

1 – ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольная, 9

2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1

1 – I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, 9, Vysokovol'naya str., Ryazan, 390026, Russia

2 – M.V. Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory str., Moscow, 119991, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: yarules@yandex.ru  
Тел.: 8 (499) 126 32 81

# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ КАК СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Р.Ю. Яковлев<sup>1,2\*</sup>, И.И. Кулакова<sup>2</sup>, Г.А. Бадун<sup>2</sup>, Г.В. Лисичкин<sup>2</sup>, А.В. Валуева<sup>1</sup>, Н.Г. Селезенев<sup>1</sup>, Н.Б. Леонидов<sup>1</sup>

**Резюме.** Освещены основные вопросы разработки систем доставки лекарственных веществ нового поколения как гибридных наноматериалов: выбор наноносителя, его стандартизация и способ иммобилизации биологически активных и лекарственных веществ. Выявлены основные органы распределения и кумуляции перспективного углеродного наноносителя – детонационного наноалмаза. Показано повышение эффективности антигипоксического действия конъюгата наноалмаз – глицин по сравнению с нативным глицином и препаратом сравнения – мексидолом.

**Ключевые слова:** системы доставки, наноноситель, углеродные наночастицы, детонационный наноалмаз, иммобилизация лекарственных веществ, гибридные наноматериалы.

## PHYSICAL-CHEMICAL PRINCIPLES OF THE PREPARATION OF HYBRID MATERIALS ON THE BASIS OF DETONATION NANODIAMONDS AS A NEW GENERATION DRUG DELIVERY SYSTEMS AND THEIR PROPERTIES

R.Y. Yakovlev<sup>1,2\*</sup>, I.I. Kulakova<sup>2</sup>, G.A. Badun<sup>2</sup>, G.V. Lisichkin<sup>2</sup>, A.V. Valueva<sup>1</sup>, N.G. Selezenev<sup>1</sup>, N.B. Leonidov<sup>1</sup>

**Abstract.** There were illustrated the main questions of development of new generation drug delivery systems as hybrid nanomaterials as follows: selection of nanocarrier, its standardization and the methods of immobilization of biologically active and medicinal substances. The basic organs of distribution and accumulation of advanced carbon nanocarrier – detonation nanodiamond were identified. It was shown that antihypoxic effect of the nanodiamond-glycine conjugate increased in comparison with a native Glycine and Mexidolum® as reference drugs.

**Keywords:** drug delivery systems, detonation nanodiamond, nanocarrier, carbon nanoparticles, immobilization drugs, hybrid nanomaterials.

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений фармации и медицины является создание систем доставки лекарственных веществ (ЛВ) [1]. Такие системы позволяют повысить эффективность ЛВ и снизить токсические эффекты за счёт уменьшения дозировки. В качестве носителей – платформ для ЛВ применяют наноконтейнеры и наночастицы [1, 2]. На сегодняшний день наибольшее развитие в этом направлении получили липосомы [3]. Однако их применение сопряжено с низкой стабильностью и малым сроком хранения. Поэтому интерес исследователей смещается в сторону наночастиц, на поверхности которых могут быть иммобилизованы биологически активные вещества (БАВ). Среди наноматериалов, предложенных на роль носителей, особое место занимают угле-

родные наноструктуры – фуллерены, нанотрубки, графен и детонационный наноалмаз (ДНА). Методы синтеза этих наночастиц хорошо разработаны, и их химические, физико-химические и фармакологические характеристики достаточно изучены [4, 5]. Однако фуллерены и нанотрубки обладают существенной токсичностью и широким спектром побочных эффектов [6]. Поэтому в последние годы одним из наиболее перспективных и безопасных углеродных наноматериалов для применения в качестве носителя БАВ и ЛВ признается ДНА. В ряде работ была показана нетоксичность и биосовместимость ДНА наряду с его способностью проникать через биобарьеры, включая гематоэнцефалический. В отличие от других углеродных наноматериалов в настоящее время только ДНА получают в промышленных масштабах (тонны в год). Поэтому целью работы является анализ фи-

зико-химических подходов к разработке на основе детонационных наноалмазов эффективных систем доставки БАВ и ЛВ нового поколения.

