагосомы; а — общий вид фагосомы, б — крупный фрагмент фагосомы, в — электронограмма с выделенного участка. ТЭМ, неполное контрастирование.

[24]. В упомянутых работах использовались НА диаметром до 100 нм, полученные высокотемпературным методом. Таким образом, независимо от размера НА и способа их получения наночастицы могут накапливаться в макрофагах в результате эндоцитоза.

Известно, что в результате эндоцитоза (и его разновидности — фагоцитоза) слияние фагосом с лизосомами происходит достаточно быстро (в течение 10 мин) [25], что не позволяет в рамках данной работы отличить фагосомы от фаголизосом. Отметим, что других вариантов внутриклеточной локализации экспериментальных НА обнаружено не было. В [26] была показана локализация НА размером 5–10 нм в цитоплазме вне мембранных органелл клеток.

Как показано на модели *in vivo*, в легких мышей наночастицы выявлялись в эндотелиальных клетках и интерстициальных макрофагах спустя 7 дней после введения. Вариантов локализации НА в других клетках легких выявлено не было. Определить скопления наночастиц в ткани возможно на световом уровне: они представляют собой темные образования, выделяющиеся на общем фоне в интерстиции альвеолярных перегородок. При большом увеличении (более 1000 раз) методом ДИК возможно различить отдельные конгломераты наночастиц внутри таких скоплений, которые характеризуются специфическим блеском и светопреломлением.

Накопление наночастиц в макрофагах и эндотелиоцитах связано со способностью этих клеток к эндоцитозу/фагоцитозу. Эндотелиальные клетки способны к эндоцитозу самых разнообразных субстратов: апоптотических телец, холестерино-

вых и фибриновых сгустков, латексных бусин [27], а также к трансцитозу [28].

На увеличение проницаемости сосудов легких в результате введения НА указывает выход эритроцитов в альвеолярное пространство. В эксперименте на клеточных культурах — первичной культуре неонатальных человеческих эндотелиоцитов микроциркуляторного русла [29] было показано, что НА могут изменять проницаемость монослоя, имитирующего эндотелий в культуре. Через 1 ч после контакта с НА между клетками экспериментальной модели эндотелия формировались бреши, количество которых прямо зависело от времени экспозиции и концентрации наночастиц и сопровождалось продукцией активных форм кислорода. Также вклад в увеличение такой проницаемости вносят поверхностные модификации НА — наибольшая проницаемость наблюдалась при использовании НА с аминогруппами, потенциал которых в водной среде положительный, наименьшая — с карбоксильными, потенциал которых в водной среде отрицательный. Это свойство НА предлагается использовать для повышения проницаемости сосудов в малигнизированной ткани для создания более высокой концентрации лекарственных препаратов.

В исследовании о накоплении, выведении и токсичности НА, выполненном на легких мышей (линия ICR, самцы), была использована модель внутритрахеального (хирургическим путем) введения НА (1 мг/кг в PBS) [14]. ДНА диаметром 4 нм выявлялись только на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Данный тип НА не приводит к появлению патологических изменений в легких мышей на гистологическом уровне ни через сутки, ни через 28 дней после введения. Анализ активности глю-

татиона (GSH) и малонового диальдегида (MDA) не выявил в эксперименте отличий от контрольных значений показателей. Это свидетельствует в пользу того, что НА в отличие от других углеродных наночастиц [30–32] не вызывают окислительный стресс в клетках легких. Отметим, что использованный в работе внутритрахеальный метод введения наночастиц не обеспечивает достаточного проникновения наночастиц в альвеолы, в отличие от внутривенного, использованного в настоящей работе. Также делался акцент прежде всего на бронхиальные макрофаги как на клетки, в которых преимущественно выявляются наночастицы. Мы показали, что при однократном внутривенном введении через 7 сут наночастицы выявляются в клетках эндотелия и в интерстициальных макрофагах. Это свидетельствует, что НА захватываются из кровотока эндотелиоцитами, после чего поступают в интерстиций, где поглощаются гистиоцитами.