### ДЕТОНАЦИОННЫЙ НАНОАЛМАЗ

При детонации взрывчатых веществ с отрицательным кислородным балансом в неокислительной среде образуется алмазосодержащий конденсированный углерод, из которого путем окислительной обработки выделяют ДНА [7]. Условия детонационного синтеза обуславливают сферическую форму и малый размер (2–10 нм) первичных алмазных частиц. Эти частицы имеют химически инертное алмазное ядро, покрытое нарушенной углеродной оболочкой, с которой связан слой поверхностных функциональных групп [8, 9] (рисунок 1).

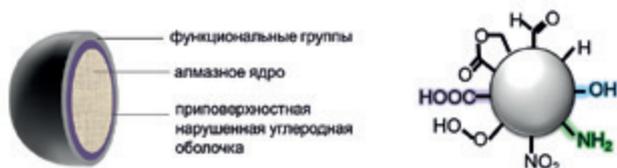


Рисунок 1. Структура первичной частицы ДНА и функциональные группы на его поверхности [9]

Высокая концентрация последних позволяет использовать широкий спектр химических реакций для функционализации (химического модифицирования) поверхности алмазных наночастиц [10–12].

**Стандартизация и унифицирование образцов ДНА.** Пока практическое использование ДНА в биомедицинских приложениях ограничено из-за отсутствия стандартизации промышленно выпускаемых образцов. Физико-химические характеристики образцов могут различаться не только для ДНА разных торговых марок, но и разных партий одной торговой марки. В связи с этим была разработана методика высокотемпературной обработки ДНА газообразным водородом [13], приводящей к унифицированию химии поверхности и способности ДНА в одинаковых условиях образовывать стабильные гидрозолы с близкими размерами агрегатов. Дополнительно был разработан способ кислотнo-щелочной доочистки промышленных образцов ДНА, позволяющий удалять примеси железа, серосодержащих соединений и нитрат-анионов [14].

**Изменение химического состояния поверхности ДНА.** Рядом исследователей показано, что химический состав поверхностных групп ДНА может влиять на его взаимодействие с клетками и клеточными органеллами, на токсичность и способность иммобилизовывать ЛВ. Поэтому были разработаны новые или оптимизированы созданные ранее методики получения ДНА с различной химией поверхности (рисунок

2) [15]. Также были предложены методики ковалентной прививки реагентов разной химической природы на поверхность ДНА (рисунок 3) [16].

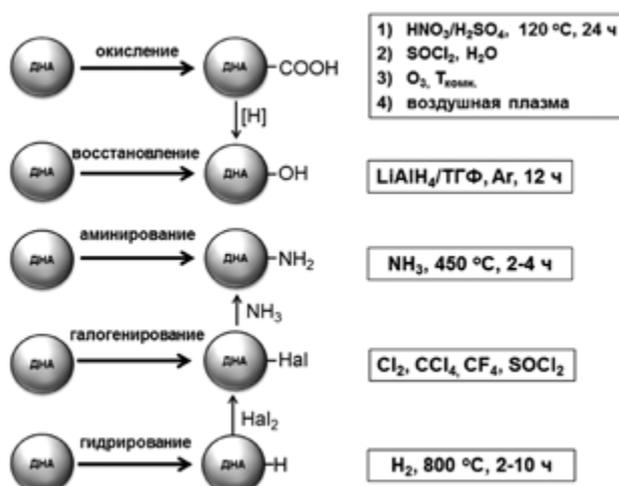


Рисунок 2. Схема различных видов функционализации поверхности ДНА [16]

### ПОДГОТОВКА ДНА ДЛЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для эффективного применения ДНА в медико-биологических исследованиях был разработан способ получения стабильных гидрозолей ДНА с определенным размером агрегатов [13], заключающийся в чередовании циклов ультразвуковой обработки и центрифугирования. Это открыло возможность применения методов спектрофотометрии и флуориметрии для определения концентрации гидрозолей ДНА. На этой основе был впервые разработан химико-аналитический подход к определению концентрации ДНА в воде и в водных средах от 1 нг с использованием комплекса четырех физико-химических методов (гравиметрия, УФ-спектрофотометрия, флуориметрия и пьезокварцевое взвешивание) [17].

Создание систем доставки ЛВ невозможно без выяснения их специфической активности, токсичности, способности проникать в клетки, органы и ткани, динамики накопления в организме и выведения из него. Были разработаны и запатентованы способы визуализации ДНА – использование собственной или приобретенной люминесценции, введение на поверхность ДНА радиоактивной (третий) или рентгеноконтрастной (3,4,6-триидобензиловый спирт) меток [16]. Показано, что использование наноалмаза с тритиевой меткой возможно в любых экспериментах *in vitro* и *ex vivo*. На сегодняшний день этот метод визуализации ДНА является лучшим по своим характеристикам [18].

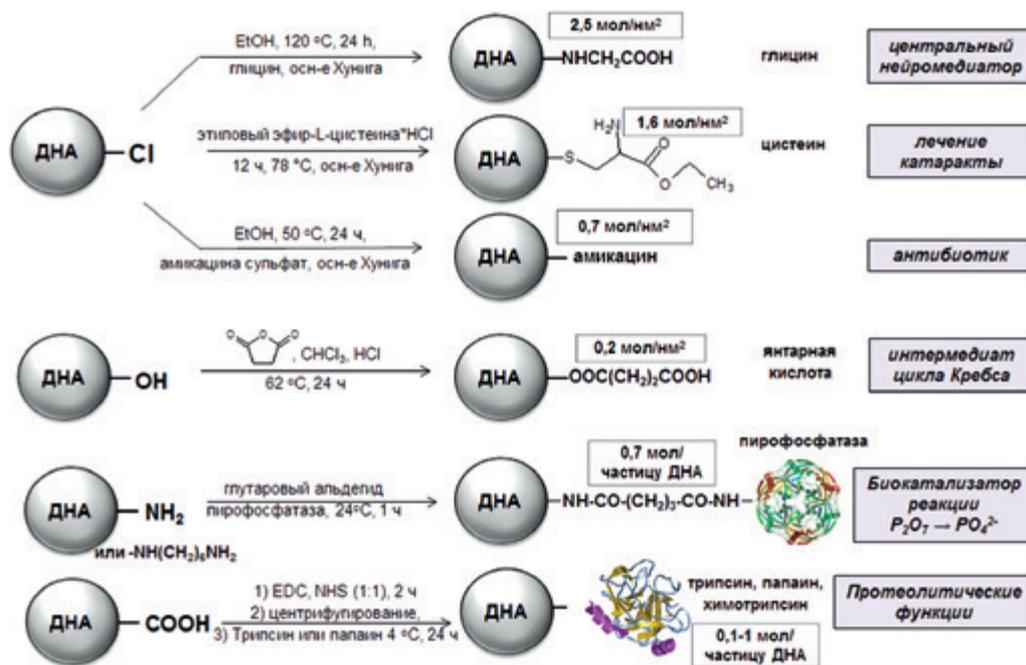


Рисунок 3. Примеры ковалентной прививки БАВ и ЛВ на поверхность ДНА [16]

**Проникновение ДНА в клетки.** Изучение мембранного транспорта ДНА показало, что частицы проникают в клетки уже через 15 мин инкубации (рисунок 4). Скорость проникновения ДНА в клетки уменьшается в ряду ДНА > ДНА – амикацин > ДНА – глицин. Следовательно, ковалентное связывание ДНА с глицином не препятствует связыванию с мембраной клетки частиц ДНА, но осложняет проникновение конъюгата внутрь клетки. Показано, что частицы ДНА, находясь внутри клетки, сформированы в цепочечные агрегаты, которые не окружены мембраной (свободно лежат в цитоплазме). При этом ДНА не проникает в ядро или митохондрии при коротких временах инкубации. Однако через 24 ч частицы ДНА были обнаружены в ядре, что может быть связано с митозом (делением клетки) [19].

**Токсичность ДНА.** В работе установлено, что при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c показатели LD<sub>50</sub> составляют: для ДНА – 3420±414, глицина – 4100±300,9 и конъюгата ДНА – глицин – 2730±250 мг/кг соответственно. При этом конъюгат ДНА – глицин несколько токсичнее отдельных ДНА и глицина. Однако все эти вещества можно отнести к IV классу малотоксичных веществ.