Известно, что легкие человека содержат в себе многочисленные включения разной природы [33]. Особенно это характерно для жителей городов и курьельщиков. На электронных микрофотографиях визуально отличить такие включения от НА может быть затруднительно. Используемая в работе дифракция электронов показывает себя как единственный достоверный метод идентификации НА в биологическом материале. В то время как на гистологических срезах, изучаемых методом световой микроскопии и традиционной электронной микроскопии, скопления наночастиц могут быть неверно опознаны визуально, дифракция электронов подтверждает кристаллическую природу обнаруженных кластеров и надежно указывает на их принадлежность к НА в случае совпадения дифракционной картины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имеющиеся сегодня данные позволяют предположить, что носители лекарств на основе НА могут быть безопасны при терапии легочных заболеваний. Для подтверждения этого тезиса необходимо провести оценку влияния НА на клетки легких, их накопления и выведения в течение длительного (90–180 дней) эксперимента как в норме, так и на фоне развития патологического процесса в модели *in vivo*. Такое исследование подтвердит безопасность использования НА как платформы для связывания лекарственных препаратов и позволит выявить их локализацию в клетках легких на фоне развития, в частности, туберкулезного воспаления. В дальнейшем необходимо будет ответить на вопрос о возможности связывания лекарственных веществ, применяемых при терапии легочных заболеваний, с НА, их влиянии на клетки легких и накоплении в разных их популяциях в зависимости от срока введения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам межфакультетской лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за содействие в выполнении электронно-микроскопических исследований. Авторы хотят отметить вклад Николая Борисовича Леонидова, д.б.н., лауреата премии Правительства РФ, заслуженного изобретателя РФ, профессора кафедры фармацевтической технологии Рязанского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова в развитие данного научного направления.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова (проект № 121032300098-5); в рамках Соглашения о научном сотрудничестве № 1-2022 между МГУ им. М.В. Ломоносова и ЦНИИ туберкулеза, Договора о научном сотрудничестве № 1-2022 между ЦНИИ туберкулеза и ООО “Смарт Полиморф Технолоджи”, инновационный центр “Сколково”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ashique S., Sandhu N.K., Chawla V., Chawla A.P.* // *Curr. Drug Deliv.* 2021. V. 18. № 10. P. 1435. <https://doi.org/10.2174/1567201818666210609161>
2. *Rosenblum D., Joshi N., Tao W. et al.* // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 1410. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>
3. *Mingalev P.G., Surmillo A.S., Lisichkin G.V.* // *Colloid J+*. 2021. V. 83. P. 352. <https://doi.org/10.1134/S1061933X2103011X>
4. *Hafeez N.M., Celia C., Petrikaite V.* // *Processes.* 2021. V. 9. P. 1527. <https://doi.org/10.3390/pr9091527>
5. *Zhu Y., Li J., Li W. et al.* // *Theranostics.* 2012. V. 2. № 3. P. 302. <https://doi.org/10.7150/thno.3627>
6. *Bondon N., Raehm L., Charnay C. et al.* // *J. Mater. Chem. B.* 2020. V. 8. № 48. P. 10878. <https://doi.org/10.1039/d0tb02221g>
7. *Jariwala D.H., Patel D., Wairkar S.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2020. V. 113. P. 110996. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110996>
8. *Weil T., Wu Y.* // *Phys. Sci. Rev.* 2017. V. 2. P. 20160104. <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0104>
9. *Qin J., Yang X., Lv C. et al.* // *Mater. Des.* 2021. V. 210. P. 110091. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110091>
10. *Schrand A.M., Huang H., Carlson C. et al.* // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 2. <https://doi.org/10.1021/jp066387v>
11. *Chang B., Lin H., Su L. et al.* // *Adv. Funct. Mater.* 2013. V. 23. № 46. P. 5737. <https://doi.org/10.1002/adfm.201301075>
12. *Zhang X., Lam R., Xu X. et al.* // *Adv. Mater.* V. 23. № 41. P. 4770. <https://doi.org/10.1002/adma.201102263>

13. Yuan Y., Chen Y., Liu J. et al. // *Diam. Relat. Mater.* 2009. V. 18. № 1. P. 95.
<https://doi.org/10.1016/j.diamond.2008.10.031>
14. Yuan Y., Wang X., Jia G. et al. // *Diam. Relat. Mater.* 2010. V. 19. № 4. P. 291.
<https://doi.org/10.1016/j.diamond.2009.11.022>
15. Canton M., Sanchez-Rodriguez R., Spera I. et al. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. 734229
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734229>
16. Лепеха Л.Н. // Руководство “Респираторная медицина”. 2017. Т. 1. С. 159.
17. Нецадим Д.В., Архипов С.А., Шкуруний В.А. и др. // *Фундаментальные исследования.* 2015. № 2–6. С. 1222.
18. Яковлев Р.Ю., Соломатин А.С., Кулакова И.И. и др. Способ селективной доочистки наноалмаза. Пат. № 2506095 (Россия). 2014.
19. Кулакова И.И., Корольков В.В., Яковлев Р.Ю. и др. // *Российские нанотехнологии.* 2010. Т. 5. № 7–8. С. 66.
20. Kurygina A.V., Erokhina M.V., Makarevich O.A. et al. // *Biochemistry.* 2018. V. 83. № 3. P. 200.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918030021>
21. Кирпичников М.П., Онищенко Г.Е., Смирнова Е.А. и др. Выявление методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений: Методические рекомендации МР 1.2.0047-11. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. 46.
22. Baitinger E.M., Belenkov E.A., Brzhezinskaya M., Greshnyakov V.A. // *Phys. Solid State.* 2012. V. 54. № 8. P. 1715.
<https://doi.org/10.1134/S1063783412080057>
23. Perevedentseva E., Hong S.-F., Huang K.-J. et al. // *J. Nanopart. Res.* 2013. V. 15. 1834
<https://doi.org/10.1007/s11051-013-1834-8>
24. Huang K.-J., Lee C.-Y., Lin C.-Y. et al. // *J. Biophotonics.* 2017. V. 10. № 10. P. 1315.
<https://doi.org/10.1002/jbio.201600202>
25. Nguyen J.A., Yates R.M. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. 636078
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636078>
26. Faklaris O., Joshi V., Irinopoulou T. et al. // *ACS Nano.* 2009. V. 3. № 12. P. 3955.
<https://doi.org/10.1021/nn901014j>
27. Rengarajan M., Hayer A., Theriot J.A. // *PLOS Pathog.* 2016. V. 12. № 5. e1005603
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005603>
28. Simonescu M., Popov D., Sima A. // *Cell. Tissue Res.* 2009. V. 335. P. 27.
<https://doi.org/10.1007/s00441-008-0688-3>
29. Setyawati M.I., Mochalin V.N., Leong D.T. // *ACS Nano.* 2016. V. 10. P. 1170.
<https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b06487>
30. Masyutin A.G., Erokhina M.V., Sychevskaya K.A. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 161. P. 125.
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3361-y>
31. Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 8. P. 2399.
<https://doi.org/10.1021/nl0710710>
32. Gao S., Li T., Han D. et al. // *Ecotoxocol. Environ. Saf.* 2021. V. 212. 111980.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111980>
33. Losacco C., Perillo A. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018. V. 25. P. 33901.