В результате исследования побочного действия на организм животного конъюгата ДНА – глицин при внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c в дозах 75, 150 и 225 мг/кг установлено, что он не вызывал признаков интоксикации и гибели животных на протяжении 14 сут. Конъюгат ДНА – глицин также не вызывал у мышей изменения шерстяного покрова, состояния слизистых оболочек. При этом отсутствовали потоз верхнего века, повышенная уринация, дефекация,

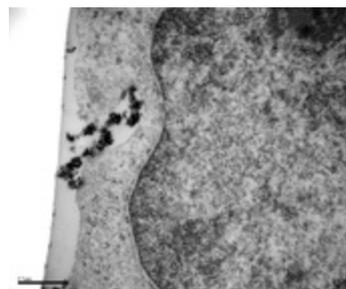


Рисунок 4. Проникновение ДНА в клетку через 15 мин инкубации. На рисунке показана инвагинация мембраны при подходе к ней частиц ДНА [19]

саливация, пилоэрекция, вокализация, боковое положение. В пределах нормы были ритм и глубина дыхательных движений, отсутствовали агрессивность, пугливость, тремор, судороги, катаlepsия, стереотипия и груминг. Не наблюдалось изменения позы. У животных были сохранены пинеальный, роговичный и болевой рефлексы. На протяжении всего времени наблюдения экспериментальные животные удерживались на перевернутой сетчатой платформе в течение 5 с [20].

**Биораспределение ДНА.** Методом рентгеновской компьютерной томографии (РКТ) с помощью ДНА с рентгеноконтрастной меткой удалось визуализировать циркуляцию данного конъюгата в кровеносной системе кролика. Однако чувствительности метода не хватило для его обнаружения в основных органах, так как повышение радиометрической плотности органов по Хаусфилду оказалось статистически недостоверным до и после введения конъюгата в организм [21]. Поэтому было решено определить рас-

пределение ДНА в органах кролика *ex vivo* методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) по изменению в них с течением времени концентрации йода [22]. Для этого органы животного переводили в жидкую фазу нагреванием в 1 М растворе едкого натра и непосредственно перед измерением проводили ультразвуковую обработку образцов. Результаты анализа биораспределения ДНА с йодной меткой представлены на рисунке 5.

Установлено, что достаточно быстрое (уже через 1 ч после введения) и максимальное кумулирование ДНА происходит в легких (до 30 мкг/г), меньшее – в селезенке (23 мкг/г). Максимальное содержание ДНА в других органах достигается медленнее: в печени и головном мозге – через сутки, а в почках и в сердце – на 15-е сутки. При этом в сердце и головном мозге накапливается до 6,5 мкг/г. Выводится ДНА, как следует из рисунка 5, из всех органов практически в течение

месяца. Это открывает дополнительные возможности применения ДНА в биофармацевтической практике для разработки пролонгированных лекарственных форм [16].

Биораспределение ДНА с тритиевой меткой ( $^3\text{H}$ -ДНА) изучали в течение 24 ч при внутривенном введении в бедренную вену крысы при определении радиоактивности в 13 видах биологических жидкостей, тканях и органах (рисунок 6).

Чтобы наглядно изучить распределение ДНА по каждому виду ткани или органа, из графика были убраны легкие, поскольку накопление в них было максимально и на порядок превышало накопление в других органах и тканях (4,5, 6,2, 4,7, 5,8, 1,8 и 2,5% от введенной дозы на грамм органа соответственно). Количество ДНА в легких достигает 4,4% на грамм органа в течение 15 мин и повышается до 6,2% к 30 мин. Через 6 ч

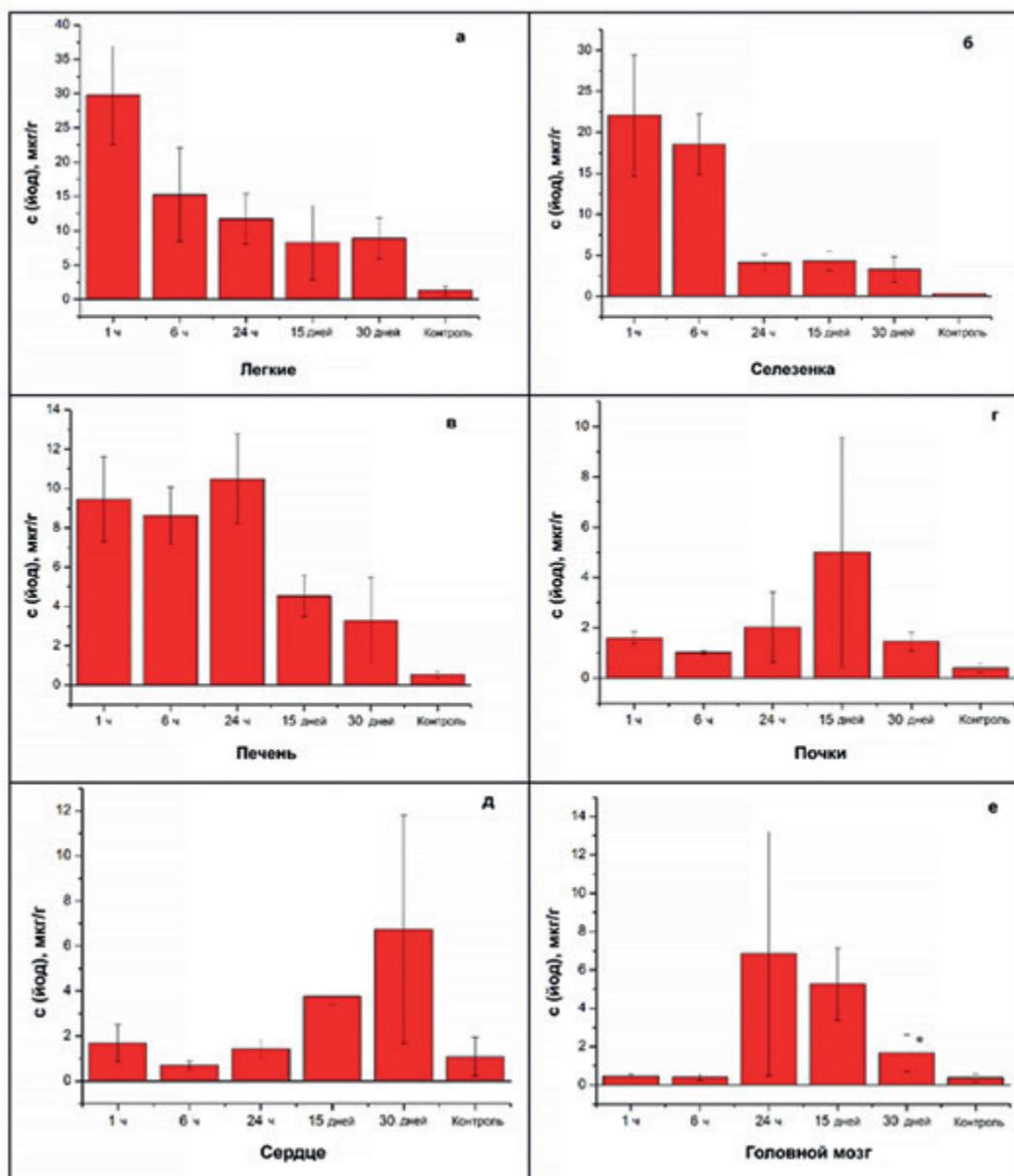
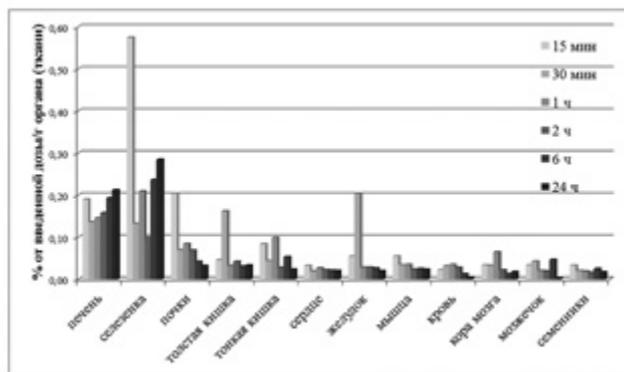


Рисунок 5. Динамика накопления и выведения ДНА по органам кролика (среднее по 5 животным) [16]



**Рисунок 6.** Биораспределение <sup>3</sup>H-ДНА в организме крыс от 15 мин до 24 ч при внутривенном введении в бедренную вену (среднее по 2 животным)

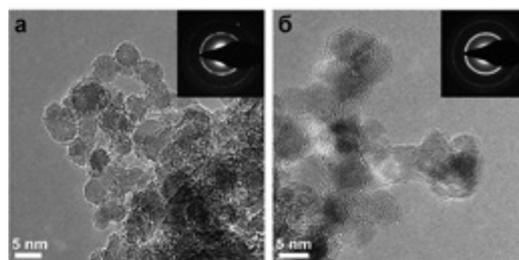
количество частиц в легких снижается до 1,8%, а к 24 ч накапливается до 2,3%.

Следующим органом по количеству накопленного ДНА в течение 15 мин является селезенка, в которой через данный промежуток времени обнаруживается ДНА в количестве 0,6% от введенной дозы на грамм органа. ДНА проникает в почки уже через 15 мин после введения, после чего его концентрация постепенно снижается. Можно сделать вывод, что ДНА выводится через желудочно-кишечный тракт, в который он поступает через 30 мин после введения, и его концентрация увеличивается за это время в 4 раза – с 0,05 до 0,2% на грамм. В работе также была изучена фармакокинетическая кривая содержания ДНА в крови, концентрация которого с течением времени постепенно снижается. Таким образом, были определены основные органы накопления и выведения ДНА в организме крысы.

**Синтез и свойства конъюгатов ДНА – БАВ и ДНА – ЛВ.** Анализ молекулярной поверхности фермента неорганической пирофосфатазы (РРазы) показывает, что на ней расположено большое число аминокрупп, которые могут быть использованы для ковалентной пришивки к поверхности ДНА для получения системы доставки этого фермента в организм. Количество пришитого фермента составило  $0,81 \pm 0,05$  мг на 1 мг ДНА. Это определено по разности концентрации фермента в супернатанте до и после синтеза (при учете концентрации фермента в промышленной жидкости). Образцы иммобилизованной РРазы на ДНА имели большой средний размер частиц (до 1  $\mu$ m) и отрицательный  $\zeta$ -потенциал. Если предположить, что все частицы ДНА имеют размер 4,2 нм и содержат 7000 атомов углерода, из которых 1000 атомов (15%) находятся на поверхности, то к 2 частицам ДНА присоединяется 1 молекула РРазы. Взаимное положение ДНА и фермента в этом материале можно сравнить с булочкой с изюмом, где изюм (ДНА) составляет около 50%. Электронная микрофотография ДНА, полученная методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) до и после иммобилизации РРазы, представлена на рисунке 7 [23].

Так как молекула белка в основном состоит из углерода и других элементов с аналогичными атомными зарядами, электронные свойства ДНА и белка весьма близки и их трудно отличить с помощью метода ПЭМ. Тем не менее в поверхностном слое частиц можно наблюдать выраженное различие. Непосредственно частицы определяются благодаря узкому слою неупорядоченной материи, соответствующей, скорее всего, аморфному углероду. Кристаллическая природа, типичная для ядра наноалмаза, видна по рентгеновской дифрактограмме, показанной на рисунке 7 в качестве вставки. После иммобилизации РРазы (рисунок 7б) частицы ДНА сохраняют кристаллическую основу, но план становится размытым, что, вероятно, связано с толстым слоем неупорядоченной органической фазы на поверхности, включающей белковые молекулы. Можно предположить, что белковая молекула после иммобилизации сохраняет, по крайней мере, частичную способность к нековалентной адсорбции и служит звеном, соединяющим частицы ДНА, приводя к гибриднему материалу типа «булочка с изюмом».

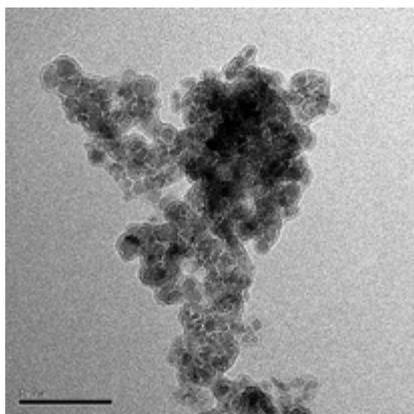
На микрофотографиях ПЭМ конъюгата ДНА – глицин в отличие от всех остальных образцов ДНА была зафиксирована оболочка вокруг частиц, которая имела размеры не более 1 нм [16]. По-видимому, это может свидетельствовать о большей доле молекул глицина, включенных в конъюгат (рисунок 8).



**Рисунок 7.** Микрофотография ПЭМ частиц ДНА до (а) и после иммобилизации РРазы [23]

Конъюгат ДНА – глицин был охарактеризован методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) (таблица 1). Как видно из данных таблицы 1, происходит существенное увеличение содержания азота на поверхности ДНА, что свидетельствует о прививке глицина на поверхность ДНА. По базам NIST [24] атом N 1s в молекуле свободного глицина характеризуется энергиями связи 400,6 и 398,7 эВ соответственно. В конъюгате эта энергия оказалось равной 399,6 эВ, что соответствует среднему значению [25].

**Антигипоксическая активность конъюгата ДНА – глицин.** Исследование специфической про-тигипоксической активности конъюгата ДНА – глицин в сравнении с фармакопейным глицином и широко применяемым в медицинской практике препаратом мексидолом осуществлялось при использовании двух



**Рисунок 8.** Микрофотография ПЭМ конъюгата ДНА – глицин [15]

методик с различным генезом гипоксических состояний: нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и гемической гипоксии [26].

**Таблица 1.**

Данные РФЭС конъюгата ДНА – глицин [25]

Наименование характеристики	Химические элементы		
	С	О	N
Атомные %,	80,1±0,1	11,5±0,1	8,4±0,1
Энергии связи, эВ	285,2±0,5	530,7±0,5	399,6±0,5

Было обнаружено, что конъюгат ДНА – глицин статистически достоверно увеличивал время выживания животных в условиях гипоксии. Показано, что его противогипоксический эффект имеет дозозависимый характер, усиливается с увеличением дозы от 10 до 20 мг/кг и выявляется как при однократном, так и при повторном введении. По противогипоксической активности в тесте нормобарической гипоксии конъюгат ДНА – глицин превосходит ДНА, не уступает глицину и препарату сравнения мексидолу, а в тесте гемической гипоксии существенно превосходит как ДНА и глицин, так и мексидол [27].

Исследование специфической активности конъюгата ДНА – глицин на других моделях экспериментальной психофармакологии [15,19] позволило выявить практически в каждом случае изменение интенсивности или природы фармакологической активности по сравнению с нативным глицином. Кроме того, было выявлено, что конъюгат ДНА – глицин обладает рядом эффектов, которые нативный глицин не проявляет. Это позволяет нам предположить, что обнаружено фундаментальное явление наномедицины – изменение спектра (амплификация) фармакологической активности лекарственного вещества при его иммобилизации на поверхности ДНА. Это открывает синтетические возможности разработки на основе ДНА нового класса высокоэффективных инновационных лекарственных средств.

**Таблица 2.**

Противогипоксическая активность конъюгата ДНА – глицин в сравнении с глицином и препаратом сравнения мексидолом в тестах нормобарической гипоксии с гиперкапнией и гемической гипоксии (мыши, вн/в, n=10) [26]

Вещества	Доза, мг/кг	Продолжительность жизни, мин
<b>Тест нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме</b>		
Контроль (физ. раствор)	–	15,08±0,45
Конъюгат ДНА – глицин	0,5	14,54±0,19
	1	16,09±0,21
	5	17,32±0,6*
	10	18,32±0,43*
Глицин	1	15,32±0,42
	10	17,14±0,41*
Мексидол	100	18,01±0,12*
<b>Тест гемической гипоксии</b>		
Контроль (фон – NaNO <sub>2</sub> )	–	17,58±0,75
Конъюгат ДНА – глицин	10	30,49±2,4*
Глицин	10	25,50±3,57*
Мексидол	100	20,5±3,45

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная стратегия получения стандартизованных детонационных наноалмазов с определенной функциональной поверхностью, выбором метода и условий иммобилизации биологически активного вещества и контролируемым размером частиц синтезированного гибридного наноматериала в стабильном гидрозоле позволяет создавать высокоэффективные лекарственные средства нового поколения, превышающие лучшие зарубежные аналоги и позволяющие не только решать проблему импортозамещения в лекарственном обеспечении населения страны, но и создать мощный экспортный потенциал, обеспеченный правовой защитой интеллектуальной собственности.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-03-00423 и 16-08-01156).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Нанолечения. Концепции доставки лекарств в нанонауке / Под ред. Алфа Лампрехта. – М.: Научный мир, 2010. 232 с.

2. Н.Б. Демина, С.А. Скатков. Стратегии развития и биофармацевтические аспекты систем доставки лекарств // Российский химический журнал. 2012. Т. 56(3–4). № 3–4. С. 5–10.
3. Ю.С. Тараховский. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. – М.: ЛКИ, 2011. 282 с.
4. J.M. Say, C. Vreden, D.J. Reilly et al. Luminescent nanodiamonds for biomedical applications // *Biophys. Rev.* 2011. V. 3. P. 171–184.
5. X. Zhang, W. Hu, J. Li, L. Tao, Y. Wei. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond // *Toxicol. Res.* 2012. V. 1. P. 62–68.
6. L.C. Cheng, X. Jiang, J. Wang. Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells // *Nanoscale.* 2013. V. 5(9). P. 3547–3569.
7. *Ultra Nanocrystalline Diamond. Synthesis, Properties, and Applications* / Ed. by O.A. Shenderova, D.M. Gruen. – Norwich, New York: William Andrew Publishing, 2006. P. 333–404.
8. И.И. Кулакова. Химия поверхности наноалмазов // *ФТТ.* 2004. Т. 46(4). С. 621–628.
9. И.И. Кулакова, В.В. Корольков, Р.Ю. Яковлев, Г.В. Лисичкин. Строение частиц химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза // *Российские нанотехнологии.* 2010. Т. 5(7–8). С. 66–73.
10. И.И. Кулакова. Модифицирование детонационного наноалмаза: влияние на его физико-химические свойства // *Российский химический журнал.* 2004. Т. 48(5). С. 97–106.
11. A. Krueger. The structure and reactivity of nanoscale diamond // *J. Mater. Chem.* 2008. V. 18. P. 1485–1492.
12. O.A. Shenderova, G.E. McGuire. Science and engineering of nanodiamond particle surfaces for biological applications (Review) // *Biointerphases.* 2015. V. 10(3). P. v030802.
13. Р.Ю. Яковлев, А.С. Осипова, А.С. Соломатин, И.И. Кулакова, Г.П. Муравьева, Н.В. Авраменко, Н.Б. Леонидов, Г.В. Лисичкин. Подход к унификации физико-химических свойств детонационных наноалмазов промышленного производства // *Российский химический журнал.* 2013. Т. 57(5). С. 86–96.
14. Патент РФ № 2506095. Способ селективной доочистки наноалмаза / Р.Ю. Яковлев, А.С. Соломатин, И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин, К.М. Королев, Н.Б. Леонидов; 2014.
15. A. Krueger. Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond // *Adv. Funct. Mater.* 2014. V. 22. P. 890–906.
16. Р.Ю. Яковлев, А.С. Соломатин, Н.Б. Леонидов, И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ // *Российский химический журнал.* 2012. Т. 56(3–4). С. 114–125.
17. R.Y. Yakovlev, I.I. Kulakova, O.V. Golubev, N.B. Leonidov, G.V. Lisichkin. Determination of detonation nanodiamonds concentration in hydrosols by optical methods // In Book of Abstract Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). – St.-Petersburg. 2015. P. 119.
18. G.A. Badun, M.G. Chernycheva, R.Y. Yakovlev, N.B. Leonidov, M.N. Semenenko, G.V. Lisichkin. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method // *Radiochimica Acta,* 2015. V. 102(10). P. 941–946.
19. R.Y. Yakovlev, I.B. Alieva, N.B. Leonidov, D.R. Rakita, V.N. Agafonov, R.E. Uzbekov. Interaction dynamics of the nanodiamond with living cells in culture // In Book of Abstract Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). – St.-Petersburg. 2011. P. 206.
20. Патент РФ № 2521404. Средство, обладающее противоионным действием, и способ его получения / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев, Д.Р. Ракита, Г.В. Лисичкин; 2014.
21. R.Y. Yakovlev. The problem of nanodiamond visualization in biopharmaceutical research // In Book of Abstract Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). St. Petersburg, 2011. P. 376.
22. Патент РФ № 2528096. Способ количественного определения углеродных наноструктур в биологических образцах и их распределения в организме / Р.Ю. Яковлев, А.А. Елисеев, Н.Б. Леонидов, Д.Р. Ракита, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Г.В. Лисичкин; 2014.
23. E.V. Rodina, A.V. Valueva, R.Y. Yakovlev, N.N. Vorobyeva, I.I. Kulakova, G.V. Lisichkin, N.B. Leonidov. Immobilization of inorganic pyrophosphatase on nanodiamond particles retaining its high enzymatic activity // *Biointerphases.* 2015. V. 10(4). P. 041005-1-041005-12.
24. National Institute of Standards and Technology. URL: <http://www.nist.gov> (дата обращения 15.05.2016).
25. Patent US 9254340 B2. Nanodiamond and glycine conjugate and method for the preparation thereof / R.Y. Yakovlev; 2016.
26. Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ФГБУ «НЦЭМСП».* – М.: Гриф и К, 2012. С. 276–296.
27. Патент РФ № 2506074. Антигипоксикант и способ его получения / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев, И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин; 2014.